



Martínez, Melina María Belén

Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación in vitro e in vivo. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en *Galleria mellonella*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Martínez, M. M. B. (2020). *Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación in vitro e in vivo. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en *Galleria mellonella*. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2583>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación *in vitro* e *in vivo*. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en *Galleria mellonella*

TESIS DOCTORAL

Melina María Belén Martínez

melinambmartinez@gmail.com

Resumen

En este trabajo de doctorado se realizó la caracterización y evaluación, tanto *in vitro* como *in vivo*, de una serie de nuevos péptidos antimicrobianos (PAMs). A partir de tres secuencias diseñadas y evaluadas previamente en el laboratorio, se realizaron modificaciones aminoacídicas específicas y se obtuvieron seis secuencias nuevas. Con estas nuevas secuencias, y al compararlas con sus secuencias parentales, se pudieron obtener datos valiosos sobre la influencia de los diferentes parámetros fisicoquímicos y la interacción de estos PAMs con membranas biológicas. En estos estudios se realizó la caracterización de todas las secuencias analizando parámetros fisicoquímicos *in silico* y también de forma experimental mediante ensayos biofísicos de estructura secundaria e interacción con membranas modelo y eritrocitos. Los resultados obtenidos permitieron hipotetizar un posible mecanismo de acción sobre las membranas bacterianas y echar luz sobre la influencia de algunos parámetros fisicoquímicos en la selectividad de los PAMs por membranas procariotas o eucariotas. Posteriormente se analizó la actividad biológica *in vitro*, evaluando toxicidad sobre eritrocitos murinos y actividad antimicrobiana y antibiofilm en *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Los péptidos con mejor actividad y menor toxicidad fueron seleccionados para trabajar con un aislamiento clínico que presenta resistencia a carbapenemes: *P. aeruginosa* M13513. En esta cepa se evaluó la actividad antimicrobiana, antibiofilm y la sinergia de los péptidos con meropenem. La mayoría de los PAMs presentaron buena actividad antibacteriana tanto en las cepas sensibles como en la resistente a carbapenemes, y tres de ellos mostraron efecto sinérgico con meropenem. Posteriormente, se puso a punto un modelo de infección en larvas de *Galleria mellonella* (GM), para las tres cepas bacterianas utilizadas. En este modelo se evaluó actividad

antimicrobiana *in vivo* de los péptidos seleccionados frente a todas las cepas, así como el efecto sinérgico con meropenem frente al aislamiento clínico. Finalmente, se utilizó el modelo de infección en GM enfocado en el estudio de metalo- β -lactamasas. En esta parte del trabajo se decidió evaluar *in vivo* si la presencia de metalo- β -lactamasa Nueva Delhi (NDM-1) secretada en vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés) es capaz de brindar protección en infecciones con *Escherichia coli* sensible a carbapenemes, y en co-infecciones de *E. coli* que secreta OMVs con NDM-1 y *P. aeruginosa* sensible. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la secreción de NDM-1 anclada a OMVs es capaz de proteger poblaciones bacterianas circundantes durante co-infecciones en GM.

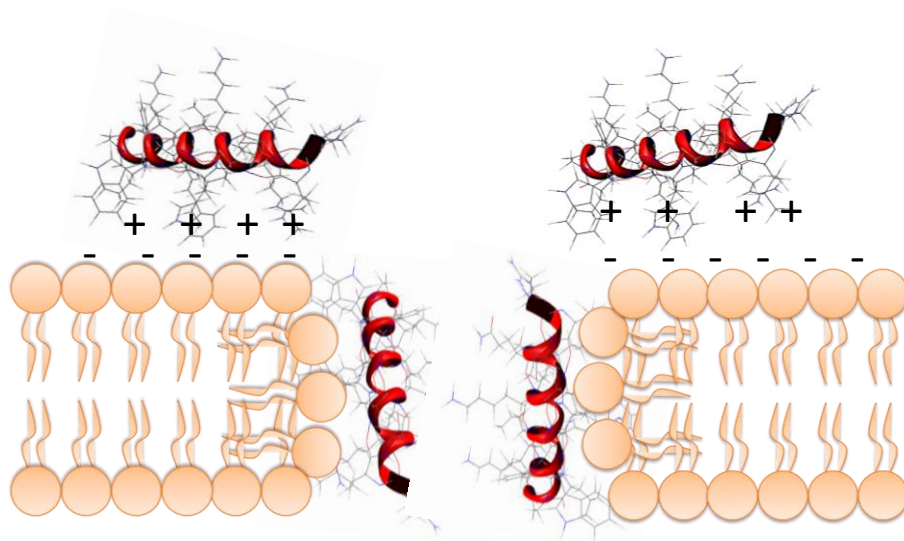
Tesis doctoral

**Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia
frente al problema de la resistencia a los
antibióticos, evaluación *in vitro* e *in vivo*. Análisis
de un mecanismo de protección mediado
por NDM-1 en *Galleria mellonella***

Autora: Lic. Melina Martínez

Director: Dr. Paulo Maffía

Co-director: Dr. Diego Faccone



Marzo 2020

AGRADECIMIENTOS

- ✚ A la Universidad Nacional de Quilmes, en particular al Departamento de Ciencia y Tecnología, que con mucho esfuerzo y trabajo colectivo ha podido generar las condiciones necesarias para el excelente funcionamiento de diferentes grupos de investigación. Asimismo, agradezco enormemente al Laboratorio de Microbiología Molecular, dirigido por la Dra. Liliana Semorile, quien nos abrió sus puertas para realizar este proyecto de investigación.
- ✚ Agradezco a CONICET que me otorgó la beca doctoral, y es el pilar más importante a nivel nacional en lo referente a la investigación, contribuyendo al desarrollo científico del país.
- ✚ Al Dr. Paulo Maffía, director de esta tesis, por guiarme en el proceso de formación del doctorado, compartiendo su tiempo y dedicación para llevar adelante con éxito cada una de las tareas realizadas. También agradezco al Dr. Diego Faccone, co-director, por su dedicación y compromiso con el proyecto.
- ✚ A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular, por haber transformado el lugar en trabajo en mi segundo hogar. Su compañía tiene un valor incalculable tanto en lo profesional como en lo personal. Me llevo de esta etapa muchísimos conocimientos nuevos, aprendidos en la práctica del día a día, y sobre todo, invaluable recuerdos y afectos que estarán por siempre en mí.
- ✚ A los Dres. Alejandro Vila y Lisandro González, por su generosidad, amabilidad, compromiso y excelencia profesional, con quienes hemos llevado adelante un trabajo de gran relevancia clínica.

- ✚ Al Dr. Axel Hollmann, por su invaluable colaboración en la realización de ensayos biofísicos y la producción científica.

- ✚ Al Instituto de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lisboa. En particular, al Dr. Nuno Santos C. y su equipo, por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio.

- ✚ A la Red temática para el desarrollo de péptidos antivirales y antimicrobianos para cepas multirresistentes, BUDE Pav-am, financiada por CYTED, el Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Parte de los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en revistas internacionales con referato:

- **Martinez, M**; Gonçalves, S; Felício, MR; Maturana, P; Santos, NC; Semorile, L; Hollmann, A; Maffía, PC. ***Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa.*** *BBA Biomembranes*. Julio de 2019 1;1861(7):1329-1337. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.05.008.
- **Martínez, M**; Polizzotto, A; Flores, N; Semorile, L; Maffía, PC; ***Antibacterial, anti-biofilm and in vivo activities of the antimicrobial peptides P5 and P6.2.*** *Microbial pathogenesis* Febrero de 2020. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103886.
- Hollmann, A; **Martinez, M**; Maturana, P; Semorile, LC; Maffia PC; ***Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics.*** *Frontiers in Chemistry*. Junio de 2018 doi: 10.3389/fchem.2018.00204
- Maturana, P; **Martinez, M**; Noguera, M; Santos, NC; Disalvo, EA; Semorile, L; Maffía, PC; Hollmann, A; ***Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity.*** *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. Mayo de 2017 doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.02.003.
- Hollmann, A; **Martínez, M**; Noguera, ME; Augusto, MT; Disalvo, A; Santos, NC; Semorile, L; Maffía, PC; ***Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides.*** *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. Mayo de 2016. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
- Faccone, D; Veliz, O; Corso, A; Noguera, M; **Martínez, M**; Payes, C; Semorile, L; Maffía, PC; ***Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates.*** *European journal of medical chemistry*. Enero de 2014; doi:10.1016/j.ejmech.2013.10.065.

Premios y distinciones:

- El trabajo expuesto en el Capítulo 5 fue presentado en el XV Congreso Argentino de Microbiología - CAM 2019, en donde la Sociedad Argentina de Microbiología le otorgó el primer premio: **Premio CAM 2019.**

Trabajos presentados en reuniones científicas:

- **Martínez, Melina;** Semorile, Liliana C.; Vila, Alejandro J; Gonzalez, Lisandro J; Maffía, Paulo C., **La secreción de metalo- β -lactamasa Nueva Delhi en vesículas de membrana externa es capaz de proteger poblaciones bacterianas circundantes durante co-infecciones en *Galleria mellonella*.** Argentina. Bs. As 2019. XV Congreso Argentino de Microbiología - CAM 2019.
- **Martínez, Melina;** Flores, Elizabeth N; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; ***Antimicrobial and antibiofilm activity of two new synthetic antimicrobial peptides against Staphylococcus aureus.*** Brasil. Maceió. 2019. 30° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Sociedade Brasileira de Microbiologia
- **Martínez, Melina;** Faccone, Diego F.; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; **Actividad antimicrobiana y antibiofilm de cuatro péptidos antimicrobianos frente a un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a meropenem.** Chile. Santiago de Chile. 2018. XXIV congreso latinoamericano de microbiología. ALAM – SOMICH
- **Martínez, Melina;** Faccone, Diego F.; Polizzotto, Axel; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; ***Synergistic Activity of Novel Antimicrobial Peptides With Meropenem Against a Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa.*** Estados Unidos de América. Nueva Orleans. 2017. ASM Microbe 2017. American Society for Microbiology
- **Martínez, Melina;** Polizzotto, Axel; Faccone, Diego F.; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; **Evaluación de nuevos péptidos antimicrobianos en *Galleria mellonella* criada de forma estandarizada en condiciones de laboratorio.** Argentina. Santa Fe. 2016. XXIII Congreso latinoamericano de microbiología 2016 y XIV Congreso argentino de microbiología. ALAM. AAM
- **Martínez, Melina;** Hollmann, Axel; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo Cesar. **Influencia de la hidrofobicidad en la actividad biológica de péptido antimicrobiano P5.** Argentina. Bernal. 2015. 2ª Jornadas de doctorandos y estudiantes avanzados de ciencia y tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, Departamento de Ciencia y Tecnología.
- **Martínez, Melina;** Faccone, Diego F.; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; ***Design and evaluation of new antimicrobial peptides with activity against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa.*** Argentina. Mar del Plata. 2014. SAMIGE 2014. Sociedad Argentina de Microbiología.
- Faccone, Diego; Veliz, Omar; Corso, Alejandra; Noguera, Martín; **Martínez, Melina;** Payes, Cristian; Semorile, Liliana C.; Maffía, Paulo C.; **Actividad antimicrobiana de 3 péptidos catiónicos de diseño frente a bacterias con mecanismos de resistencia de relevancia clínica.** Argentina. Buenos Aires. 2013. Congreso. XIII Congreso Argentino de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología

- **Martínez, Melina;** Noguera, Martín E.; Maffía, Paulo C.; **Desarrollo de nuevos péptidos antibacterianos para su utilización como principio activo para el tratamiento de infecciones.** Argentina. Bernal. 2013. 1ra Jornada de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de CyT. Universidad Nacional de Quilmes, Departamento de Ciencia y Tecnología.

INDICE

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
Situación actual: la lucha contra las “superbacterias”	13
Desarrollo de nuevos antimicrobianos	15
Péptidos antimicrobianos	16
Principales mecanismos de acción	18
Otros mecanismos de acción.....	22
Actividad anti-biofilm de los PAMs	25
La importancia del diseño <i>de novo</i> de péptidos antimicrobianos	26
CAPITULO 1	29
INTRODUCCIÓN	30
MATERIAES Y METODOS.....	32
Diseño de los péptidos.....	32
Análisis de propiedades fisicoquímicas	32
Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular	33
Evaluación de actividad hemolítica	33
Determinación de concentración inhibitoria mínima	34
Microscopía electrónica de barrido	35
Mediciones de espectroscopía de fluorescencia	36
Determinación del coeficiente de partición	36
Presión de superficie	37
Cambios de potencial de membrana de eritrocitos humanos evaluado por di-8-ANEPPS	37
Disminución de fluorescencia por acrilamida.....	38
<i>Quenching</i> de fluorescencia por 5NS y 16NS.....	39
RESULTADOS.....	40
Modificación de secuencias y análisis de estructura	40

Análisis de parámetros fisicoquímicos	42
Estudio de estructura secundaria por dicroísmo circular en el UV lejano	44
Actividad hemolítica	46
Actividad antimicrobiana	48
Interacción con membranas por ensayos biofísicos	51
Microscopía electrónica de barrido	57
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1.....	61
CAPITULO 2	64
INTRODUCCIÓN	65
MATERIALES Y METODOS.....	67
Cinéticas de muerte	67
Cinéticas de crecimiento.....	67
Sinergia por <i>checkerboard</i>	67
Sinergia por cinética de muerte	68
RESULTADOS.....	70
Determinación de actividad bactericida	70
Cinéticas de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> M13513.....	72
Ajuste de CIM para evaluación de actividad sinérgica.....	75
Sinergia por <i>checkerboard</i>	76
Sinergia por cinética de muerte	77
Mecanismo de acción propuesto para explicar la sinergia.....	79
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2.....	82
CAPITULO 3	83
INTRODUCCIÓN	84
MATERIALES Y METODOS.....	86
Inhibición de la formación de biofilm	86
Ruptura de biofilm pre formado y viabilidad bacteriana	87
Microscopía confocal de barrido láser.....	88
Microscopía de fuerza atómica	88
RESULTADOS.....	90
Inhibición de la formación de biofilm	90

Inhibición de la formación de biofilm en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	92
Inhibición de la formación de biofilm en <i>P. aeruginosa</i> M13513.....	93
Ruptura de biofilm pre-formado por <i>P. aeruginosa</i> M13513	95
Actividad anti-biofilm analizada por microscopía confocal.....	98
Microscopía de fuerza atómica	101
CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3.....	102
CAPITULO 4	103
INTRODUCCIÓN	104
MATERIALES Y METODOS	106
Cría de larvas de GM.....	106
Inocuidad en larvas de GM	106
Modelo de infección en larvas de GM.....	106
Sinergia in vivo en GM.....	107
RESULTADOS.....	108
PAMs en <i>Galleria mellonella</i>	109
Evaluación de los PAMs <i>in vivo</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> PAO1	110
Evaluación de los PAMs <i>in vivo</i> frente a <i>S. aureus</i> ATCC25923	111
Evaluación de los PAMs <i>in vivo</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> M13513	112
Evaluación de actividad sinérgica <i>in vivo</i> entre P5 y Meropenem	114
Evaluación de actividad sinérgica <i>in vivo</i> entre P6.2 y meropenem	115
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4.....	117
CAPÍTULO 5	118
INTRODUCCIÓN	119
MATERIALES Y METODOS	121
Inocuidad de vesículas con y sin NDM-1	121
Protección de <i>E. coli</i> sensible por OMVs_NDM-1.....	121
Concentración mínima de OMVs	121
Estabilidad de OMVs en el tiempo.....	122
Actividad de NDM-1 en OMVs vs proteína NDM-1 purificada.....	122
Evaluación <i>in vivo</i> de las variante de <i>E. coli</i> que expresan NDM-1	122
Transformación de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	123

Protección cruzada entre <i>E. coli</i> productora de NDM1 y <i>P. aeruginosa</i> POA1 KnR.....	124
RESULTADOS	125
Inocuidad de vesículas	125
Protección de <i>E. coli</i> sensible por OMVs_NDM-1.....	125
Concentración mínima de OMVs	128
Estabilidad de OMVs	129
Actividad enzimática de OMVs_NDM-1 vs. NDM-1 soluble.....	130
Descripción de construcciones genéticas de <i>E. coli</i> productoras de NDM-1	132
Ensayos de sobrevivencia en GM con las variantes genéticas de <i>E. coli</i>	133
Co-infección de <i>E. coli</i> productora de OMVs_NDM-1 con <i>P. aeruginosa</i> sensible a carbapenemes	135
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5	141
CONCLUSIONES FINALES	142
PERSPECTIVAS A FUTURO	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
ANEXO	154



INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Situación actual: la lucha contra las “superbacterias”

La aparición de los antibióticos y su implementación en la práctica clínica, hace menos de 100 años, fue un punto de inflexión en el control de las enfermedades infecciosas y elevó considerablemente la esperanza de vida de la población. Además de salvar millones de vidas, los antibióticos han generado una revolución en la medicina. Han contribuido al éxito en diversos campos como trasplantes, supervivencia de prematuros e inmunodeprimidos, cirugías para colocación de prótesis o catéteres vasculares, donde las infecciones tienen alta prevalencia. Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las causas más importantes de muerte, aun a principios del siglo XXI. Actualmente, la eficacia de estos fármacos está seriamente amenazada por la aparición y aumento de resistencia a los antimicrobianos. Este fenómeno que viene en aumento desde hace no pocos años y parece ser implacable, nos enfrenta hoy a patógenos humanos que son resistentes a varias drogas de uso habitual, e incluso algunos presentan resistencia a todos los antimicrobianos conocidos: las bacterias pan-resistentes. La medicina moderna está seriamente amenazada; intervenciones médicas que han logrado llevarse a cabo con éxito y de forma rutinaria, hoy son altamente susceptibles de complicaciones por causa de bacterias multirresistentes. Esto pone en riesgo desde el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes hasta las cirugías, el tratamiento de enfermedades crónicas como diabetes, las cesáreas, los trasplantes de órganos y la diálisis, entre otros [1]. Además, las infecciones causadas por bacterias resistentes aumentan la morbilidad, mortalidad y costo de tratamiento de los pacientes, en comparación con las infecciones producidas por bacterias sensibles [2]. Por lo tanto, no sólo representan una amenaza para la salud sino que también son un grave problema económico que afecta el funcionamiento de los sistemas de salud en general, derivando recursos en el tratamiento de múltiples enfermedades infecciosas que hoy otra vez se tornan complejas y difíciles de curar.

La evolución y la presión de selección son los responsables de este fenómeno. Los genes que otorgan resistencia a los antibióticos, en muchas ocasiones son genes que se han encontrado en genomas de microorganismos evolutivamente distantes de los patógenos humanos. Sin embargo, hoy los encontramos en ellos debido a la alta transferencia horizontal y presión de selección. Cualquier antibiótico utilizado en salud humana, producción animal o agrícola puede llevar a la aparición de resistencia, seleccionando genes que luego son fácilmente transferibles de bacterias ambientales a patógenos de animales y humanos. Luego estos microorganismos resistentes pueden rápidamente esparcirse entre humanos, animales y el ambiente, sobre todo en un mundo globalizado donde una persona infectada puede trasladarse rápidamente a miles de kilómetros antes de desarrollar síntomas, contribuyendo a la diseminación.

En este contexto es sumamente importante el estudio y la concientización sobre cuáles son los factores que favorecen la aparición de la resistencia, así como la investigación para el desarrollo de nuevas drogas activas frente a estas superbacterias.

La Organización Mundial de la Salud estableció un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. En Argentina, el Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” coordina la red de vigilancia nacional, con casi un centenar de laboratorios representativos de todas las jurisdicciones del país.

Frente a este panorama, en el que es necesario el accionar conjunto de distintas áreas, con cooperación global, cobra gran importancia la investigación, desarrollo e innovación en lo referente a nuevas drogas. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son una alternativa promisoriosa para hacerle frente a este problema alarmante.

Desarrollo de nuevos antimicrobianos

Desde que Fleming descubrió la Penicilina en 1929 y que Florey comprobó su actividad terapéutica, los primeros años fueron una etapa exitosa en el desarrollo de los antibióticos. La mayoría han sido aislados de fuentes naturales y otros tuvieron su origen en el estudio de colorantes bacterianos, dando lugar al primer antibiótico sintético y precursor de las sulfonamidas, el Prontosil. El periodo entre 1940 y 1960 se lo conoce como “La era dorada de los antibióticos”, donde se han descubierto la mayoría de las drogas que se utilizan actualmente. Desde entonces, se han desarrollado una gran variedad de antibióticos que consisten en derivados de otras clases de viejas drogas, pero sin embargo hubo escasos desarrollos de nuevos fármacos [3]. El principal obstáculo en este sentido resulta ser el factor económico, ya que se requiere de un periodo de ensayos de 12 años y más de 150 millones de dólares para llevar una nueva droga al mercado [4]. Por otra parte, para las industrias ha resultado más atractivo el desarrollo de fármacos que se utilizan en el tratamiento de patologías crónicas, ya que tienen mayor rentabilidad. Esto ha ido desviando la atención de los nuevos desarrollos, dejando relegada la innovación en antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En los últimos 10 años ha habido una notable expansión en el campo de investigación en péptidos antimicrobianos (PAMs). La tasa de aprobación de PAMs por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos ha aumentado al 20% en 2012. Esto constituye el reflejo del número creciente de péptidos que ingresan a ensayos clínicos año tras año, el cual fue de 1 en 1970 comparado con 20 en el 2013. Sin embargo, a pesar del desarrollo de muchos potenciales péptidos antimicrobianos, el camino hacia el mercado es extremadamente complejo porque los candidatos a medicamentos deben cumplir varios requisitos estrictos; entre ellos: eficacia o tolerabilidad similar o superior en comparación con fármacos análogos existentes, farmacodinámica y farmacocinética mejoradas, baja toxicidad y seguridad [5].

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son considerados antibióticos naturales ya que son producidos por varios organismos como los mamíferos, artrópodos, plantas y bacterias. También son definidos como péptidos de defensa del hospedador (PDH) por su rol esencial en el sistema inmune innato de organismos multicelulares [6,7]. Los PAMs tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra varios microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos y virus [8,9]. Particularmente, algunos PAMs son efectivos contra bacterias multirresistentes (MDR, por sus siglas en inglés – *multi-drug resistant*) y son menos propensos al desarrollo de la resistencia [10–12]. Por otra parte, además de la actividad antimicrobiana, los PAMs presentan múltiples actividades inmuno-moduladoras: pueden inducir la producción de quimiocinas, acelerar la angiogénesis, cicatrización de heridas y modular la apoptosis en organismos multicelulares [13].

Los PAMs generalmente contienen menos de 50 aminoácidos y se caracterizan por formar estructuras anfipáticas. En general, cuando un PAM se pliega en un ambiente que mimetiza una membrana, una cara del PAM queda cargada positivamente (mayormente por residuos de lisina y arginina) y la otra queda con una proporción considerable de residuos hidrofóbicos [6,14–16]. Cuando interactúan con la membrana de un patógeno, en primera instancia el acercamiento se produce por interacciones electrostáticas. Las cargas positivas de los PAMs se atraen con las superficies de las membranas microbianas, que poseen carga neta negativa. Esto resulta en la acumulación de los PAMs sobre la superficie celular. Luego, sus porciones hidrofóbicas son responsables de la interacción con los componentes hidrofóbicos de la bicapa lipídica. A partir de esta compleja interacción con la membrana se producen los principales reordenamientos de estructura, que pueden resultar en la formación de interacciones específicas péptido-lípido, la translocación de péptidos a través de la membrana y la interacción con dianas intracelulares o, el mecanismo más común, un efecto membranolítico [6,15,17–21].

Los PAMs se clasifican en diferentes grupos dependiendo de la composición de aminoácidos, el tamaño y la conformación [22,23]. Una forma alternativa de clasificar a los PAMs (Figura 1) es la agrupación en función de la estructura que adopta el péptido en solución. Además de la carga neta de los péptidos (positiva o negativa), diferentes estudios demostraron que existen otras características que resultan esenciales para la actividad antimicrobiana y los mecanismos de acción; como el tamaño, la secuencia, la conformación, la estructura, la hidrofobicidad y la anfipaticidad [24,25].



Figura 1 – PAMs agrupados en función de la torsión del esqueleto peptídico en solución. Fueron seleccionados 135 PAMs de la base de datos de péptidos antimicrobianos, para los cuales ha sido resuelta la estructura por resonancia magnética, disponible en Protein Data Bank. Tomado de [7]

Péptidos catiónicos

Este es el grupo más grande de PAMs y se divide en tres clases [26,27]. La primera está compuesta por péptidos hélice alfa, catiónicos y lineales, como Magainina (producida en la piel de la rana *Xenopus laevis*) y Cecropinas (descubiertas en la hemolinfa de la polilla *Hyalophora cecropia*). Estos PAMs poseen una estructura lineal antes de que se produzca la interacción con las

membranas, luego de la cual adoptan una estructura secundaria de tipo α -hélice anfipática [28]. Una segunda clase comprende péptidos catiónicos que están enriquecidos en aminoácidos específicos como prolina, arginina y otros. Son péptidos lineales y algunas veces pueden adoptar una estructura tipo “*extended coil*” (bobina extendida) [28]. La tercera clase incluye péptidos catiónicos que contienen residuos de cisteína, que les permite formar puentes disulfuro y generar láminas-beta estables. Por ejemplo, las defensinas (producidas fundamentalmente por leucocitos y células epiteliales de los mamíferos) tienen seis residuos de cisteína y se dividen de acuerdo al alineamiento de sus puentes disulfuro en defensinas α , β y θ [29].

Péptidos no catiónicos

Este grupo está compuesto por péptidos aniónicos, péptidos aromáticos o péptidos derivados de proteínas de unión a oxígeno [29]. Al igual que los catiónicos, estos PAMs también son agentes importantes del sistema inmune innato. Sin embargo, dado que su actividad antimicrobiana es leve, se considera que podrían actuar mejorando la actividad de los péptidos catiónicos [29]. Han sido identificados en vertebrados, invertebrados y plantas [30].

Principales mecanismos de acción

Mecanismo membranólítico

El mecanismo de acción clásico mayormente difundido de los PAMs es el efecto membranólítico que representa su habilidad de causar daño en las membranas celulares. Los PAMs inicialmente interactúan con los microorganismos por fuerzas electrostáticas, produciéndose una atracción entre sus aminoácidos positivos y las cargas negativas expuestas en las superficies celulares bacterianas. En este hecho se basa la idea de que la composición de la superficie celular es la que define la especificidad de los PAMs. Así, la sensibilidad de las células eucariotas y procariotas estaría relacionada directamente con las propiedades fisicoquímicas

de los lípidos que se encuentran en ambas membranas celulares [31,32]. En el lado externo de la bicapa lipídica de las membranas de mamíferos mayormente se encuentran fosfolípidos neutros, como fosfatidilcolina y esfingomiolina. Por el contrario, las membranas de las células bacterianas están compuestas esencialmente por lípidos con carga negativa como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipinas y fosfatidiletanolamina (PE) [33]. La carga negativa general que se encuentra en las membranas de las bacterias, así como las diferencias que se observan entre las membranas de las distintas cepas, juegan un rol importante en la unión preferencial de estos péptidos a algunos microorganismos. Las bacterias Gram-negativas contienen, además, lipopolisacaridos (LPS) en su membrana externa y en las Gram-positivas la pared celular está enriquecida en polisacáridos ácidos (ácidos teicoicos y teicurónicos). Estas moléculas que le confieren la carga neta negativa a la superficie de las células bacterianas son las responsables del primer acercamiento entre los PAMs y los patógenos, y permiten la primera interacción necesaria para que el péptido pueda alcanzar el blanco de acción [27].

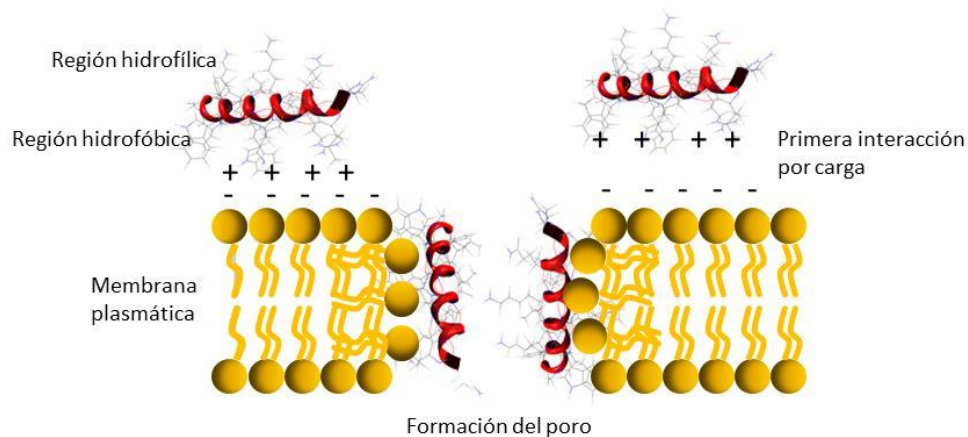


Figura 2 - Formación del poro a partir de las interacciones del péptido anfipático con los fosfolípidos cargados de la membrana plasmática

Por otra parte, la interacción y la actividad de los PAMs dependen de la composición de aminoácidos del péptido. Este hecho está respaldado en que entre las secuencias de péptidos de varios organismos existe una elevada conservación de residuos de aminoácidos cargados positivamente [34]. Además, la estructura secundaria adoptada por los péptidos es esencial para la unión a los

compuestos con carga negativa presentes en las membranas, como los fosfolípidos aniónicos[32]. Dependiendo de la afinidad y la relación péptido/lípidos, los péptidos pueden orientarse perpendicularmente (Figura 2), permitiendo la inserción en la bicapa lipídica y la formación de poros transmembrana [27,35].

Tres modelos explican el modo de interacción con la membrana

Los mecanismos por los cuales los PAMs pueden atravesar la membrana microbiana no son comunes a todos los péptidos y pareciera depender de las propiedades moleculares de ambos, tanto de los péptidos utilizados como de la composición de la membrana. Los PAMs son capaces de inducir defectos en la membrana como, por ejemplo, la formación de poros, la separación de fases y la promoción de estructuras lipídicas no laminares o la disrupción de la bicapa [3,36]. Hoy en día existen tres modelos que intentan explicar la disrupción de las membranas producida por estos antimicrobianos: “*barrel-stave*”, “*toroidal*” y “*carpet*”.

Barrel-stave

Este modelo sugiere que los péptidos forman poros transmembrana al insertarse directamente en el centro de la membrana blanco[37]. De esta forma, los PAMs se unirían a la membrana como monómeros y posteriormente se produciría la oligomerización y formación del poro (Figura3). El reclutamiento de monómeros adicionales podría aumentar el tamaño de poro, permitiendo la pérdida de contenido citoplasmático y la consecuente muerte celular. En este mecanismo, la estructura secundaria como las hélices alfa anfipáticas y/o las láminas beta son esenciales para la formación del poro [38]. Las regiones hidrofóbicas de los péptidos interactúan con los lípidos de membrana en tanto que las regiones hidrofílicas forman el lumen de los canales [27].

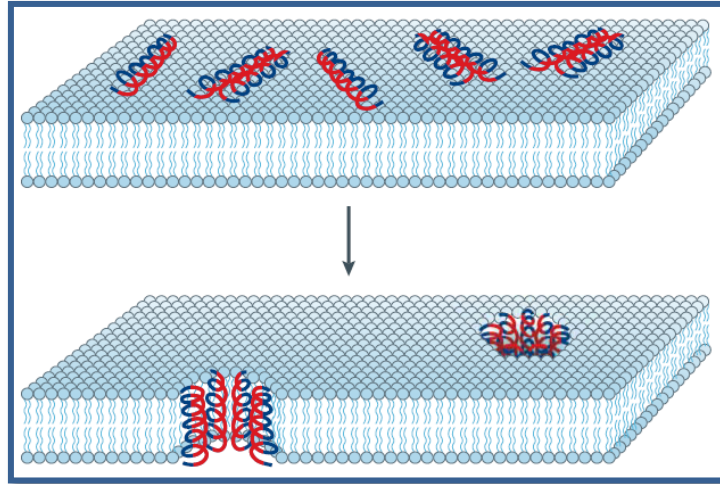


Figura 3 – Barrel-stave: los PAMs adheridos se agregan y se introducen en la bicapa lipídica. La región hidrofóbica (azul) del péptido queda en contacto con los lípidos de la membrana, en tanto que la región hidrofílica (roja) forma el interior del poro. Representación gráfica obtenida de [27].

Toroidal

En este modelo las moléculas peptídicas se insertan en la membrana formando un cúmulo de péptidos que inducen la deformación de la monocapa de lípidos hasta formar un poro [39]. Como consecuencia, la membrana lipídica queda intercalada con péptidos formando el poro (Figura 4A). Magainina, protegrinas y melitina son ejemplos de PAMs que forman poros concordantes con este modelo [34].

Carpet

En este modelo los PAMs cubren la membrana afectando su arquitectura de forma similar a un detergente [21] (Figura 4B). En principio, la interacción es dirigida por atracción electrostática y cuando la concentración de PAMs llega a cierto umbral la membrana se desintegra produciendo la lisis celular [40]. De todas maneras, se ha visto que los PAMs también pueden generar poros transmembrana en concentraciones menores al nivel umbral, lo que sugiere que los mecanismos por los cuales los péptidos producen la disrupción o la formación de poros, dependen de su concentración [33].

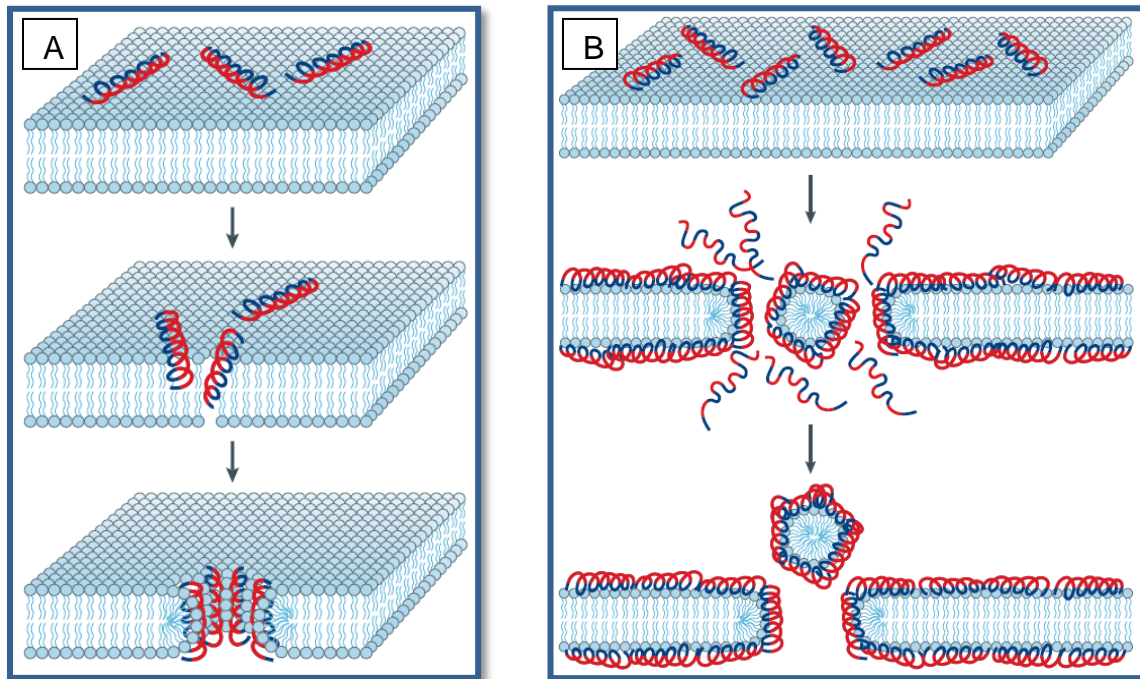


Figura 4 – A: Modelo *Toroidal*, los PAMs adheridos se agregan e inducen una curvatura en la monocapa lipídica. El interior del poro queda formado por las regiones hidrofílicas de los péptidos y las cabezas polares de los lípidos. B: Modelo “*carpet*”, los PAMs se colocan en forma paralela sobre la superficie de la bicapa lipídica formando una extensa capa o *carpet*. Representación gráfica obtenida de [27].

La mayoría de los PAMs interactúan directamente con los lípidos de la membrana celular. Sin embargo, se ha visto que algunos péptidos podrían requerir un receptor bacteriano, ya que se han observado diferencias en la actividad antimicrobiana de los enantiómeros L y D de algunos péptidos, como apidaecina y dorsorcina [41,42].

Otros mecanismos de acción

Recientemente se ha propuesto que la actividad de los PAMs podría deberse a otros mecanismos además de la ruptura de la membrana seguida por lisis celular. Diversas evidencias sugieren que los PAMs podrían interactuar con blancos intracelulares involucrados en vías metabólicas que son capaces de inducir el daño celular. Entre estas, las más comunes son la inhibición de la síntesis de pared celular, ADN, ARN y proteínas [3,5,27,43]. Además, se cree que

algunos de estos péptidos podrían actuar sobre distintos blancos celulares a la vez, involucrando un mecanismo mixto de múltiples blancos de acción [9] [43].

Inhibición de la síntesis de pared celular

En organismos Gram-positivos, el componente mayoritario de la pared celular es el peptidoglicano, presente en múltiples capas. En las bacterias Gram-negativas, una membrana externa, compuesta mayormente por LPS, se superpone a una fina capa de peptidoglicano. Como el peptidoglicano no se encuentra en las células eucariotas, son blancos interesantes para compuestos que inhiban su síntesis, aplicables en la terapéutica. En particular, el lípido II, que es un importante precursor en la síntesis de peptidoglicano, demostró ser un blanco atractivo para los compuestos antibacterianos, como los lantibióticos [44,45].

Una clase de lantibióticos son las bacteriocinas de clase I. Son péptidos antimicrobianos que se sintetizan en el ribosoma y luego sufren modificación postraduccional para producir numerosas moléculas con residuos inusuales [45]. El blanco de estos PAMs es el lípido II y, por lo tanto, la inhibición de la biosíntesis de pared celular. Por otra parte, se ha descrito que los lantibióticos también pueden formar poros transmembrana que permiten el flujo de moléculas y/o iones (ATP, K^+ y PO_4^{3-}) [46]. Asimismo, la nisina, un péptido antimicrobiano utilizado ampliamente en la industria alimenticia, primero se une al lípido II y luego actúa formando poros en la membrana, con la consecuente pérdida de aminoácidos, K^+ y ATP [45].

Además de los lantibióticos, otros PAMs también tienen como blanco la síntesis de pared celular. Lcn 972 es un representante de las bacteriocinas de clase II que ejerce su actividad antimicrobiana uniéndose al lípido II, a diferencia de la mayoría de los péptidos de esa clase que actúan preferencialmente produciendo la disrupción de la membrana plasmática [45]. De forma similar, otros péptidos no sintetizados en el ribosoma, como vancomicina, daptomicina, telavancina y dalbavancina, así como algunas defensinas producidas por organismos

eucariotas, tienen como blanco la vía de síntesis del lípido II, actuando a través de un mecanismo de inhibición de la síntesis de pared celular [45].

Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas

Algunos PAMs pueden atravesar espontáneamente las membranas bacterianas interna y externa, llegando a blancos intracelulares como ácidos nucleicos y proteínas, como por ejemplo la buforina II, una molécula lineal, catiónica, de 21 aminoácidos, que además posee actividad antiendotoxina [47,48]. La capacidad de neutralizar los efectos tóxicos de las endotoxinas, y evitar el *shock* séptico, también ha sido descrita para otros PAMs, como las temporinas [49] y catelicidinas [50] .

Otro PAM que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos es la indolicidina. Se trata de uno de los péptidos catiónicos naturales más pequeño que aparentemente actuaría promoviendo la despolarización de la membrana e inhibiendo la síntesis de la ADN [54-55].

Las catelicidinas comprenden una familia de proteínas de mamíferos con amplio espectro de actividad antimicrobiana. Una de ellas, PR-39, está involucrada en varios procesos celulares, incluyendo la reparación de heridas, quimioatracción, angiogénesis e inflamación [51,52]. Este PAM atraviesa la célula, sin producir daño en la membrana, y bloquea rápidamente la síntesis de ADN y proteínas en las bacterias [53–55].

Los neutrófilos humanos producen grandes cantidades de PAMs, como las defensinas. Además de la habilidad de permeabilizar las membranas, la defensina humana HPN-1 inhibe la síntesis de proteínas y ADN en *E. coli* [56]. Se ha propuesto que estos PAMs también tienen como blanco la inhibición de la síntesis de pared celular mediante la unión a un precursor del lípido II [57]. Esto respalda la idea de que un solo PAM puede tener varios mecanismos de acción que simultáneamente contribuyen a la muerte del microorganismo.

Actividad anti-biofilm de los PAMs

Los biofilms son comunidades microbianas complejas en las que los microorganismos se encuentran rodeados por una matriz extracelular polimérica, mediante la cual se mantienen firmemente adheridos a distintas superficies [58]. Desde el punto de vista de la salud humana, la característica más relevante de los biofilms es que le otorgan a las bacterias resistencia frente a los agentes antimicrobianos y a los componentes del sistema inmune, ya que las bacterias que crecen dentro de los biofilms se encuentran protegidas por esta barrera. De hecho se ha observado que muchos antimicrobianos tienen poca capacidad de penetración en el biofilm, contribuyendo a la generación de enfermedades infecciosas recurrentes, que se hacen crónicas y muy difíciles de erradicar [59] (se detalla más éste tema en la introducción del capítulo 3).

Por otra parte, los instrumentos inertes, como catéteres urinarios, tubos endotraqueales, implantes ortopédicos y mamaros, lentes de contacto, dispositivos intrauterinos, suturas y otros, son particularmente aptos para la formación de biofilms. Su presencia en las heridas puede comprometer la cicatrización y transformarlas en crónicas, de hecho más del 80% de las heridas crónicas están asociadas a la presencia de biofilms [60]. Las bacterias dentro del biofilm son muy resistentes a los biocidas y antibióticos, lo que complica el tratamiento de infecciones asociadas a estos dispositivos limitando las opciones terapéuticas [61]. En muchos casos, la infección solo puede ser tratada removiendo el dispositivo [62,63]. En particular *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos humanos oportunistas más importantes, que tiene la capacidad de formar biofilms sobre superficies abióticas como implantes artificiales, tubos endotraqueales, catéteres urinarios y lentes de contacto [64].

Actualmente, existe una extensa bibliografía en la que se describen a los PAMs como prometedores agentes anti-biofilm. La catelicidina humana LL-37 ha demostrado actividad *in vitro* contra biofilms pre-formados por *P. aeruginosa* y también ha sido efectiva en la inhibición de la formación de biofilms por *Staphylococcus epidermidis* y *P. aeruginosa* [65]. Por otra parte, lipopéptidos

catiónicos cortos han demostrado actividad anti-biofilm contra aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* [66]. Asimismo, existen algunos modelos *in vivo* que confirmaron el rol potencial de los PAMs como agentes anti-biofilm.

Además de su elevada capacidad de penetración en los biofilms, los péptidos antimicrobianos pueden actuar en diferentes etapas del desarrollo inhibiendo la formación o llevando a la ruptura de biofilms ya establecidos. Por estas razones se considera a los PAMs como potenciales candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas a esta forma de vida bacteriana compleja y súper-resistente [3].

La importancia del diseño *de novo* de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos han ganado mayor atención en las últimas décadas, reconocidos como una posible alternativa terapéutica frente a diversos tipos de bacterias. Además los PAMs poseen baja propensión a la aparición de resistencia debido a su particular modo de acción, el cual involucra principalmente el daño en las membranas celulares y, en algunos casos, se combina con el alcance de blancos intracelulares capaces de interrumpir vías metabólicas y funciones biológicas importantes para el desarrollo de los microorganismos. Esto representa un mecanismo de acción rápido (en el orden de minutos) y altamente efectivo (muerte del 99,9%), cuando se utilizan las concentraciones adecuadas. Esta particular diferencia con los antibióticos convencionales, que tienen mecanismos de acción más lentos con picos de actividad a las 24 hs, ayudarían a los PAMs, en parte, a evadir los mecanismos de resistencia observados para antibióticos clásicos. Los mecanismos de resistencia a PAMs conocidos actualmente están relacionados a cambios en moléculas que forman parte de las membranas bacterianas y que disminuyen la atracción electrostática inicial necesaria para la interacción del péptido con la membrana plasmática. Además, se han descrito algunos sistemas de bombas de eflujo y expresión de proteasas como otras estrategias para aumentar la resistencia a los PAMs. Sin embargo,

actualmente se considera a los péptidos antimicrobianos como alternativas promisorias para superar la crisis de resistencia actual, ya que son unas de las pocas moléculas que mostraron ser efectivas frente a bacterias multirresistentes [67].

Una fuente potencialmente rica de péptidos con actividad terapéutica es el sistema inmune innato, cuyos efectores, como los péptidos antimicrobianos, son producidos naturalmente por organismos eucariotas superiores. Sin embargo, algunos microorganismos de larga co-evolución con los humanos han desarrollado algunas estrategias de resistencia a los PAMs naturales o PDH (péptidos de defensa humanos). Entre ellas se destacan la modificación de superficie con bloqueo del acceso a los blancos intracelulares, la modulación de la expresión génica, la secreción de proteasas y mecanismos de captura. En algunos casos, estos mecanismos pueden presentarse de forma mixta y, generalmente, están controlados por respuestas al estrés coordinadas y reguladas por operones [13]. Sin embargo, es importante destacar que este fenómeno de resistencia es presentado en casos excepcionales y frente a PAMs naturales. El desafío, entonces, está en el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos para tomar ventaja en la carrera de la generación de resistencia. Para este fin, es sumamente importante la comprensión de los mecanismos de acción de los PAMs, para poder abordar el diseño racional de péptidos antimicrobianos optimizados, que puedan ser utilizados eficientemente como drogas terapéuticas.

La investigación en PAMs por parte de las compañías farmacéuticas y también desde organismos académicos y científicos se ha centrado en simplificar la secuencia de aminoácidos, aumentar la estabilidad y la actividad, así como mejorar las propiedades farmacológicas de los péptidos, facilitando su posible aplicación y comercialización.

Se han desarrollado muchos enfoques a lo largo de los años para generar nuevas secuencias de péptidos para diferentes blancos moleculares, basados en bases de datos de péptidos conocidos. El diseño computacional es una herramienta muy poderosa que se ha refinado a lo largo del tiempo. Hoy en día,

una secuencia de péptido o proteína dada puede analizarse a través de herramientas web, que permiten predecir sus propiedades fisicoquímicas e intuir su posible actividad antimicrobiana. Estas herramientas proporcionan información también cuando se buscan PAMs entre secuencias de distintos péptidos, aislados de diferentes organismos, y de esta manera seleccionar nuevos péptidos activos en función de las predicciones de sus características [5]. En otros casos, el objetivo es optimizar una secuencia de péptidos conocida para que sea más resistente a las proteasas o eficiente hacia la célula o proteína blanco de acción. Una de las estrategias es la sustitución de L- por D-aminoácidos, para aumentar la resistencia a la proteasas [68]. La hidrofobicidad también es un parámetro que influye en el comportamiento de los péptidos con actividad antimicrobiana. Comprender el mecanismo de acción molecular de muchos péptidos antimicrobianos aporta indicios valiosos sobre la importancia de la estructura peptídica en las actividades biológicas. Por lo tanto, el conocimiento de la relación estructura / función ayuda en el proceso de modificación o diseño de las secuencias de péptidos antimicrobianos para diversas aplicaciones terapéuticas.

Las secuencias de PAMs originales o parentales utilizadas en este trabajo de tesis (P1, P2 y P5) fueron diseñadas desde cero (*“de novo design”*), a partir de combinaciones de motivos conservados obtenidos por alineamientos de familias de PAMs conocidos. Esta metodología ha sido usada por otros autores y la han denominado *“embedded-hybrid”*, que en resumen es un método para diseñar péptidos híbridos que integran diferentes dominios funcionales de péptidos conocidos [69].



CAPITULO 1

Péptidos antimicrobianos: secuencias, caracterización, actividad biológica e interacción con membranas

INTRODUCCIÓN

Para poder considerar a los PAMs como una opción terapéutica y superar las barreras de los ensayos clínicos y factibilidad comercial, a nivel mundial se están llevando a cabo diferentes investigaciones con el objetivo de comprender los mecanismos de acción, promover la reducción de la toxicidad celular, aumentar la estabilidad y facilitar la producción a gran escala de manera rentable [10,70,71].

Una comprensión profunda y adecuada de las complejas interacciones entre los PAMs y las membranas biológicas, utilizando herramientas biofísicas y membranas modelo, así como ensayos *in vitro* para evaluar actividad biológica, son la clave para desarrollar una terapia de péptidos antimicrobianos adecuada para uso clínico. Comprender los mecanismos de selectividad que muestran estas moléculas al interactuar con las membranas procariotas o eucariotas, nos permite mejorar la selectividad de un PAM, a pesar de que es una tarea compleja debido a los múltiples factores que afectan la selectividad lipídica.

Como se detalló previamente, la unión de los PAMs a una membrana bacteriana es impulsada por interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente y la superficie celular cargada negativamente; seguido de interacciones hidrofóbicas entre los dominios anfipáticos del péptido y los fosfolípidos de la membrana. Las características clave responsables de la actividad microbicida son i) la carga positiva, ii) la unión a las membranas bacterianas y iii) la adopción de una estructura secundaria en contacto con membranas [6]. Estas características les permiten a los PAMs unirse e insertarse preferentemente en membranas bacterianas, en lugar de las membranas eucariotas. Sin embargo, a pesar de su afinidad por las membranas microbianas, los PAMs también pueden interactuar y desensamblar la membrana de las células eucariotas, particularmente las de los eritrocitos. La selectividad por membranas eucariotas es una posible característica indeseable de los PAMs, que representa un desafío que debe abordarse al diseñar nuevas secuencias.

En este capítulo se presenta el análisis estructural, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica e interacción con membranas de los PAMs diseñados. La utilización de diversas técnicas ha permitido hacer un análisis exhaustivo de las secuencias, llegando a hipotetizar un posible mecanismo de acción para algunos de nuestros PAMs.

MATERIAES Y METODOS

Diseño de los péptidos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) utilizados en este trabajo fueron diseñados en nuestro laboratorio por el Dr. Paulo Maffía. Para ello, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de PAMs naturales producidos por diferentes organismos o péptidos de defensa, que se encuentran en las bases de datos públicas [72,73], buscando regiones conservadas o regiones de conocida actividad antimicrobiana. Se establecieron posiciones específicas de aminoácidos y se identificaron motivos funcionalmente relevantes en péptidos naturales o diseñados. Luego, se realizaron combinaciones y/o modificaciones de dichas regiones con el objetivo de obtener péptidos catiónicos cortos, con posibilidad de estructurarse en hélice alfa y formar una estructura anfipática. De esta manera se obtuvieron 5 secuencias nuevas (P1, P2, P3, P4 y P5) que fueron enviadas a sintetizar a la empresa Genscript Inc. (USA). La síntesis se realizó mediante síntesis en fase sólida y purificación mayor a 95%. Estas 5 nuevas moléculas se evaluaron en cuanto a su actividad antimicrobiana en un panel de más de 80 cepas Gram-positivas y Gram-negativas con diferentes tipos de mecanismos de resistencia a los antibióticos (Anexo I), en colaboración con el Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Dr. C. Malbrán” [74–77]. A partir de P1, P2 y P5 se diseñaron las nuevas secuencias que se utilizaron en este trabajo.

Análisis de propiedades fisicoquímicas

Para el análisis de carga neta, momento hidrofóbico, hidrofobicidad, punto isoeléctrico y peso molecular se utilizaron programas simuladores de propiedades fisicoquímicas como Heliquist [78,79], Agadir [80], Expasy [81]. La hidrofobicidad media (H) y el momento hidrofóbico medio (μH) se calcularon a partir de las secuencias de aminoácidos, utilizando la escala de hidrofobicidad Eisenberg.

Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular

El contenido de estructura secundaria se estudió junto al Dr. Martin Noguera mediante espectroscopia de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano, utilizando un equipo JASCO J 810 (Jasco Corp., Tokio, Japón) calibrado con ácido *d*-10-canforsulfónico. Las mediciones se llevaron a cabo bajo un flujo de nitrógeno gaseoso de 8 l/h a una temperatura de 20 °C, controlado por un sistema Peltier (JASCO). Los espectros se registraron entre 185 y 320 nm, utilizando 0,1 cm longitud de la trayectoria de la celda. Los péptidos se evaluaron en concentración de 40 µM, utilizando como solvente buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 o en el mismo buffer con dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM. La sensibilidad fue de 100 miligrados. Se utilizó velocidad de barrido de 50 nm/min, tiempo de respuesta de 1 segundo, y ancho de banda de 1nm. Se realizó un promedio de cinco espectros para cada muestra. La absorción media se corrigió por buffer de línea de base y luego a cero utilizando el promedio de las lecturas de entre 290 y 320 nm. Finalmente, los datos fueron suavizados utilizando un polinomio GolaySavizky de cuarto grado, con una ventana de diez puntos. Los espectros se convirtieron en elipticidad molar media por residuo utilizando la relación: $[\theta] = \theta / (10 * c * n * d)$, donde “[θ]” es la elipticidad molar (en grados * cm² * dmol⁻¹), “θ” la elipticidad en miligrados, “n” es el número de residuos del péptido, “c” su concentración molar, y “d” la longitud de la celda en centímetros. El porcentaje de hélice alfa (o contenido helicoidal) fue calculado mediante la siguiente ecuación [82]:

$$\%HA = [(\theta_{222} + 2000) \times 100] / (-30000); \text{ donde } \theta_{222} \text{ es la señal de DC a 222nm.}$$

Evaluación de actividad hemolítica

Como medida de toxicidad se evaluó la actividad hemolítica de los péptidos en eritrocitos de sangre murina. Con el ratón anestesiado (ketamina 50 mg/k y xilacina 10 mg/k), se realizó un corte con bisturí en la base de la cola y se

recolectó la sangre por goteo en un microtubo de 1,5ml con heparina (protocolo aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL, de la UNQ). La muestra fue lavada tres veces con solución fisiológica y centrifugando a 1250 rpm por 10 minutos. Luego se midió el volumen del *pellet*, se resuspendió en solución fisiológica (S.F.) realizando una dilución 1/10 y se conservó en frío.

El ensayo de hemólisis de eritrocitos se realizó según [83]. Brevemente, en placas de 96 pocillos con fondo en “U”, se realizaron diluciones seriadas al medio de los péptidos en solución fisiológica, obteniendo 8 concentraciones diferentes en el rango de 8 µg/ml a 1024µg/ml. Luego se agregó la suspensión de eritrocitos realizando una dilución al décimo al sembrar, quedando en la placa una suspensión de eritrocitos al 1 % en volumen final de 200 µl por pocillo. Como control de hemólisis basal se utilizó solución fisiológica, en tanto que para el control de hemólisis máxima se utilizó agua destilada (100% de hemólisis). La placa se agitó brevemente para homogenizar y se incubó a 37° C durante 30 minutos. Luego se centrifugó 10 minutos a 2.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Finalmente se midió absorbancia a 540nm en el equipo *Cytation 5 Imagine Reader* de *BioTec Instrument*.

Determinación de concentración inhibitoria mínima

Se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los péptidos por el método de microdilución en caldo, según normas del CLSI [84]. En placas de 96 pocillos se prepararon diluciones seriadas al medio de cada antimicrobiano, en medio de cultivo Mueller Hinton ajustado con cationes (MHAC): Ca²⁺ (25 mg/l) y Mg²⁺ (12,5 mg/l). Se evaluaron diluciones seriadas a medio de los péptidos, en un rango de 1024µg/ml a 8µg/ml. Luego se agregó el inóculo bacteriano ajustado por medición de densidad óptica a 600nm, de forma tal de obtener 5x10⁵ UFC/ml en la placa, en un volumen final de 100µl/pocillo. La placa se incubó a 37°C por 20 hs y

el resultado de la CIM se definió como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible. En cada placa se utilizó medio de cultivo sin inocular como control de esterilidad y medio de cultivo inoculado sin antimicrobiano como control de crecimiento. También se utilizaron antibióticos con CIM conocida para cada cepa, como control del ensayo: tobramicina para *P.aeruginosa* PAO1 (0,2µg/ml), vancomicina para *S. aureus* ATCC25923 (1µg/ml), tobramicina y gentamicina para *P. aeruginosa* M13513 (1µg/ml y 2µg/ml respectivamente). En cada ensayo, el inóculo bacteriano fue corroborado por recuento de UFC/ml.

Microscopía electrónica de barrido

Para preparar las muestras para la realización de la microscopía electrónica de barrido (MEB) las bacterias fueron crecidas en medio LB hasta fase exponencial. Luego el cultivo fue centrifugado a 1.000rpm durante 10 minutos, el precipitado fue lavado dos veces con solución fisiológica, resuspendido y ajustado por medición de absorbancia a DO_{600nm} : 0,2. Alícuotas de la suspensión bacteriana se incubaron a 37 °C durante 1h con los PAMs en sus valores de CIM. Luego de la incubación, las células se centrifugaron a 5.000rpm por 5 minutos y los precipitados fueron lavados tres veces con solución fisiológica y fijados con glutaraldehído al 2,5% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron dos lavados en las mismas condiciones de centrifugación descriptas previamente y, luego, las células se montaron en un cubreobjetos y dejándose secar al aire libre. Posteriormente, se procedió a deshidratar las muestras con una serie graduada de etanol (50%, 70%, 90% y 100%) y acetona al 100%. Finalmente, las muestras se metalizaron con oro y se examinaron con el microscopio Carl Zeiss NTS SUPRA 40 en el Centro de Microscopia Electrónica Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Mediciones de espectroscopía de fluorescencia

Dado que los péptidos P5, P8 y P8.1 contienen 2 residuos de triptófano cada uno, las técnicas de fluorescencia son herramientas adecuadas para el análisis de estas moléculas. Los estudios de partición de membrana y disminución (*quenching*) de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Mulgrave, Australia). La caracterización espectral de fluorescencia de péptidos y Trp se realizó a una longitud de onda de excitación de 280 nm, a excepción de los experimentos de *quenching* que se realizaron a 290 nm para minimizar la relación relativa de absorción de luz de extintor/fluoróforo. Para los experimentos de *quenching*, la emisión de fluorescencia se recogió a 350 nm (longitud de onda fija). Para los estudios de partición, se utilizaron espectros integrados de 310 a 450 nm. Los anchos de banda espectrales típicos fueron 5 nm para la excitación y 10 nm para la emisión. Los espectros de excitación y emisión se corrigieron para factores instrumentales dependientes de la longitud de onda [85,86]. Durante los experimentos de enfriamiento y partición, la emisión también se corrigió por diluciones sucesivas, dispersión y absorciones de luz simultáneas de extintor y fluoróforo [86].

Determinación del coeficiente de partición

Las vesículas unilamelares grandes (LUVs) fueron preparadas por métodos de extrusión, como se describe en [87,88]. Los estudios de partición de membrana se realizaron mediante adiciones sucesivas de pequeñas cantidades de diferentes sistemas de lípidos a una solución de péptido 5 M, con 10 minutos de incubación a 25 °C. Los sistemas de lípidos incluyeron DMPC y DMPC:DMPG (5:1) para imitar la membrana bacteriana [89]. Los coeficientes de partición (K_p) se calcularon ajustando los datos experimentales en la ecuación [90]:

$$\frac{I}{I_W} = \frac{1 + K_p \gamma_L \frac{I}{I_W} [L]}{1 + K_p \gamma_L [L]}$$

donde I_W e I_L son las intensidades de fluorescencia en solución acuosa y en lípidos, respectivamente, L es el volumen molar del lípido [91] y $[L]$ su concentración.

Presión de superficie

Los cambios en la presión superficial de las monocapas lipídicas inducidas por los péptidos 5, 8 y 8.1 se midieron en un comedero Kibron Langmuir-Blodgett, a temperatura constante (25 ± 0.5 ° C). La superficie del contenedor del buffer, un recipiente de teflón de área fija, se limpió exhaustivamente por aspiración superficial. Luego, se extendió una solución de lípidos de cloroformo sobre esta superficie para alcanzar presiones superficiales de $20,5 \pm 1$ mN / m. Se inyectaron soluciones peptídicas en la subfase y se registraron los cambios de presión superficial hasta que se alcanzó un valor constante. Los datos de presión obtenidos se ajustaron con la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{\Delta\Pi}{\Delta\Pi_{max}} = \frac{[péptido]^n}{K_d + [péptido]^n}$$

donde θ corresponde al grado de cobertura, $\Delta\Pi$ es el cambio de presión superficial, $[péptido]$ es la concentración de péptido, n es el parámetro de heterogeneidad que describe el ancho de la distribución de energía y K_d es la constante de disociación.

Cambios de potencial de membrana de eritrocitos humanos evaluado por di-8-ANEPPS

Se obtuvieron muestras de sangre humana de voluntarios sanos, con su previo consentimiento informado por escrito. El aislamiento de los eritrocitos y el marcado de estas células con di-8-ANEPPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) se realizaron tal como se describió anteriormente [92,93]. Para el aislamiento de los eritrocitos, las muestras de sangre se centrifugaron a $1200 \times g$ durante 10

minutos, se retiró el plasma y leucitos, y el pellet de eritrocitos se lavó dos veces en el buffer de trabajo. Los eritrocitos al 1% se incubaron en buffer fosfato suplementado con 0,05% (p/v) de Pluronic F-127 (Sigma) y di-8-ANEPPS 10M. Las células se incubaron con la sonda fluorescente durante 1 h, con agitación suave, y la sonda libre se lavó con buffer libre de Pluronic en dos ciclos de centrifugación. Los péptidos P5, P8 y P8.1 se incubaron con eritrocitos al 0,02% durante 1 h, con agitación suave, antes de las mediciones de fluorescencia. Los espectros de excitación y la relación de intensidades en las longitudes de onda de excitación de 455 y 525 nm ($R = I_{455} / I_{525}$) se obtuvieron con la emisión establecida a 670 nm para evitar artefactos relacionados con la fluidez de la membrana [94,95]. Las ventanas de excitación y emisión para estas mediciones se ajustaron a 5 y 10 nm, respectivamente. La variación de R con la concentración de péptido se analizó mediante un modelo de sitio de unión único [96]:

$$\frac{R}{R_0} = 1 + \frac{\frac{R_{min}}{R_0} [péptido]}{K_d + [péptido]}$$

con los valores R normalizados para R_0 (el valor en ausencia de péptido), R_{min} define el valor mínimo asintótico de R y K_d es la constante de disociación.

Disminución de fluorescencia por acrilamida

El *quenching* de fluorescencia de péptidos (5 M) por acrilamida se midió en buffer y en presencia de LUVs de DMPC:DMPG (5:1) (3 mM), mediante adiciones sucesivas de pequeños volúmenes de la solución madre de acrilamida, que van desde 0 a 60 mM [97]. Cada espectro se registró después de 10 minutos de incubación. Los datos de quenching se analizaron utilizando la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \times [Q]$$

Donde I e I_0 son las intensidades de fluorescencia de la muestra en presencia y ausencia de extintor (*quencher*) respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y $[Q]$ es la concentración de *quencher*.

Quenching de fluorescencia por 5NS y 16NS

Los ensayos de disminución de fluorescencia con las sondas lipofílicas 5NS y 16NS se llevaron a cabo con péptidos en 5M y lípidos en 3mM. Se realizaron adiciones sucesivas de pequeñas cantidades de ambas sondas en solución de etanol a las muestras de péptidos en DMPC:DMPG (5:1), manteniendo la concentración de etanol por debajo del 2% (v/v). La concentración efectiva de sonda en la membrana se calculó a partir del coeficiente de reparto de ambas sondas en las bicapas lipídicas. Después de cada adición de sonda, las muestras se incubaron durante 10 minutos antes de la medición. Los datos de *quenching* se analizaron utilizando la ecuación de Stern-Volmer (ecuación A) o la ecuación de Lehrer (ecuación B) cuando se observa una desviación negativa de la relación de Stern-Volmer [98,99].

$$A) \quad \frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \times [Q]$$

$$B) \quad \frac{I_0}{I} = \frac{1 + K_{SV}[Q]}{(1 + K_{SV}[Q])(1 - f_b) + f_b}$$

RESULTADOS

Modificación de secuencias y análisis de estructura

Para este trabajo de tesis doctoral, a partir de la primera serie de péptidos diseñados se seleccionaron tres secuencias con actividad frente a la mayoría de las cepas evaluadas, a saber: P1, P2 y P5. A estas secuencias originales se les realizaron cambios aminoacídicos específicos con el objetivo de obtener secuencias con mejorada actividad antimicrobiana y menor actividad hemolítica. Las modificaciones en las secuencias peptídicas se realizaron en función de los siguientes criterios:

Los cambios realizados en P1 fueron el reemplazo de tres lisinas (K) en posiciones 8, 15 y 18 por aminoácidos hidrofóbicos, con el objeto de aumentar la anfipaticidad, obteniéndose la secuencia P7.

P1: WPKWWKWKRRWGRKKAKKRRG

P7: WPKWWKWLRRWGRKFAKLRRG

En la secuencia P2 se realizaron 2 modificaciones tomando como referencia el trabajo de S.H Lee et al. [82], en donde identifican que el aminoácido triptófano (W) en posición 4 y 8 en este tipo de péptidos catiónicos mejora la actividad antimicrobiana. Los otros dos cambios realizados en esta secuencia se realizaron de acuerdo al trabajo de Zelezetsky et al.[100] en donde se propone el cambio de glicina (G) en posición 7 y leucina (L) en posición 14, para mejorar también la actividad y disminuir la toxicidad. De esta manera se obtuvo la secuencia P6. A partir de esta secuencia se realizaron sustituciones específicas para mejorar la anfipaticidad y se obtuvieron las secuencias P6.1 y P6.2 (ver Figura 5).

P2: GLLKKWLKKWKEFKRIVGY

P6: GLLWKWGKWKKEFLRIVGY

P6.1: GLLDKWGQKWKEFLRKVWE

P6.2: GLLRKWGGKKWKEFLRRVWK

En P5 se realizó solamente una redistribución de la posición de 2 aminoácidos, sin modificar el tipo de aminoácidos de la secuencia. Se cambiaron las lisinas de las posiciones 7 y 14, por una leucina y una tirosina que antes estaban en la posición 11 y 18, respectivamente. Estas modificaciones dieron origen a la secuencia P8. Como se puede apreciar en el gráfico de *helical wheel*, en esta secuencia se crean dos caras bien diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica cuando el péptido se estructura como alfa hélice. Luego, a partir de P8, se diseñó un nuevo PAM reemplazando las tres leucinas (L) de la secuencia por alaninas (A), con el objetivo de disminuir la hemólisis, de acuerdo al trabajo publicado por Yin LM et al.[101]. Este último péptido se llamó P8.1.



En la Figura 5 se presentan los tres péptidos seleccionados inicialmente y las nuevas secuencias originadas a partir de ellos, en proyecciones de rueda helicoidal (*helical wheel*). Estas imágenes corresponden a una representación gráfica de los PAMs estructurados en hélice alfa, vistos desde uno de los extremos. En estas figuras se representan los aminoácidos con códigos de colores de acuerdo a su polaridad y carga. Esto nos permite ver de forma rápida el tipo de aminoácidos que tiene cada molécula, así como la distribución espacial que éstos adoptan en la estructura secundaria. Aquellos péptidos que poseen los aminoácidos hidrofílicos segregados espacialmente de los hidrofóbicos, constituyen moléculas anfipáticas. Esta característica es muy importante para la actividad de los péptidos y puede evaluarse analizando el momento hidrofóbico (μH), evidenciado en los gráficos de *helical wheel* con una flecha vertical ubicada dentro de la rueda de cada péptido. Es importante recalcar que cuanto mayor es el momento hidrofóbico de una molécula, mayor es el carácter anfipático de ésta.

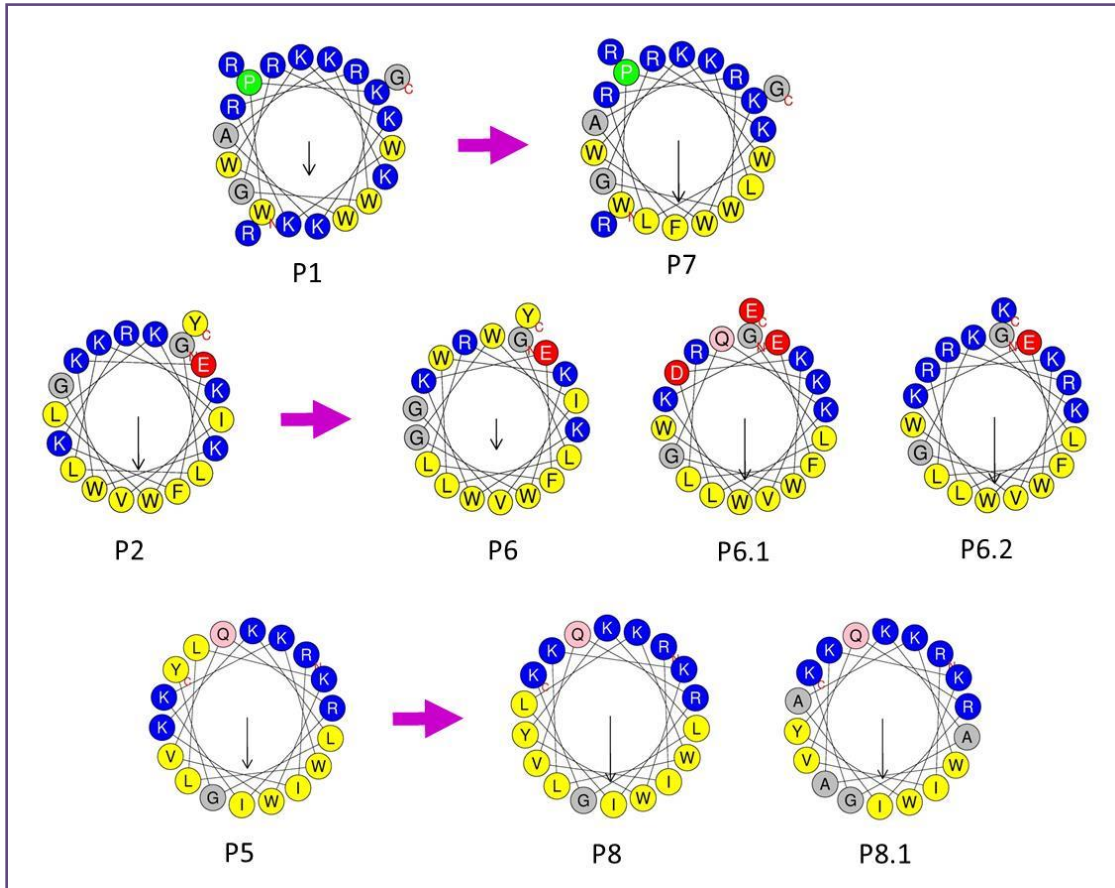


Figura 5 – PAMs representados en proyecciones en rueda helicoidal o “*helical wheel*”. Se muestran los tres PAMs originales (P1, P2 y P5) y los subsiguientes péptidos obtenidos a partir de las modificaciones. Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color amarillo y los hidrofílicos en rojo (carga neta negativa) y azul (carga neta positiva). Las flechas verticales representan el momento hidrofóbico de cada péptido.

Análisis de parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 1 se presentan los parámetros fisicoquímicos simulados *in silico* de los péptidos originales y sus nuevas versiones. Se presentan datos de peso molecular, punto isoeléctrico, carga neta, momento hidrofóbico e hidrofobicidad. Cabe destacar que, a diferencia del momento hidrofóbico, la hidrofobicidad hace referencia solamente a la cantidad y calidad de aminoácidos hidrofóbicos presentes en la secuencia independientemente de su ubicación espacial.

Como puede observarse en la columna “ μH ”, la mayoría de las secuencias nuevas presentaron aumento del momento hidrofóbico. Los cambios más

importantes se observaron, por un lado en P1, cuya nueva versión (P7) casi duplicó el valor de μH . Por otra parte, para P6, el momento hidrofóbico se redujo a la mitad al realizar las sustituciones. Este fenómeno puede observarse también en la Figura 5, donde los cambios se representan por la variación en el tamaño de las flechas verticales.

Péptido	Parámetros fisicoquímicos				
	PM*	pI*	CN**	μH **	H**
<i>Péptidos originales</i>					
P1	2909,54	12,61	12	0,389	0,014
P2	2421,02	10,39	6	0,622	0,409
P5	2356,98	11,26	7	0,58	0,455
<i>Péptidos modificados</i>					
P7	2898,51	12,61	9	0,705	0,403
P6	2465,97	10,00	3	0,363	0,803
P6.1	2446,88	9,53	2	0,728	0,401
P6.2	2515,09	11,75	7	0,793	0,328
P8	2356,98	11,26	7	0,741	0,455
P8.1	2330,73	11,26	7	0,681	0,223

Tabla 1 – Parámetros fisicoquímicos simulados por programas computacionales. PM: peso molecular (daltons), pI: punto isoeléctrico, CN: carga neta, μH : momento hidrofóbico, H: hidrofobicidad. * Según ExPASy; ** Según Heliquest.

En el caso de las modificaciones de P5, es importante destacar que P8 se obtuvo al intercambiar la posición de cuatro aminoácidos, dos hidrofóbicos y dos hidrofílicos; lo cual no produjo modificaciones en la hidrofobicidad (H), pero sí en el momento hidrofóbico (μH). Por otra parte, P8.1 que se obtuvo reemplazando las tres L de P8 por A, bajó la H pero mantuvo el μH elevado.

Todos los péptidos mantuvieron carga neta positiva elevada, menos en el caso de P6 y P6.1. En el primero se siguieron modificaciones descritas como mejoradoras por otros autores, en tanto que en el segundo se incluyeron aminoácidos con carga negativa que disminuyeron la carga neta de la molécula.

La propiedad de carga neta positiva es una característica importante relacionada a la actividad antimicrobiana, ya que es responsable de las interacciones electrostáticas que promueven el primer acercamiento entre los péptidos y las membranas bacterianas (carga neta negativa).

El punto isoeléctrico también se mantuvo elevado en todas las nuevas versiones, lo que resulta favorable a la estabilidad de la carga positiva del antimicrobiano en condiciones fisiológicas.

Estudio de estructura secundaria por dicroísmo circular en el UV lejano

Otra característica importante de algunos péptidos antimicrobianos es la capacidad de estructurarse en α -hélice. Sin embargo, ésta no es una regla universal para todos los péptidos catiónicos. Los PAMs, en general, carecen de estructura cuando están en solución y solo adoptan una conformación estable en contacto con las membranas o con superficies que imiten las características de las mismas.

El análisis de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano es una técnica que permite identificar la presencia de estructura secundaria en una secuencia peptídica. En colaboración con el Dr. Martín Noguera, del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas de la Universidad de Buenos Aires, realizamos ensayos de DC de los péptidos diseñados. Se analizó el espectro de cada PAM en solución y se comparó la señal con la observada en presencia de SDS, un detergente que imita el contacto con la bicapa lipídica.

En la Figura 6 se presentan los espectros de DC de los péptidos parentales y sus variantes modificadas. Como puede verse claramente, en ausencia de SDS (panel izquierdo) no hay registro de señal de dicroísmo circular, lo que indica que los péptidos no presentan estructura secundaria. Por el contrario, en presencia de SDS (panel derecho), todos los péptidos presentaron bandas de señal características de la estructura hélice alfa. La misma se caracteriza por la presencia de una banda de señal positiva a los 190nm y dos bandas de señal negativa a los 208nm y 222nm. Esto se vio incluso para P7, cuya versión original

(P1) no tenía estructura secundaria claramente definida. El cambio más notable se observa en el caso de P8.1. Esta nueva versión presentó la banda de señal positiva con mayor intensidad alrededor de los 190 nm y las dos bandas de señal más negativa alrededor de los 208 y 222 nm.

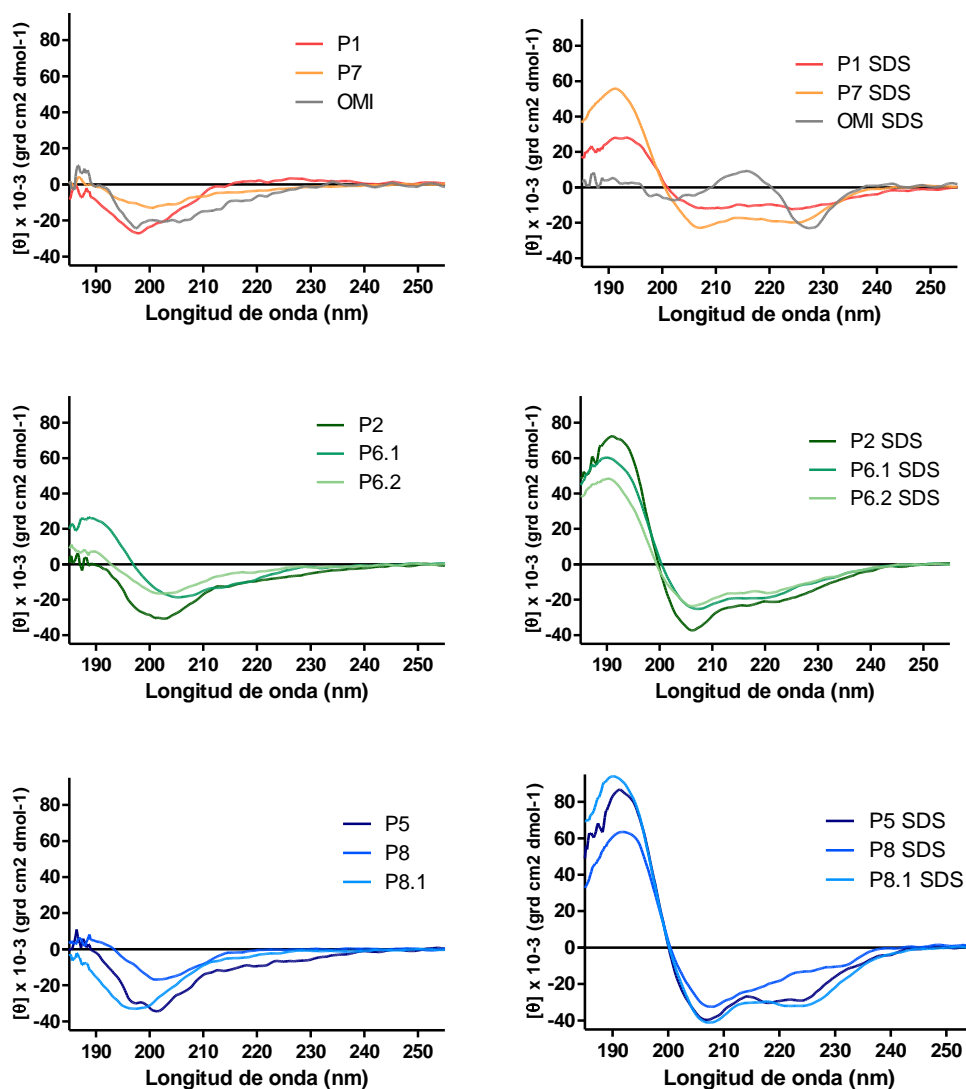


Figura 6 - Espectro de dicroísmo circular de los péptidos parentales y sus nuevas versiones. Izquierda: péptidos en solución, derecha: péptidos en SDS. En ambos casos se incluyó el péptido Omiganan

Con el objetivo de comparar la señal de DC con un péptido antimicrobiano de estructura diferente, se analizó el péptido omiganan, cuya estructura secundaria

es lámina beta. Este péptido catiónico es un derivado de la indolicidina que fue originalmente purificado de granulocitos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos; y está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase 3 [102]. En este caso, el espectro de DC presenta variaciones en presencia y ausencia de SDS, pero las bandas de señal parecieran corresponder a las típicamente esperadas para péptidos con estructura lámina beta. En este tipo de estructuras se suele observar una pequeña banda de señal negativa cercana a los 217nm y una banda positiva cercana a los 195nm. Sin embargo, estas estructuras presentan señales de menor intensidad y con variación mucho mayor que las hélices alfa. Esto se debe a que las láminas beta forman estructuras proteicas más diversas, ya que las hebras se pueden ubicar en forma paralela o antiparalela y las láminas adoptar diferentes grados de torsión que modifican las características de los espectros de DC en el UV lejano.

No fue posible realizar el espectro de DC de P6 debido a que esta secuencia presentó problemas de solubilidad en las condiciones necesarias para el ensayo.

A partir de la señal observada a 222nm en los espectros de DC es posible calcular un porcentaje de helipticidad de la molécula. En la siguiente tabla se presentan los porcentajes de hélice alfa obtenidos para nuestros PAMs y omiganan.

Péptido	P1	P2	P5	OMI	P7	P6,1	P6,2	P8	P8,1
% helix SDS	28	64	88	10	57	53	46	42	100

Tabla 2 - Calculado según[82]: % helix = $(\theta_{222} \times 1000 + 2000)/30000 \times 100$

Según este análisis, y tal como se esperaba de acuerdo a lo observado en los espectros, los péptidos con mayor porcentaje de hélice alfa son P5 y una de sus nuevas versiones, el P8.1.

Actividad hemolítica

Los PAMs ejercen su actividad, principalmente, por la interacción con membranas. Uno de los desafíos más complejos a la hora de diseñar péptidos

antimicrobianos es lograr que una molécula tenga actividad selectiva sobre membranas de tipo procariota y que no sea tóxica para células eucariotas.

Una forma de evaluar la capacidad de los PAMs de interactuar con membranas eucariotas y producir su lisis, es mediante ensayos de hemólisis de eritrocitos. En estos ensayos todos los péptidos fueron incubados a 37°C durante 1 hora con una suspensión de eritrocitos murinos al 1%. Luego las muestras fueron centrifugadas y se midió la absorbancia del sobrenadante a 570nm. La cantidad de hemoglobina liberada, medida por absorbancia, es proporcional al número de eritrocitos lisados o al daño producido en su membrana. En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos, representados como porcentaje de hemólisis respecto del control positivo (se usó H₂O destilada, cuyo valor fue tomado como el 100% de hemólisis); vs. concentración de PAM.

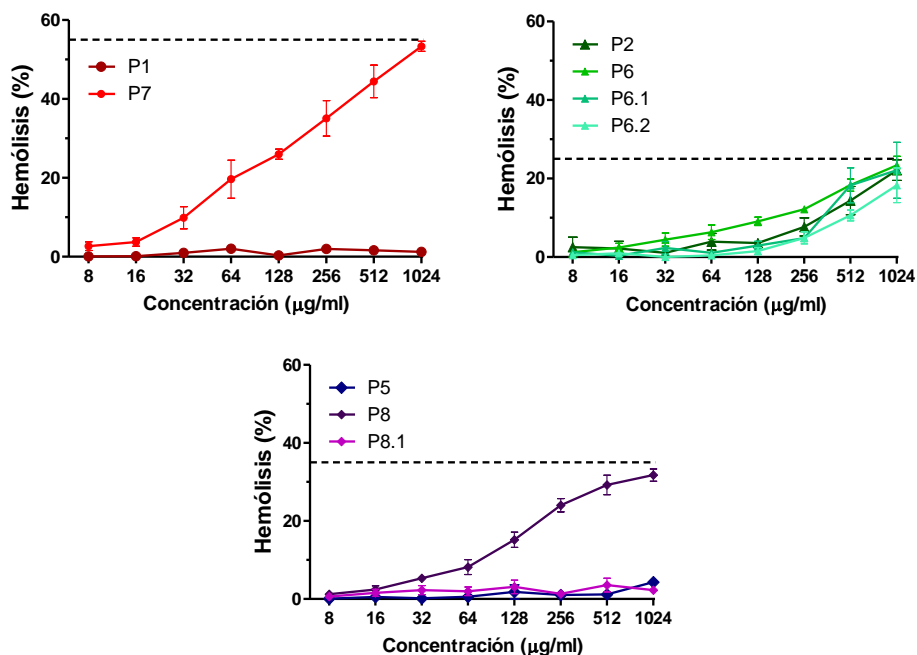


Figura 7 – Actividad hemolítica en eritrocitos murinos en función de la concentración de PAM

Para P1 se obtuvieron porcentajes de hemólisis inferiores al 5% en todas las concentraciones evaluadas, en contraste con P7 cuyos valores aumentan rápidamente a medida que aumenta la concentración del PAM, llegando a valores cercanos al 55% en 1024µg/ml.

En el caso de P2 y sus versiones modificadas, todos presentan un comportamiento similar, con aumento de la actividad hemolítica en función de la concentración, alcanzando valores cercanos al 25% en la concentración más elevada.

En la familia de P5, tanto este PAM como su derivado P8.1 mantuvieron valores de hemólisis inferiores al 5% en todas las concentraciones evaluadas. Por el contrario, P8 presentó actividad hemolítica dependiente de la concentración con valores cercanos al 35% para 1024 µg/ml.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los péptidos fue evaluada por el método de microdilución en caldo frente a dos cepas de referencia y un aislamiento clínico con resistencia a carbapenemes, utilizando como control del ensayo seis antibióticos de uso habitual en la práctica clínica (tablas 3 y 4). En estos ensayos se pudo determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada PAM frente a las distintas cepas. Todos los péptidos fueron evaluados frente *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Los PAMs P1, P5, P8.1 y P6.2 fueron seleccionados en base a su baja toxicidad y buena actividad antimicrobiana (menor valor de CIM) para ser evaluados también frente al aislamiento clínico. Se trabajó con la cepa *P. aeruginosa* M13513, productora de carbapenemasa tipo KPC, que fue aislada en el año 2011 y corresponde a un brote ocurrido en la ciudad de Bariloche. Pertenece al secuenciotipo ST654 que contiene el gen *bla_{KPC-2}* en el transposon *Tn4401b* dentro de un plásmido de 50kb. La cepa M13513 es resistente a meropenem, imipenem, ceftazidima y ciprofloxacina, y sensible a gentamicina, tobramicina y amikacina[103].

Al comparar los nuevos péptidos (P7, P8, P8.1, P6, P6.1 y P6.2) con sus versiones parentales (P1, P5 y P2, respectivamente) se puede observar que frente a PAO1, solo P6.2 habría mejorado la actividad ya que redujo una dilución el rango de CIM. Sin embargo, como el error del método se considera +/- 1 dilución, no puede afirmarse que se trate de una mejora significativa. En cuanto a *S. aureus*

ATCC25923, ningún péptido mejoró la actividad. Es importante tener en cuenta que a pesar de que ninguna modificación permitió mejorar la actividad antimicrobiana, los valores de CIM de los péptidos parentales son relativamente bajos y en la mayoría de los casos se obtuvieron péptidos nuevos que conservaron la actividad antimicrobiana. La única excepción es el P6 cuyas modificaciones de secuencia derivaron en pérdida total de actividad frente a ambas cepas de referencia.

Cepa	P1	P7	P5	P8	P8.1	P2	P6	P6.1	P6.2	omiganan
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	32/64	32/64	64/128	32/64	64/128	32/64	>1024	>1024	16/32	ND
<i>S. aureus</i> ATCC25923	16/32	16/32	8/16	16/32	128/256	32	>1024	128	32	32
<i>P. aeruginosa</i> M13513	32/64	ND	32/64	ND	64/128	ND	ND	ND	32/64	256

Tabla 3 – Concentración inhibitoria mínima de los PAMs. Los valores de CIM representan un rango promedio de 5 ensayos. ND: no determinado.

Cepa	tobramicina	vancomicina	meropenem	imipenem	gentamicina
<i>Pae.PAO1</i>	0,2	ND	ND	ND	ND
<i>Sau. ATCC25923</i>	ND	1	ND	ND	ND
<i>Pae.M13513</i>	1	ND	512/1024	256/512	2

Tabla 4 – Concentración inhibitoria mínima de antibióticos habituales. Los valores de CIM representan un rango promedio de 5 repeticiones. ND: no determinado.

Es interesante destacar que todos los péptidos evaluados frente a *P.aeruginosa* M13513, presentaron valores de CIM en el mismo rango que para las cepas sensibles. Esto destaca la característica más importante de los péptidos antimicrobianos que es su efectividad en cepas multirresistentes frente a las cuales los antibióticos de uso habitual han quedado obsoletos.

A fin de hacer más simple el análisis de los datos de actividad antimicrobiana en combinación con los parámetros fisicoquímicos, contenido de hélice alfa y

actividad hemolítica, en la tabla 5 se presenta un resumen de todos los resultados obtenidos hasta aquí.

Al analizar los datos de carga neta, podemos observar que los péptidos con menor carga neta positiva, como P6 y P6.1, tienen los valores de CIM más elevados, con poca o nula actividad antimicrobiana. Por el contrario, los PAMs con carga neta positiva elevada, ≥ 6 , son activos frente a las tres cepas evaluadas. Estos resultados son concordantes con el mecanismo de acción propuesto para los PAMs, cuyo primer paso consiste en la interacción electrostática entre las cargas negativas de las membranas bacterianas y las cargas positivas de los PAMs.

Péptido	Parámetros fisicoquímicos					Actividad antimicrobiana		
	CN	μ H	H	% HA en SDS	% Hem. Max.	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> M13513
P1	12	0,389	0,014	28	1,25	32/64	16/32	32/64
P7	9	0,705	0,403	57	53,34	32/64	16/32	ND
P2	6	0,622	0,409	64	22,13	32/64	32	ND
P6	3	0,363	0,803	ND	23,39	>1024	>1024	ND
P6.1	2	0,728	0,401	53	22,1	>1024	128	ND
P6.2	7	0,793	0,328	46	18,27	16/32	32	32/64
P5	7	0,58	0,455	88	4,32	64/128	8/16	32/64
P8	7	0,741	0,455	42	31,75	32/64	16/32	ND
P8.1	7	0,681	0,223	100	2,26	64/128	128/256	64/128

Tabla 5 - Comparación de parámetros fisicoquímicos, contenido hélice alfa, actividad hemolítica y antimicrobiana. CN: carga neta, μ H: momento hidrofóbico, H: hidrofobicidad, %HA: porcentaje de hélice alfa, %Hem.Max.: porcentaje de hemólisis máxima.

Por otro lado, cuando analizamos la carga neta con los valores de hemólisis máxima, se puede observar que la carga neta elevada no está relacionada directamente a la hemólisis de eritrocitos murinos. Por ejemplo, P7, con carga neta positiva de 9, tiene hemólisis máxima de 53,34%, pero P1, con carga neta positiva de 12, tiene hemólisis máxima de 1,25%.

En función de lo observado, podemos inferir que la presencia de carga neta positiva elevada, es una característica deseable para un PAM con actividad antimicrobiana. Sin embargo se debe tener presente que la actividad biológica resultante final de un PAM es una compleja interacción de una serie de

características y que es difícil de predecir la acción de un PAM sobre membranas procariotas o eucariotas, lo cual definiría su posible capacidad como agente antibiótico.

Por lo tanto, para el estudio de un parámetro individual en este tipo de moléculas, solamente podríamos realizarlo con un mínimo de certeza en moléculas estrechamente relacionadas, en donde solo generemos la variación en el parámetro a estudiar. Por ejemplo para el caso de P5 y P8, donde solo varían la ubicación de 4 aminoácidos, y el momento hidrofóbico se modifica mientras que la carga neta e hidrofobicidad de estas dos moléculas se mantienen idénticas. En este caso podríamos inferir que el aumento de la anfipaticidad (aumento de momento hidrofóbico) sería el responsable del aumento no deseado de la capacidad de lisar eritrocitos. El aumento de la capacidad hemolítica del P7 con respecto a su secuencia parental P1 también se pudo deber al aumento de la hidrofobicidad y/o del momento hidrofóbico.

Como podemos ver, el desafío en el diseño de estas secuencias es mantener un muy delicado equilibrio entre carga neta, hidrofobicidad y anfipaticidad, tal que permita la interacción efectiva con membranas procariotas, pero no con membranas eucariotas.

Para poder hacer un análisis más detallado y poder echar luz sobre las interacciones de estas moléculas con estos dos tipos de membranas biológicas se realizaron distintos ensayos biofísicos con péptidos antimicrobianos pertenecientes a la misma familia, obteniendo datos relevantes referidos a la anfipaticidad y el momento hidrofóbico y su relevancia en la actividad biológica. De esta manera se buscó poder interpretar y predecir el comportamiento de futuros PAMs y así poseer una herramienta más en el diseño racional para su optimización.

Interacción con membranas por ensayos biofísicos

Con el objetivo de generar nuevo conocimiento de las estructuras moleculares y su interacción, que resulta indispensable para la modificación y diseño de nuevas

secuencias mejoradas, se evaluó la interacción de los PAMs con membranas biológicas por ensayos biofísicos, realizados en colaboración con el Dr. Axel Hollmann del Laboratorio de Biointerfaces y Sistemas Biomiméticos de la Universidad de Santiago del Estero. Por medio de ensayos de fluorescencia, medición de potencial de membrana y presión de superficie, entre otros, se comparó el comportamiento de diferentes péptidos de una misma familia, es decir, péptidos diseñados a partir del mismo péptido parental. De esta forma, fue posible hacer un análisis comparativo de las características de los PAMs que tienen cierta homología en la identidad de secuencia.

Para el análisis de la interacción con membranas se utilizaron dos membranas modelo: DMPC y DMPC:DMPG. La primera está constituida por el lípido zwitteriónico dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Este lípido genera membranas con carga neutra e intenta simular las características de una membrana de tipo eucariota. La segunda membrana modelo se obtuvo con una mezcla 5:1 del mismo lípido zwitteriónico (DMPC) y otro con carga negativa: dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Esta combinación genera membranas con carga negativa, e intenta simular las características de las membranas bacterianas, cuya carga neta superficial es negativa. Estos modelos de membrana están ampliamente caracterizados y se utilizan habitualmente como modelos de membranas eucariotas y bacterianas, respectivamente.

Para este análisis se trabajó con el péptido P5 y sus dos nuevas versiones: P8 y P8.1. Se analizó el rol de la anfipaticidad y la hidrofobicidad en el balance entre la hemólisis y la interacción con membranas.

Mediante ensayos de absorción de luz UV-visible y fluorescencia del triptófano, se analizó la interacción de los PAMs con vesículas unilamelares grandes (LUVs, por sus siglas en inglés). Se pudo determinar que los tres PAMs tienen afinidad por membranas DMPC:DMPG, siendo P8 el que interacciona con más intensidad con este tipo de membranas. Por otra parte, en cuanto a la interacción con LUVs de DMPC, sólo se observó interacción de P5 y P8, mientras que el P8.1

prácticamente no generó alteraciones, o al menos el triptófano no está involucrado en la interacción con este tipo de membranas (Figura 8).

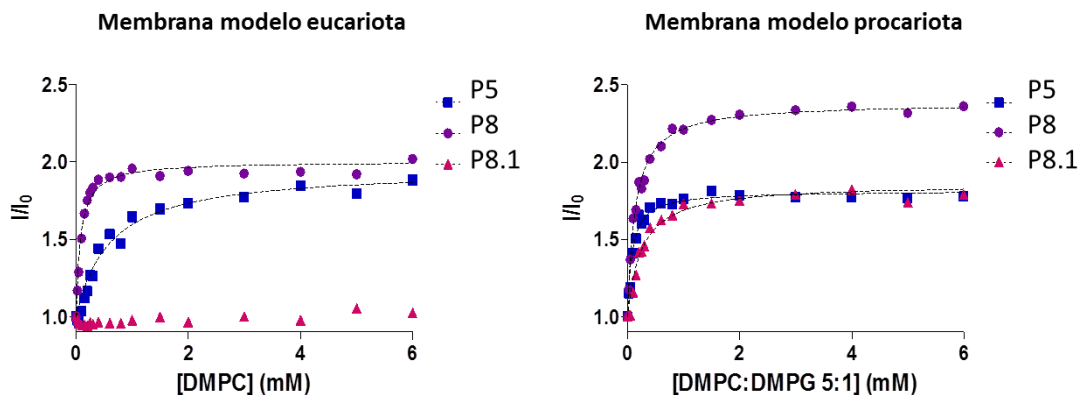


Figura 8 – Estudio de partición de los péptidos en vesículas lipídicas. Variación de la intensidad de fluorescencia del triptófano en función de la adición de LUVs compuestas por DMPC (izquierda) o DMPC:DMPG (derecha). Los valores representados corresponden al promedio +/- DS.

Luego, se realizaron ensayos de perturbación de la presión de superficie sobre monocapas lipídicas (Figura 9). Los tres péptidos fueron capaces de inducir cambios en la presión de superficie de las monocapas DMPC:DMPG, con valores superiores para P8. En cuanto a las monocapas DMPC, P8.1 arrojó valores menores a la mitad de los observados para P5 y P8.

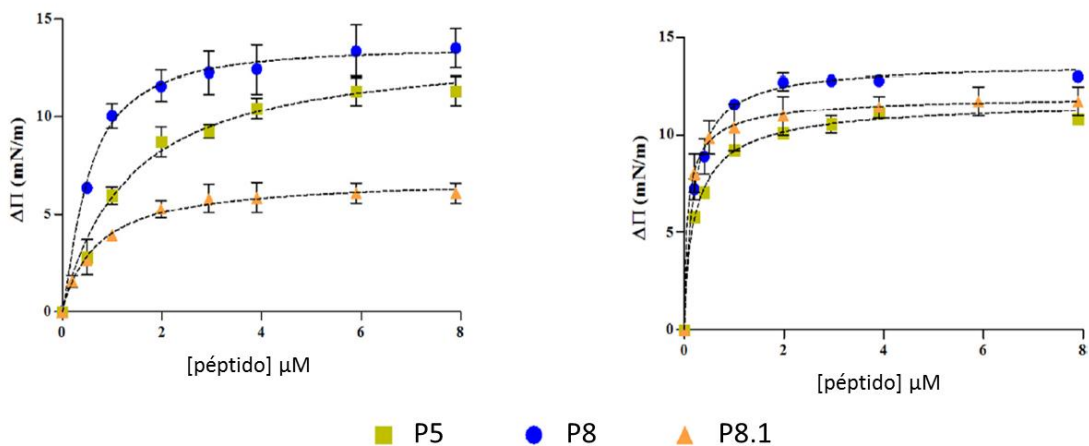


Figura 9 – Interacción de péptidos con monocapas lipídicas. Cambios en la presión de superficie expresados como $\Delta\Pi$ en función de la concentración de péptido, en monocapas DMPC (izquierda) o DMPC:DMPG 5:1 (derecha).

Estos resultados indican que los PAMs evaluados podrían interactuar tanto con membranas de tipo bacteriano como eucariota, sin embargo P8.1 tendría la menor selectividad por membranas eucariotas y P8 la mayor afinidad por membranas eucariotas y procariotas. Los datos concuerdan con lo observado en ensayos de hemólisis y actividad antimicrobiana.

Estos tres péptidos tienen igual punto isoeléctrico y carga neta, además P8 y P5 incluso tienen la misma hidrofobicidad. Los cambios realizados para obtener P8 generaron una molécula con mayor momento hidrofóbico, es decir un péptido con mayor anfipaticidad. Este cambio mejoró levemente la actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* PAO1 pero aumentó significativamente la hemólisis. Esto indicaría que el aumento del carácter anfipático de un PAM en moléculas altamente relacionadas, podría traducirse en una mejora de actividad vinculada a la mayor afinidad del péptido por las membranas, siendo este efecto mucho más fuerte en la interacción con membranas zwitteriónicas (tipo eucariotas); lo cual aumenta considerablemente el potencial tóxico del PAM.

Por otra parte, en P8.1, la sustitución de leucinas por alaninas, (aminoácido con menor carácter hidrofóbico) generó una molécula con mayor anfipaticidad que P5 y menor hidrofobicidad general que P5 y P8. Estos cambios, redujeron rotundamente la afinidad de P8.1 por membranas zwitteriónicas, y restauró la afinidad por membranas con carga negativa a los valores obtenidos para P5. Esto podría indicar que en moléculas muy anfipáticas, la reducción de la hidrofobicidad por cambios de aminoácidos con menor carácter hidrofóbico, que no altere la separación espacial de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en la estructura secundaria; resultaría en una disminución de la afinidad de la molécula por membranas zwitteriónicas. Este cambio, permitiría obtener péptidos con menor toxicidad, en concordancia con lo reportado por Yin LM et al. [101].

Finalmente se evaluó la interacción de estos tres PAMs con eritrocitos humanos, midiendo cambios en el potencial de membrana mediante la utilización de la sonda di-8-ANEPPS. Se observó que P8 produjo una gran perturbación de la

misma, en contraste con P5 y P8.1 cuyo efecto fue casi indetectable, nuevamente en correlación con lo observado en los ensayos de hemólisis (Figura 10).

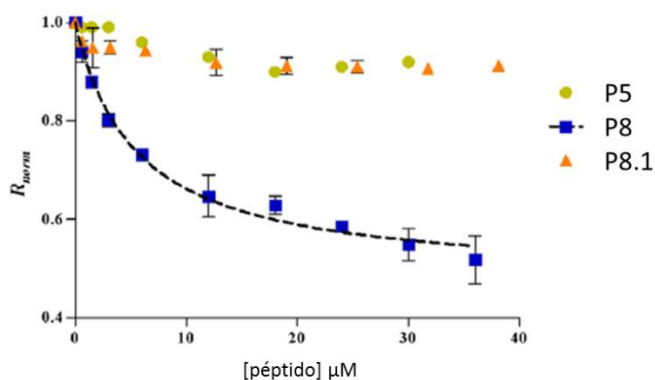


Figura 10 – Perfil de unión de los péptidos a eritrocitos humanos. Se representa la tasa de excitación de la sonda di-8-ANEPPS, $R_{(I_{445}/I_{525})}$, normalizado al valor inicial) en función de la concentración de péptido.

En este trabajo se demostró que los tres péptidos tienen afinidad por membranas negativas, lo cual es esperable debido a la carga positiva de los péptidos. Sin embargo, el hecho de que los péptidos también tengan afinidad por membranas zwitteriónicas indica que las interacciones hidrofóbicas también podrían jugar un rol importante, en conjunto con las interacciones electrostáticas, en el mecanismo por el cual los péptidos se unen a las membranas zwitteriónicas.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar la localización de los péptidos en las bicapas lipídicas, se realizaron ensayos de disminución (*quenching*) de fluorescencia por medio de sondas como 5NS y 16NS. Estas sondas se utilizan para evaluar la profundidad del triptófano insertado en la membrana. Los datos de *quenching* de fluorescencia permitieron la aplicación del método SIMEXDA para obtener la distribución en profundidad de los triptófanos dentro de vesículas DMPC:DMPG. La distancia calculada desde el centro de la bicapa lipídica indica que los tres péptidos están localizados cerca de la interface membrana-agua, con el triptófano insertado cerca de la interface de las cabezas polares de los fosfolípidos. P8 tendría la localización más profunda, encontrándose a 11.2 Å del

centro, en tanto que P5 y P8.1 tendrían una localización menos profunda con distancias al centro mayores a 12 Å (Figura 11, izquierda).

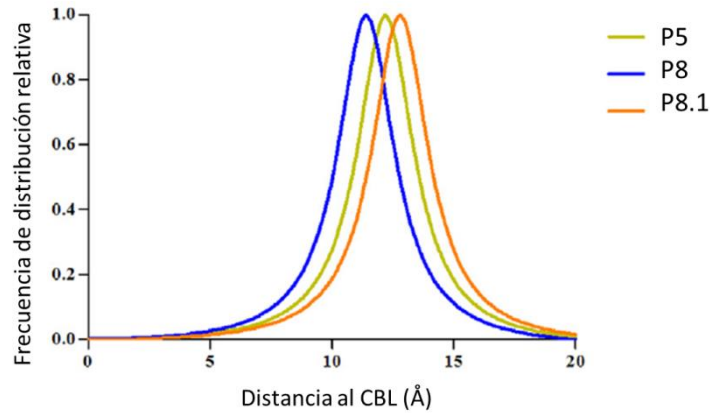


Figura 11 – Frecuencia de distribución de los triptófanos en función de la distancia al centro de la bicapa lipídica (CBL).

A pesar de que los datos de distancia al centro de la bicapa lipídica representan la posición promedio de los dos los triptófanos de cada secuencia, la forma de la curva de distribución de frecuencia (campana angosta, Figura 11, izquierda) indica que estos aminoácidos se encontrarían insertados en una posición similar dentro de la bicapa lipídica. Además, los mismos se encuentran enterrados aproximadamente 8 Å en la membrana, lo que indica una posición del péptido paralelo a la misma. En la figura 12 se representa un esquema de la posición que P5 podría adoptar en contacto con una membrana.

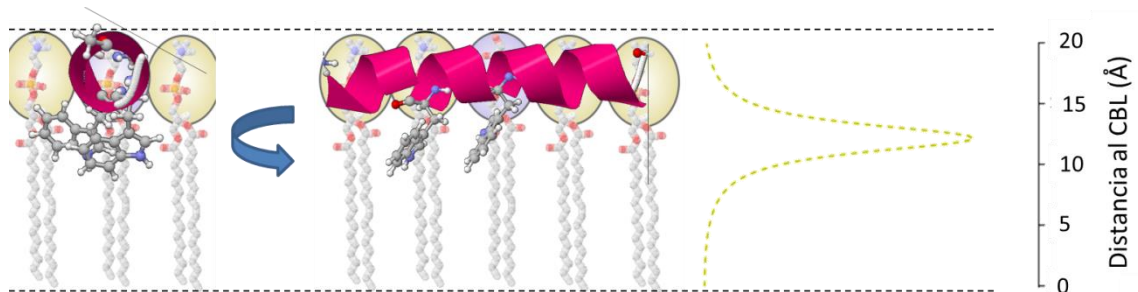


Figura 12 – Representación de P5 en hélice alfa evidenciando los residuos de los triptófanos, realizado con el *software* Jmol (Jmol v. 14.2.9_2014.11.17), sobre la hemicapa lipídica. A la derecha, a escala, se representa la posición promedio de los triptófanos de P5. CBL: centro de la bicapa lipídica.

De acuerdo a estos resultados, podríamos pensar en un modelo de interacción péptido-membrana, en donde los péptidos tendrían un primer acercamiento a las membranas dirigido por interacciones electrostáticas y luego se produciría la conformación en hélice alfa, como muestran nuestros estudios de CD, dejando a los triptófanos en la misma cara de la molécula anfipática. Finalmente, la localización de los residuos de triptófano en la región de la cadena carbonada de la bicapa, estabilizados por el alineamiento paralelo a la membrana, es lo que podría promover cambios en la organización de los lípidos y producir la actividad antimicrobiana (Figura 13).

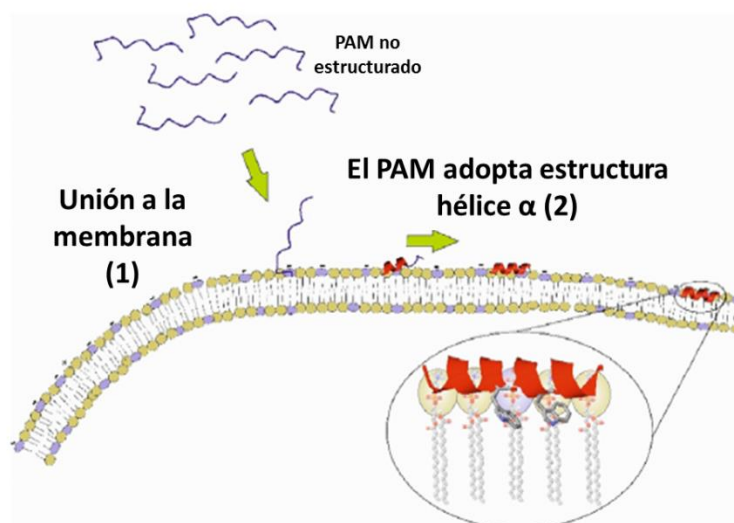


Figura 13 - Esquema de los primeros pasos del posible mecanismo de acción de los PAMs.

Microscopia electrónica de barrido

Con el objetivo de poder visualizar los posibles cambios que se presentan en las membranas bacterianas (de Gram positivas y Gram negativas) se realizaron microscopías electrónicas de barrido (MEB) de *P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* ATCC25923 incubadas por una hora con los PAMs. Las imágenes fueron realizadas en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron bacterias en crecimiento exponencial que fueron incubadas con los péptidos P5 y P8.1 en la concentración de CIM.

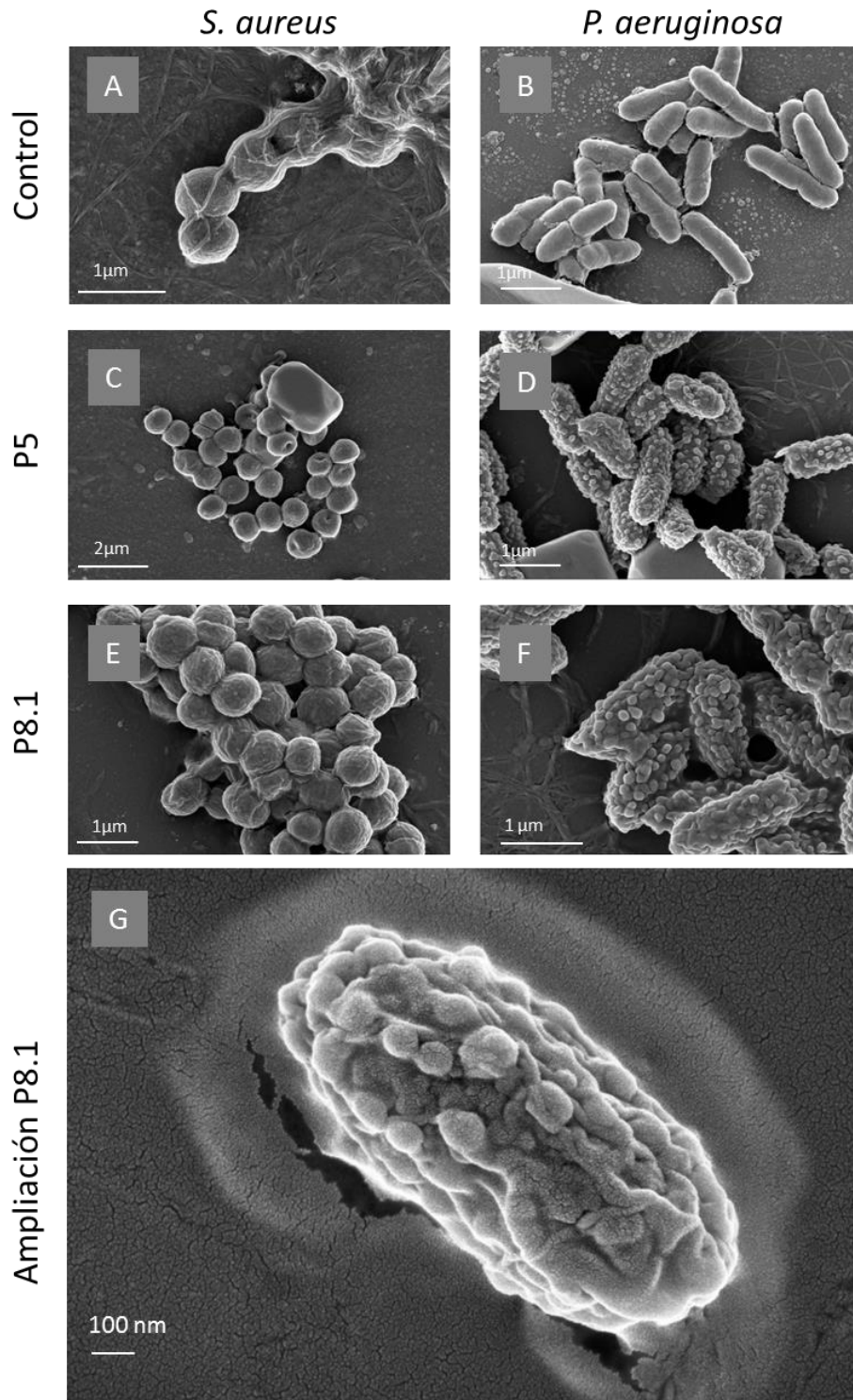


Figura 14 - Microscopía electrónica de barrido de *P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* ATCC 25923. Las muestras fueron incubadas con: solución fisiológica (A y B), P5 (C y D) o P8.1 (E, F y G) por una hora en la CIM respectiva de cada péptido para cada cepa.

En la Figura 14 se presentan seis imágenes representativas de las microscopías de barrido realizadas. Las muestras control de ambas cepas bacterianas (Figura 14, A y B) presentaron células turgentes, con superficie lisa, estructura superficial conservada y homogénea, sin alteraciones visibles. En cuanto a las muestras tratadas con los PAMs, en *P. aeruginosa* (Figura 14, D, F y G) se observaron claras alteraciones de la pared celular, con protrusiones en forma de burbujas a lo largo de toda la superficie bacteriana. Esto podría estar relacionado al aumento de permeabilidad de la membrana bacteriana producido por la interacción de los péptidos con la misma, pero manteniendo todavía su membrana externa intacta, lo que permitiría el paso del contenido intracelular al espacio periplásmico generando las protuberancias mencionadas. Este efecto observado es concordante con el mecanismo de acción más relevante y ampliamente reportado para los PAMs. El mismo consiste en la desestabilización de la membrana bacteriana, producido por el intercalado de los péptidos entre los fosfolípidos de la bicapa lipídica, que luego de llegar a una concentración umbral produce la lisis bacteriana y muerte celular. En esta cepa Gram-negativa los dos péptidos evaluados mostraron los mismos efectos a nivel de superficie.

En cuanto a *S. aureus* (Figura 14, C y E), no se observaron cambios visibles significativos como en *P. aeruginosa*. Si bien en algunos casos se pueden observar células con invaginaciones, esta característica no es representativa de todas las imágenes. Dado que las muestras fueron incubadas por una hora en la concentración inhibitoria mínima de los PAMs, es posible que con más tiempo de exposición al antimicrobiano o con mayores concentraciones del mismo se logre observar el daño celular. En bacterias Gram-negativas la presencia de membrana externa ofrece una bicapa lipídica de localización superficial como potencial blanco para los PAMs. Por el contrario, las bacterias Gram-positivas tiene una única bicapa lipídica que se encuentra enmascarada por una gruesa capa de peptidoglicano, responsable en gran medida de la rigidez de la pared celular bacteriana. Por este motivo, probablemente, en la concentración de CIM sólo fue posible observar efectos en la cepa Gram negativa y no en la Gram positiva. En la primera, las alteraciones de membrana se traducen de forma evidente a la

superficie celular, en tanto que en la segunda, la capa de peptidoglicano no solo enmascara las alteraciones de la bicapa lipídica sino que además le confiere mayor rigidez y resistencia a la permeabilidad de la misma.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1

En esta primera parte del trabajo se obtuvieron, mediante modificaciones y sustituciones aminoacídicas, nuevas moléculas a partir de los péptidos parentales P1, P2 y P5, con el doble objetivo de obtener versiones mejoradas de los péptidos y además poder investigar la influencia de los diferentes parámetros en la actividad biológica de este tipo de péptidos y su posible mecanismo de acción basado en la interacción con membranas biológicas.

El desafío en el diseño de estas secuencias es mantener un muy delicado equilibrio entre carga neta, hidrofobicidad y anfipaticidad, tal que permita la interacción efectiva con membranas procariotas, pero no con membranas eucariotas. En ese sentido se debe tener presente que la actividad biológica resultante final de un PAM es una compleja interacción de una serie de características que hacen difícil predecir a ciencia cierta su afinidad por membranas procariotas o eucariotas

Pudimos concluir que:

- Este tipo de péptidos no poseen estructura en solución, y al contacto con membranas lipídicas adquieren estructura tipo alfa hélice.
- Los péptidos con menor carga neta positiva tienen los valores de CIM más elevados, con poca o nula actividad antimicrobiana. Por el contrario, los PAMs con carga neta positiva elevada son más activos. Estos resultados son concordantes con el mecanismo de acción propuesto para los PAMs, cuyo primer paso consiste en la interacción electrostática entre las cargas negativas de las membranas bacterianas (lipopolisacáridos y ácidos teicoicos) y las cargas positivas de los PAMs.
- La carga neta elevada no está relacionada directamente a la hemólisis de eritrocitos murinos.
- La presencia de carga neta positiva elevada es una característica deseable para un PAM con actividad antimicrobiana.

- El aumento de la anfipaticidad (aumento de momento hidrofóbico) sería el responsable del aumento no deseado de la capacidad de lisar eritrocitos.

- Los ensayos de perturbación de la presión de superficie sobre monocapas lipídicas y partición de los péptidos en vesículas lipídicas corroboran lo observado en ensayos de hemólisis de eritrocitos y actividad antimicrobiana, y cuantifican la selectividad potencial de cada molécula por membranas de tipo procariota o eucariota.

- En moléculas muy anfipáticas, la reducción de la hidrofobicidad por cambios de aminoácidos con menor carácter hidrofóbico, que no altere la separación espacial de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en la estructura secundaria, resultaría en una disminución de la afinidad de la molécula por membranas zwitteriónicas

- Los datos de *quenching* de fluorescencia indican que los triptófanos, al interactuar con la membrana, se encontrarían insertados en una posición similar dentro de la bicapa lipídica, y que se encuentran enterrados aproximadamente 8 Å en la membrana, lo que indica una posición del péptido paralelo a la misma.

- En función de estos datos podríamos pensar en un modelo de mecanismo de acción para los PAMs estudiados. Las interacciones electrostáticas dirigirían un primer acercamiento del péptido a las membranas y luego se produciría la conformación en hélice alfa dejando a los triptófanos en la misma cara de la molécula anfipática. Finalmente, la localización de los residuos de triptófano en la región de la cadena carbonada de la bicapa, estabilizados por el alineamiento paralelo a la membrana, es lo que podría promover cambios en la organización de los lípidos y producir la actividad antimicrobiana

- Las microscopias de barrido muestran que en el caso de *P. aeruginosa*, la interacción con el PAM induce claras alteraciones de la pared celular, con protrusiones en forma de burbujas a lo largo de toda la superficie bacteriana. Esto podría estar relacionado al aumento de

permeabilidad de la membrana bacteriana producido por la interacción de los péptidos con la misma, pero manteniendo todavía su membrana externa intacta, lo que permitiría el paso del contenido intracelular al espacio periplásmico generando las protuberancias



CAPITULO 2

Actividad antimicrobiana

INTRODUCCIÓN

La microdilución en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) es una de las metodologías más ampliamente utilizadas cuando se pretende evaluar la actividad antimicrobiana de una droga. Esto es debido a que dicha técnica permite definir la CIM de un antimicrobiano de manera sencilla, reproducible y con bajo costo. Sin embargo, el ensayo de microdilución sólo nos aporta información de lo que sucede a tiempo final (16-20hs), luego de incubar un microorganismo con la droga ensayada. En contraste, la evaluación de la actividad antimicrobiana por medio de cinéticas, permite obtener información detallada de cómo actúa el agente evaluado en función del tiempo. Este tipo de ensayos son muy útiles para describir el modo en que actúan nuevas drogas y son ampliamente utilizados en investigación. Se suele evaluar la inhibición del crecimiento, por cinéticas que siguen dicho proceso generalmente por medición de densidad óptica, así como también cinéticas de muerte, generalmente por recuento de UFC/ml. En particular, las cinéticas de muerte, permiten describir si un antimicrobiano tiene actividad bactericida o bacteriostática.

En cuanto a la relevancia clínica, la administración de un antimicrobiano a un paciente con una enfermedad infecciosa, tiene como objetivo evitar la diseminación de la infección [104]. Luego, la eliminación del agente patógeno depende en gran medida del sistema inmune del hospedador. Por este motivo, en general, a la hora de evaluar un agente antimicrobiano se determina la concentración inhibitoria mínima, ya que lo que se busca es evitar la diseminación del patógeno al resto del organismo, más que su erradicación. Sin embargo, cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos o de algunas enfermedades infecciosas como meningitis, osteomielitis y endocarditis, es de gran importancia determinar si el agente posee efecto bacteriostático o bactericida. La evaluación de la concentración bactericida mínima (CBM) por microdilución, es definida por muchos investigadores como la mínima concentración de droga capaz de matar el 99.9% de las bacterias a tiempo final. No obstante, se considera una definición

arbitraria, que separa a las bacterias en dos poblaciones sin relevancia biológica. Esta definición, también es aplicada a las cinéticas de muerte, sin embargo, la dinámica de la actividad antimicrobiana en el tiempo otorga información muy valiosa cuando se comparan agentes en diferentes condiciones. Por ejemplo, se ha observado que asilamientos clínicos de meningitis bacteriana de pacientes con terapia exitosa o fallida, han mostrado iguales valores de CIM y CBM de moxalactam (betalactámico de amplio espectro); en tanto que se ha observado correlación entre la disminución de la tasa de muerte producida por dicho antibiótico, (observada en cinéticas de muerte) con la falla terapéutica[105].

Por otra parte, otro aspecto importante que puede ser evaluado cuando se investigan nuevas drogas, es su capacidad de ejercer efecto sinérgico con drogas de uso habitual. En la práctica clínica la terapia combinada suele utilizarse en infecciones con riesgo de vida para intentar llegar a todos los potenciales patógenos, cuando un antibiótico no posee espectro de acción suficientemente amplio. También, se utiliza como estrategia para evitar la aparición de resistencia y como alternativa frente a infecciones polimicrobianas [106]. Existen varias técnicas que permiten determinar el efecto sinérgico de dos o más compuestos. La más ampliamente utilizada es una adaptación de la microdilución en caldo, conocida como “*checkerboard*”. Sin embargo, la determinación de sinergia por cinética de muerte es la técnica que tiene mejor correlación con lo observado en modelos animales [104] .

En este capítulo se analizó la actividad antimicrobiana de los PAMs por cinéticas de muerte frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*; así como la posible actividad sinérgica de 4 PAMs seleccionados con meropenem, frente al aislamiento clínico *P. aeruginosa* M13513.

MATERIALES Y METODOS

Cinéticas de muerte

Para realizar las cinéticas se prepararon cultivos en fase exponencial y luego por medición de densidad óptica se ajustó el inóculo a 5×10^5 UFC/ml. Los cultivos se prepararon en tubos de 50 ml, con medio MHAC y volumen final de 10 ml. Los PAMS se evaluaron en la concentración de CIM. Como control de crecimiento se utilizó un cultivo sin antimicrobiano. Las muestras se incubaron en agitación a 200 rpm y 37°C, por tres horas. Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo y las muestras fueron diluidas y sembradas por el método de la gota (50µl por gota, por triplicado) en LB agar. Las placas se incubaron a 37°C por 24 hs y luego se determinó el recuento de UFC/ml para cada tiempo. Los datos se presentaron como el promedio y el error estándar para cada punto, en un gráfico de UFC/ml vs. tiempo.

Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo plano. Se siguió el mismo procedimiento que para en ensayo de microdilución en caldo, pero en este caso la paca se incubó a 37°C en el equipo *Cytation 5*, y se realizaron mediciones de densidad óptica a 600nm cada 2 hs, con previa agitación de las muestras. Los resultados se representan como el promedio y el error estándar, en gráficos de DO vs tiempo.

Sinergia por *checkerboard*

El ensayo de sinergia por *checkerboard* permite evaluar la actividad antimicrobiana de varias combinaciones de antimicrobianos. El ensayo se realizó de forma similar al de microdilución en caldo, pero en vez de realizar diluciones seriadas de antimicrobianos en la placa, se prepararon las combinaciones de antimicrobianos previamente y luego se sembró cada combinación en el pocillo correspondiente. En este caso se trabajó con combinaciones de meropenem y cuatro PAMs: P1, P5, P6.2 y P8.1. Se probaron las siguientes mezclas: 0.5xCIM

PAM + 0.5xCIM meropenem; 0.5xCIM PAM + 0.25xCIM meropenem; 0.25xCIM PAM + 0.5xCIM meropenem; y 0.25xCIM PAM + 0.25xCIM meropenem. Como controles, en cada placa se evaluó la concentración de CIM de cada PAM y meropenem, así como un control de crecimiento (medio con inóculo), y control de esterilidad (medio sin inocular). En el punto final del ensayo se calcula un índice de sinergia que se denomina FICI por sus siglas en inglés (*fractional inhibitory concentration index*), de la siguiente manera: $FICI = FIC_{PAM} + FIC_{mero}$, donde, $FIC_{PAM} = CIM_{PAM}$ en la combinación /CIM_{PAM} solo; y $FIC_{mero} = CIM_{mero}$ en la combinación /CIM_{mero} solo.

Un valor de FICI ≤ 0.5 es considerado actividad sinérgica, FICI = 1 es considerado como efecto aditivo y $1 \geq FICI \geq 0.5$ es considerado como probable efecto sinérgico.

Sinergia por cinética de muerte

La sinergia evaluada por cinética de muerte es el método más recomendado para determinar si dos antimicrobianos poseen efecto sinérgico cuando se administran en combinación. La metodología es muy laboriosa, por lo que no suele utilizarse como método de rutina en laboratorios microbiológicos, pero es la técnica que mejor correlaciona con el resultado terapéutico en modelos animales[104]. El procedimiento es similar al descrito para las cinéticas de muerte, pero en este caso se agregan tomas de muestra a las 4, 8 y 24 hs de incubación. En este trabajo se decidió analizar la sinergia por cinética de muerte para las combinaciones de antimicrobianos más altas que inhibieron el crecimiento en el ensayo de *checkerboard*. Se trabajó con los péptidos P1, P5, P6.2 y P8.1 en combinación con meropenem, todos en 0,5xCIM. También se evaluó la actividad de cada uno de los componentes de la combinación por separado en 0,5xCIM. Se utilizó medio de cultivo inoculado como control de crecimiento y medio de cultivo inoculado con adición de antimicrobiano en concentración de CIM como control de actividad antibacteriana. El inóculo inicial fue corroborado por recuento de UFC/ml. Se considera efecto sinérgico a la reducción de dos o más unidades logarítmicas de UFC/ml entre la combinación y su agente más activo (evaluado de forma

individual), a las 24 hs. Se considera efecto bactericida a la reducción de 3 o más unidades logarítmicas de UFC/ml respecto del inóculo inicial.

RESULTADOS

Determinación de actividad bactericida

Las cinéticas de muerte de un antimicrobiano permiten observar cómo el agente ejerce su actividad en función del tiempo, midiendo las células viables por recuento de unidades formadoras de colonias a diferentes intervalos de tiempo. Normalmente, para los antibióticos de uso habitual esta medición se realiza en un periodo de 24 hs, debido a que en ese lapso alcanzan su máximo de actividad. Sin embargo, para los PAMs estos tiempos son mucho más cortos, de hecho estos antimicrobianos ejercen la actividad máxima en solo horas o minutos. Por ese motivo, se realizaron cinéticas de muerte midiendo las bacterias viables a intervalos cortos por un periodo de tres horas[107–109]. Las cinéticas de muerte se realizaron para *P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* ATCC25923, incubadas con los PAMs en la CIM respectiva para cada cepa. La reducción de 3 unidades logarítmicas respecto del inóculo inicial se considera efecto bactericida (muerte del 99,9%).

Para *P. aeruginosa* PAO1, todos los PAMs, excepto P6.2, mostraron actividad bactericida (Figura 15). Para P2, P5, P7 y P8 este efecto se observó en los primeros minutos de incubación, reduciendo el número de bacterias viables a valores por debajo del límite de detección del método en menos de 30 minutos. P1 mostró una curva de pendiente menos pronunciada, alcanzando la actividad bactericida en aproximadamente 45 minutos, y llegando a $\approx 10^1$ UFC/ml recién a las 3 horas. Por otra parte, P8.1 redujo el inóculo bacteriano en 3 unidades logarítmicas recién a las 2 horas de incubación y a las 3 horas este valor se mantuvo casi sin cambios.

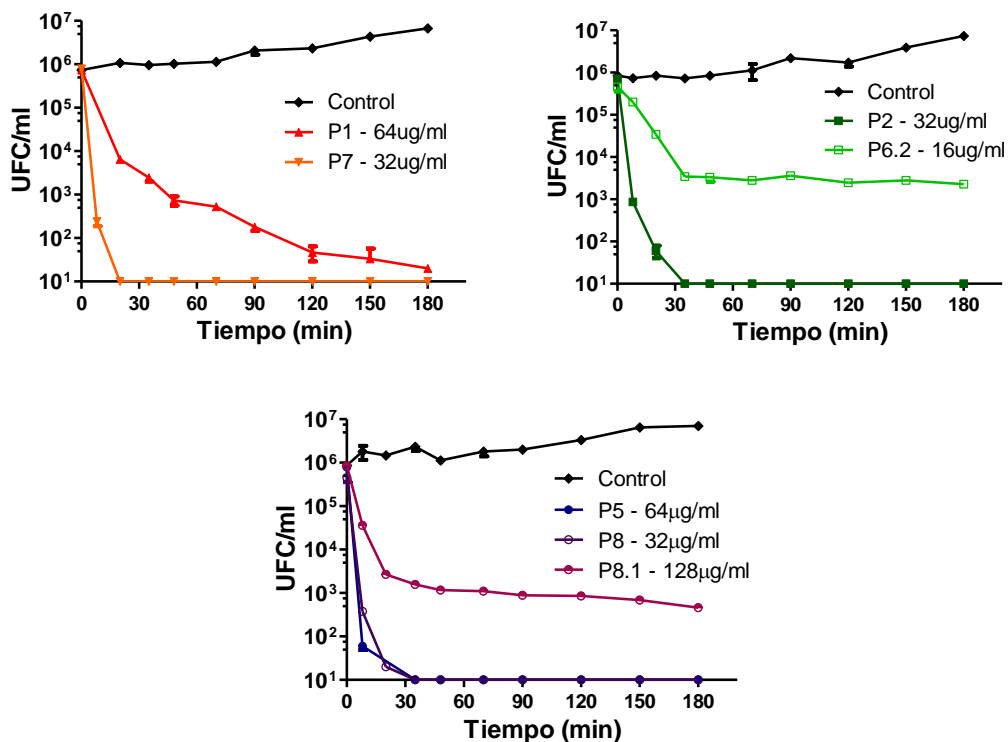


Figura 15 – Cinética de muerte de *P. aeruginosa* PAO1 incubada a 37°C y 200rpm, con cada PAM en su respectiva CIM. Los puntos graficados sobre el eje "X" corresponden a valores por debajo del límite de detección del método (6×10^1 UFC/ml).

En *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 16) sólo los péptidos P2, P7, P8 y P8.1 mostraron actividad bactericida. Además, las curvas de muerte en esta cepa fueron notablemente más lentas que en *P. aeruginosa*. Este hecho podría estar relacionado a que las bacterias Gram-positivas poseen una gruesa capa de peptidoglicano que ofrece estabilidad a la célula, lo que haría más lento el proceso de lisis celular, por lo menos en los primeros momentos de la interacción. Sin embargo, cabe destacar que todas las curvas de muerte de *S. aureus* tienen pendientes negativas que se mantienen en tendencia descendiente a las 3 horas de incubación; a diferencia de las curvas de los PAMs no bactericidas observadas en *P. aeruginosa*, cuyas pendientes parecieran llegar a un valor constante de UFC/ml.

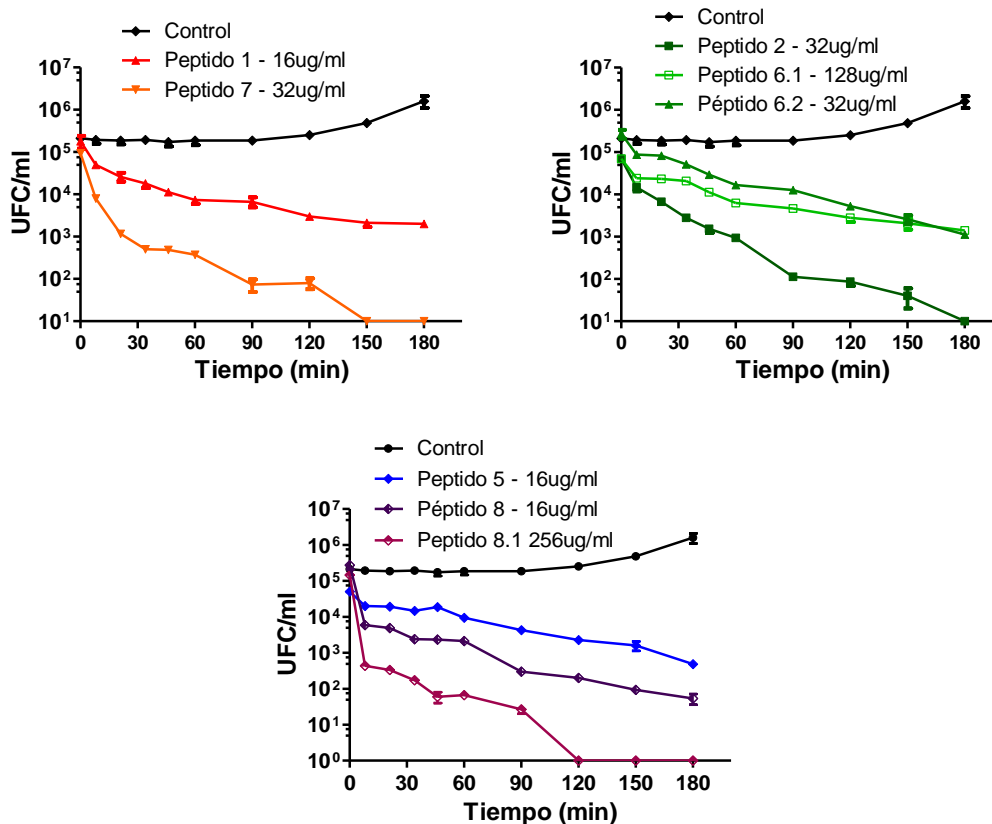


Figura 16 – Cinética de muerte de *S. aureus* ATCC25923 incubado a 37°C y 200rpm, con cada PAM en su respectiva CIM. Los puntos graficados sobre el eje “X” corresponden a valores por debajo del límite de detección del método (6×10^1 UFC/ml).

Cinéticas de crecimiento de *P. aeruginosa* M13513

Habiendo evaluado la actividad de los PAMs en el aislamiento clínico (capítulo 1), se decidió analizar la posible actividad sinérgica con meropenem de 4 PAMs seleccionados (P1, P5, P6.2 y P8.1). En primera instancia se realizaron curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* M13513 a distintas concentraciones de los péptidos o meropenem, a fin de evaluar el comportamiento del microorganismo a bajas concentraciones de antimicrobiano. Esto nos permitió realizar una aproximación más exacta del valor de CIM. Contar con este dato es de gran importancia, dado que el método de microdilución en caldo para el cálculo de CIM tiene un error intrínseco de +/- 1 dilución. Este ensayo se realiza con diluciones seriadas al

medio, y en concentraciones altas las diferencias de concentración de un antimicrobiano entre una dilución y la siguiente se hacen muy grandes. Este hecho, sumado al error del método, suele traer inconvenientes a la hora de realizar ensayos de sinergia, donde se utilizan concentraciones por debajo de la CIM y el índice de sinergia es calculado en relación a la CIM de cada antimicrobiano sólo.

La Figura 17 muestra las cinéticas de crecimiento del aislamiento clínico en diferentes concentraciones de péptido. Luego, a partir de los datos de DO a tiempo final para cada concentración, se realizó un cálculo aproximado de la CIM (Tabla 6) por ajuste de la curva según Gompertz [110] (Figura 18).

Todos los antimicrobianos evaluados, excepto P1, mostraron actividad antimicrobiana en concentraciones por debajo de la CIM. En general, las concentraciones sub-óptimas del antimicrobiano sólo inhiben el crecimiento bacteriano por un corto periodo de tiempo al principio de la cinética, luego del cual la densidad óptica (crecimiento bacteriano) aumenta. Este efecto depende de la concentración del PAM o antimicrobiano; en concentraciones bajas la curva es cada vez más parecida al control positivo (bacterias sin antimicrobiano), e incluso en algunos casos la concentración más baja (8µg/ml) es prácticamente igual a la del control. En estos casos, además de la posibilidad que el agente antimicrobiano a esas concentraciones se comporte como bacteriostático en las primeras etapas de la curva, también podrían existir poblaciones bacterianas heterogéneas en cuanto a la resistencia al antimicrobiano testado, y el recrecimiento podría deberse al aumento de estas poblaciones resistentes. Este efecto suele observarse en curvas de muerte cuando hay un decrecimiento inicial de UFC/ml y luego el cultivo recrece[104].

Por otro lado es importante señalar el comportamiento de P1, este PAM mostró un efecto distinto a los demás agentes evaluados. La actividad antimicrobiana de P1 fue nula en concentraciones por debajo de la CIM, siendo todas las curvas prácticamente iguales al control positivo. Este efecto de “todo o nada” indica que para este PAM en particular, a concentraciones sub-óptimas, el antimicrobiano no

afecta el crecimiento bacteriano, ya que sólo luego de alcanzar una concentración umbral o “*treshold*” comienza la lisis de la célula bacteriana. Este tipo de comportamiento esta reportado en la literatura para otros antimicrobianos [111].

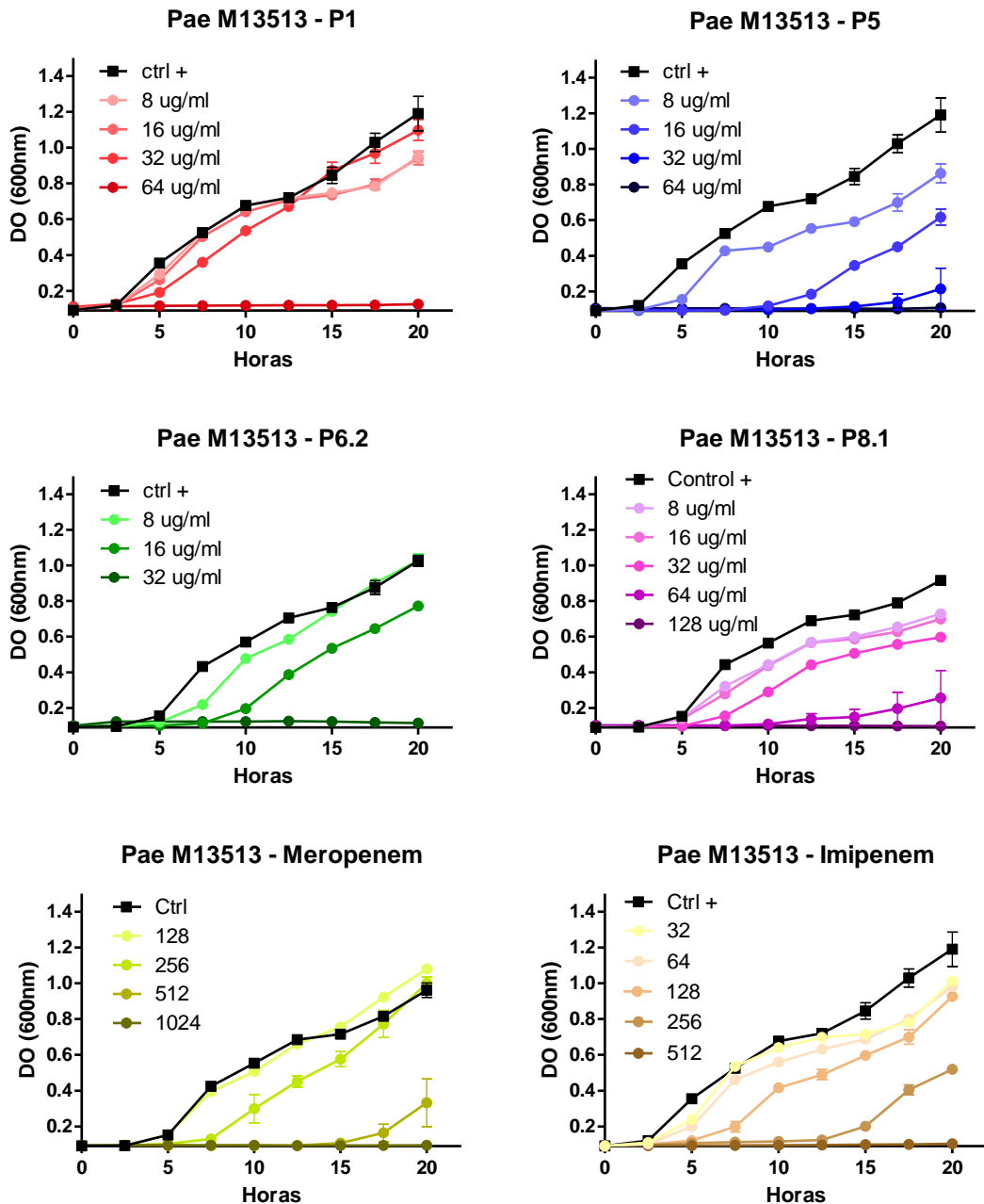


Figura 17 – Cinéticas de crecimiento de *P. aeruginosa* M13513 en diferentes concentraciones de antimicrobiano (PAM, meropenem o imipenem)

Ajuste de CIM para evaluación de actividad sinérgica

A partir de los valores de DO a tiempo final (20hs) para cada antimicrobiano, se realizó una curva de DO vs. concentración de PAM o antibiótico (Figura 18). Ajustando los datos a la curva según el método de Gompertz, se puede calcular una concentración más exacta capaz de inhibir el crecimiento a las 20hs, estimada a partir del punto de unión de la recta que pasa por el punto de inflexión de la curva y la recta que pasa por la asíntota horizontal.

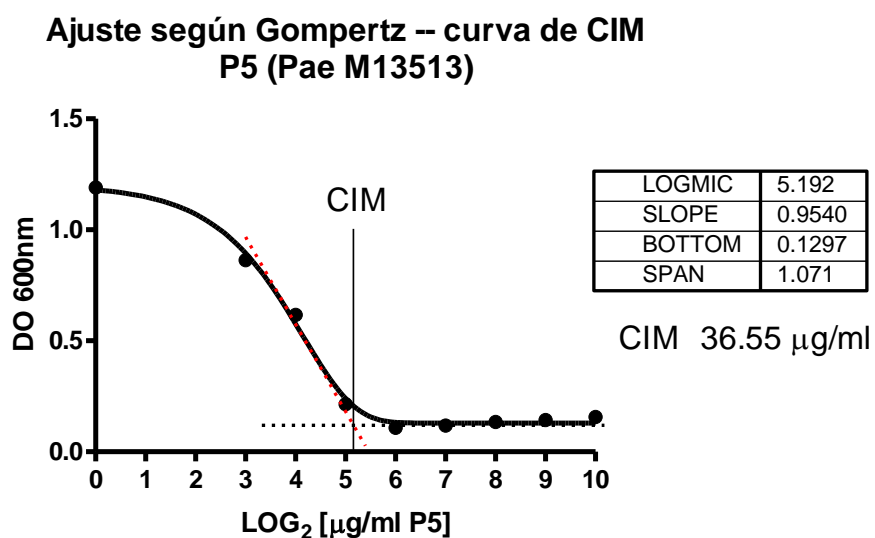


Figura 18 – Ajuste según Gompertz [110]. Se presenta a modo de ejemplo el ajuste realizado para P5 en *P. aeruginosa* M13513. Se graficó la DO a tiempo final (20hs) en función del logaritmo en base 2 de las concentraciones de péptido. A partir del punto de unión de la recta que pasa por el punto de inflexión de la curva y la recta que pasa por la asíntota horizontal se calcula el valor de CIM aproximado.

Este método nos permitió acercarnos al valor exacto de concentración inhibitoria mínima, y luego, probando concentraciones cercanas a las estimadas a partir de la curva, pudimos establecer los siguientes valores de CIM de *P. aeruginosa* M13513 para los cuatro PAMs seleccionados.

Péptido	P1	P5	P6.2	P8.1	Meropenem
CIM (µg/ml)	50	50	40	100	800

Tabla 6 – Valores de CIM calculados a partir del ajuste a la curva según método de Gompertz.

Sinergia por *checkerboard*

Utilizando los valores de CIM ajustados que nos permitieron realizar ensayos con menor variabilidad, se evaluó la posible actividad sinérgica por el método de *checkerboard*. Se probaron diferentes combinaciones de PAMs y meropenem frente al aislamiento clínico *P. aeruginosa* M13513.

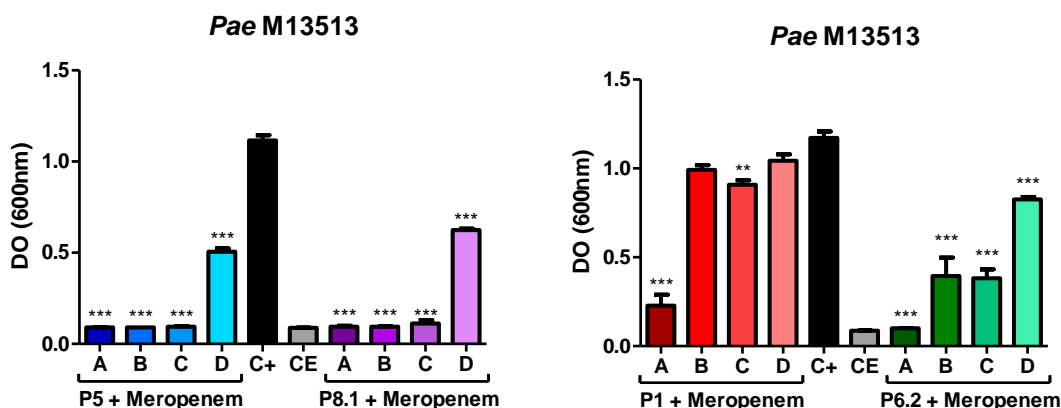


Figura 19 – Actividad sinérgica por el método *checkerboard*. Se presenta el crecimiento bacteriano en cada una de las combinaciones de PAMs y meropenem. A: 0,5xCIM PAM + 0,5xCIM mero; B: 0,25xCIM PAM + 0,5xCIM mero; C: 0,5xCIM PAM + 0,25xCIM mero; D: 0,25xCIM PAM + 0,25xCIM mero. C+: control positivo, sin antimicrobiano. CE: control de esterilidad, sólo medio MHAC. ANOVA de una vía, con test posterior de Dunnet, comparando todas las combinaciones contra el control (C+); ***p<0,001.

Luego de evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano en las distintas combinaciones de antimicrobianos, se debe realizar el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional o FICI por sus siglas en inglés. El mismo se calcula con la siguiente ecuación:

$$FICI = (CIM_A^{combi}/CIM_A^{solo}) + (CIM_B^{combi}/CIM_B^{solo})$$

Un valor de FICI ≤ 0.5 es considerado actividad sinérgica, FICI = 1 es considerado como efecto aditivo y $1 \geq FICI \geq 0.5$ es considerado como probable efecto sinérgico.

A partir de la fórmula se deduce que la única combinación (de las evaluadas en este experimento) que podría ser considerada sinérgica, si presentara inhibición de crecimiento, sería la D; dado que:

$$\text{FICI combinación D} = 0,25 \times \text{CIM}_A / \text{CIM}_A + 0,25 \times \text{CIM}_B / \text{CIM}_B = 0,25 + 0,25 = 0,5$$

Sin embargo, se analizaron diferentes combinaciones para descartar, por ejemplo, efectos antagonistas. Como puede observarse en la Figura 19, ninguna combinación de PAM + meropenem logró inhibir el crecimiento en la combinación D. A pesar de ello, los resultados muestran que P5 y P8.1 serían probablemente sinérgicos, en tanto que P1 y P6.2 sólo presentarían efecto aditivo.

Cabe destacar que el crecimiento observado en las combinaciones D presenta diferencia estadísticamente significativa con el control positivo, lo que indica que hay actividad antimicrobiana, aunque no se haya inhibido completamente el crecimiento. Por otra parte, en este tipo de experimentos donde se evalúa el crecimiento por medición de DO, se obtiene una medida indirecta del crecimiento bacteriano, sin conocer el detalle de cómo varía la carga microbiana durante el periodo de incubación con los antimicrobianos. Este hecho sumado al resultado de probable efecto sinérgico nos alentó a buscar una metodología más certera para evaluar sinergia. Por este motivo se decidió realizar un ensayo en el que se pudiese observar de forma más detallada la actividad antimicrobiana de la combinación de PAMs y meropenem.

Sinergia por cinética de muerte

Según la guía “*Métodos para la determinación de actividad bactericida de agentes antimicrobianos*” del CLSI [112], la forma más precisa, o *gold standard*, para evaluar actividad sinérgica es por medio de la realización de cinéticas de muerte. Este ensayo nos permite evaluar el crecimiento bacteriano a diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de incubación de las bacterias con las diferentes combinaciones de antimicrobianos; y se realiza por recuentos de UFC/ml a diferentes tiempos. Según el CLSI, los resultados de actividad sinérgica evaluados mediante este ensayo tienen mejor correlación con lo observado en

modelos animales. Sin embargo, por ser un procedimiento muy laborioso, no se lleva a cabo como ensayo de rutina en los laboratorios de análisis clínicos que deben manejar un gran volumen de muestras a diario.

En estos ensayos se evaluó la posible actividad sinérgica de P5, P8.1, P6.2 y P1 con meropenem sobre *P. aeruginosa* M13513. Para ello se evaluaron combinaciones de 0,5xCIM de cada PAM con 0,5xCIM de meropenem, y se realizaron cinéticas de muerte tomando muestras para recuento de UFC/ml cada una hora durante las primeras 4 hs de la cinética, y luego a las 8hs y 24hs. Normalmente, este ensayo se realiza evaluando la carga microbiana a las 0, 4, 8 y 24hs cuando se utilizan antibióticos convencionales. Sin embargo, dada la naturaleza de los péptidos antimicrobianos, decidimos que sería importante tener mayor detalle de la actividad durante las primeras horas de incubación y se agregaron puntos intermedios de evaluación en el periodo 0-4hs.

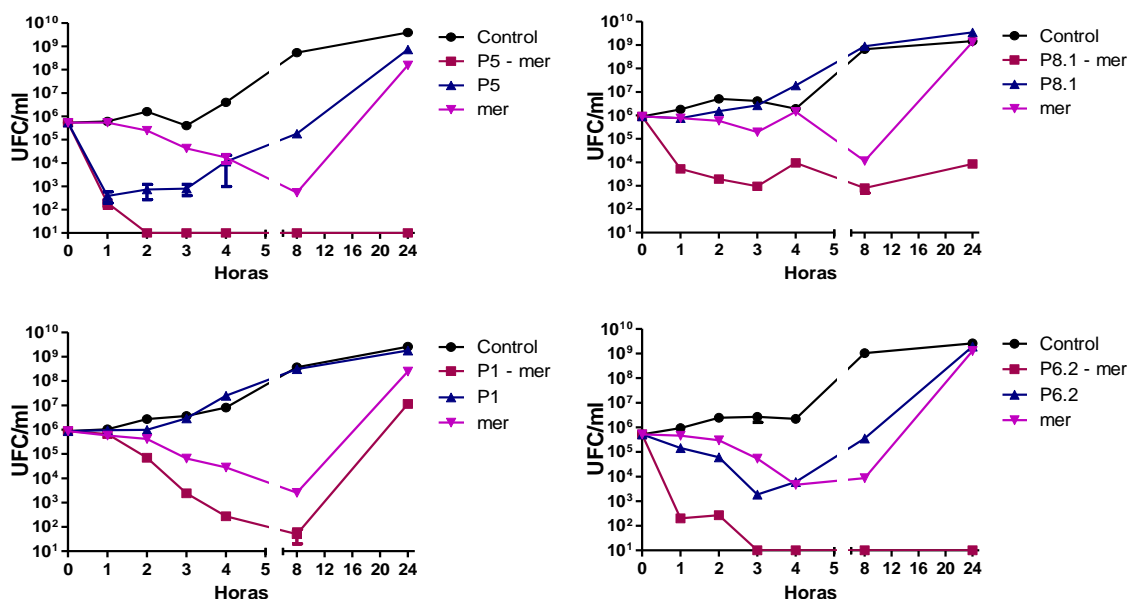


Figura 20 – Cinéticas de muerte de *P. aeruginosa* M13513 para la evaluación de posible sinergia de los PAMs con meropenem. PAM-mer: 0,5xCIM péptido + 0,5xCIM meropenem; PAM: 0,5xCIM péptido; mer: 0,5xCIM meropenem; Control: control de crecimiento sin antimicrobiano. Los datos graficados por encima del eje de las abscisas corresponden a $\text{UFC/ml} \leq 10^1$ (límite de detección del método).

La reducción de dos o más unidades logarítmicas de UFC/ml entre la combinación y el agente combinado más activo, a las 24 hs, es considerada como

efecto sinérgico. La reducción de tres o más unidades logarítmicas (muerte del 99,9%) respecto del inóculo inicial es considerada efecto bactericida.

Como se puede observar en la Figura 20, las combinaciones de meropenem con P5, P8.1 y P6.2 mostraron actividad sinérgica; ya que redujeron el número de UFC/ml en más de dos unidades logarítmicas, respecto del agente más activo, a las 24hs. Es notoria la actividad de las combinaciones de meropenem con P5 y P6.2, cuyos recuentos estuvieron por debajo del límite de detección del método (10^1 UFC/ml) a partir de las 3 hs, manteniéndose en ese valor hasta el final de la cinética. Esto implica una reducción de más de 7 unidades logarítmicas respecto de agente más activo, cuyos valores se encuentran entre 10^8 - 10^9 UFC/ml en el punto final. En cambio, la combinación de meropenem con P8.1 presentó recuentos mínimos de aproximadamente 10^3 UFC/ml, manteniéndose aproximadamente entre 10^3 y 10^4 hasta el final de la cinética. Además, es importante destacar que a las 24 hs, las combinaciones con P5 y P6.2 mostraron actividad bactericida (reducción ≥ 3 Log (UFC/ml) respecto del inóculo inicial), a diferencia de la combinación con P8.1 que a las 24 hs presentó diferencia de sólo dos unidades logarítmicas respecto del inóculo inicial.

En el caso de P1 no se observó sinergia ni actividad bactericida de la combinación con meropenem, presentando carga microbiana en el orden de 10^7 al final del ensayo, siendo ésta la carga más alta de todas las combinaciones evaluadas.

Mecanismo de acción propuesto para explicar la sinergia

Los antibióticos convencionales despliegan su actividad antimicrobiana al inhibir la replicación del ADN, la transcripción del ADN o la síntesis de la pared celular, en particular, afectando a las topoisomerasas y las proteínas de unión a la penicilina (PBP). Algunos de los mecanismos de resistencia que muestran las bacterias multiresistentes consiste en impedir o dificultar el ingreso de estas moléculas a la célula bacteriana, modificar el antibiótico o su sitio blanco, o

expulsar la droga mediante bombas de eflujo, lo que conduce a la disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano.

Los carbapenemes, son antibióticos beta-lactámicos bactericidas estrechamente relacionados con las penicilinas, que se unen a las proteínas de unión a la penicilina (PBP). Al unir e inactivar estas proteínas, los carbapenemes inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que conduce a la muerte celular.

Los carbapenemes tienen un espectro extremadamente amplio de actividad antimicrobiana y son altamente resistentes a una variedad de β -lactamasas. Muchas bacterias multirresistentes a menudo son sensibles a los carbapenemes. Por eso, las cepas emergentes resistentes a carbapenemes son un nuevo peligro al sistema de salud en su conjunto. Poder disponer de un fármaco con actividad frente estas cepas sería un gran paso adelante en esta lucha.

Un mecanismo propuesto para la sinergia con PAMs estaría relacionado al aumento del ingreso de antibiótico a partir de la permeabilización de membrana (como se muestra en la Figura 21).

Si bien las concentraciones de meropenem utilizadas en estos ensayos no tiene gran relevancia para la utilización en la clínica, ya que todavía son demasiado elevadas (400 μ g/ml), es importante destacar que se pudo poner en evidencia que mediante la combinación de este carbapeneme con un PAM que permeabiliza la membrana es posible bajar los niveles de resistencia de una cepa de importancia clínica. Este fenómeno es un buen punto de partida para continuar en la búsqueda de moléculas que puedan ser utilizadas en combinación con antibióticos de uso habitual para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias mutirresistentes.

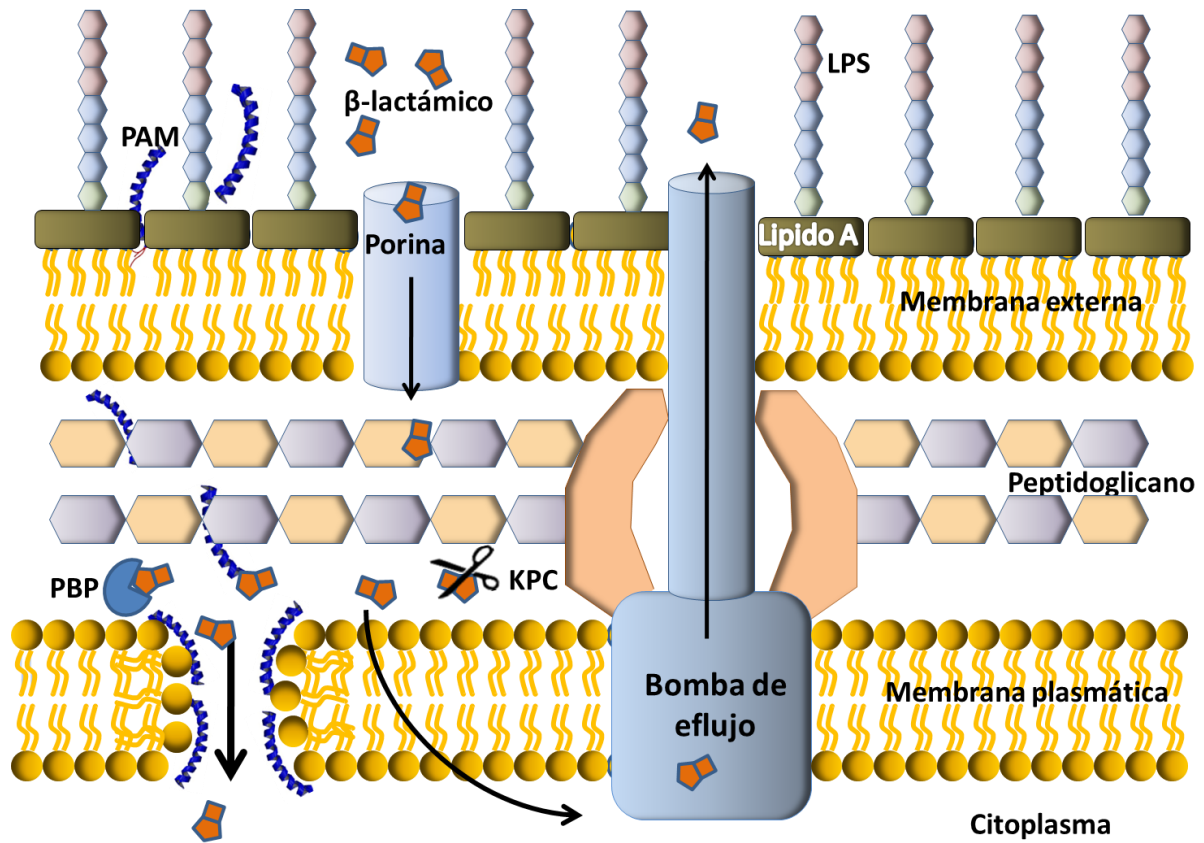


Figura 21 - Mecanismo de acción propuesto para explicar la sinergia de los PAMs con meropenem. Adaptado de [113].

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2

En las cinéticas de muerte de todos los péptidos sobre las cepas de referencia se pudo observar que:

- Este tipo de moléculas presentan buena actividad antimicrobiana desde los primeros minutos de incubación.
- En general, la tasa de muerte de los PAMs es más rápida para *P. aeruginosa* PAO1 que para *S. aureus* ATCC25923, aunque en esta última cepa todas las cinéticas mantuvieron una pendiente negativa a lo largo del tiempo, mientras que en PAO1 algunos PAMs redujeron la cantidad de UFC/ml a un nivel que se mantuvo constante hasta el final del ensayo.
- Para *P. aeruginosa*, todos los PAMs, excepto P6.2, mostraron actividad bactericida en la CIM. En cambio, en *S. aureus* sólo los péptidos P2, P7, P8 y P8.1 mostraron actividad bactericida.
- Los PAMs P5, P6.2 y P8.1 presentan sinergia *in vitro* en combinación con meropenem, frente al aislamiento clínico *P. aeruginosa* M13513. Además, las combinaciones con P5 y P6.2 mostraron actividad bactericida al combinarse con meropenem, al final de la cinética.



CAPITULO 3

Actividad antibiofilm

INTRODUCCIÓN

Los biofilms son estructuras complejas desarrolladas por microorganismos como una forma de vida alternativa al crecimiento planctónico, que les permite crecer adheridos a diferentes superficies. Poseen una estructura compleja cuya matriz está formada por compuestos secretados por las propias células microbianas (exopolisacáridos, ADN y ARN extracelular, proteínas y lípidos) [114]. Entre los patógenos humanos, aquellos que tienen capacidad de formar biofilm representan un grave problema de salud, ya que las bacterias que crecen dentro de los biofilms se encuentran protegidas del sistema inmune del hospedador que es incapaz de erradicar la infección. Por otra parte, se ha observado que algunos antimicrobianos tienen poca capacidad de penetración en el biofilm, y por lo tanto, no resultan eficaces en la eliminación del patógeno. Incluso, algunos biocidas utilizados para desinfectar superficies, suelen ser inactivados en las capas más superficiales del biofilm, protegiendo a las células que se alojan en las capas profundas. Además, las células que se encuentran dentro del biofilm, presentan un fenotipo latente causado por la adaptación a un ambiente pobre en oxígeno y nutrientes, que resulta en niveles metabólicos bajos y tasas de división celular radicalmente reducidas. Esto resulta en la transformación de las bacterias en fenotipos resistentes a muchos antibióticos aunque no posean los genes de resistencia propiamente dichos, ya que en estas condiciones son capaces de ocultar o prescindir de los componentes celulares que constituyen los blancos de acción de los antibióticos [115,116].

S. aureus ha resurgido como un patógeno clínicamente relevante debido a su prevalencia en infecciones relacionadas con cuerpos extraños, el rápido desarrollo y exhibición de resistencia a múltiples antibióticos, y su predilección a transformar una infección aguda en una persistente, crónica y recurrente [117]. Los biofilms de *S. aureus*, una vez establecidos, no son afectados por el tratamiento antimicrobiano y la respuesta del huésped, y por lo tanto son el agente etiológico de muchas infecciones recurrentes [118].

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que en general causa infecciones leves. Sin embargo, tiene gran importancia en personas con sistema inmune comprometido, pudiendo generar infecciones graves en diferentes partes del cuerpo humano, como neumonía bacterémica, endocarditis, meningitis, infecciones de quemaduras y sepsis, todas ellas asociadas con alta mortalidad [119,120]. Por otra parte, la constante aparición de cepas resistentes a los antibióticos han aumentado la morbilidad y mortalidad en infecciones causadas por *P. aeruginosa*, y, actualmente, es el agente causal más común de infecciones hospitalarias [121]. El crecimiento de *P. aeruginosa* en biofilms, además de dificultar la erradicación de la infección, cambia los patrones de expresión genética, incrementando la tasa de transferencia horizontal y contribuyendo a la diseminación de la resistencia.

Los péptidos antimicrobianos con actividad anti-biofilm representan un enfoque muy prometedor para tratar infecciones asociadas a la formación de biofilms. Se ha observado que los PAMs son capaces de interferir en diferentes etapas del desarrollo de los biofilms, poseen una prometedora actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y muestran efecto sinérgico con los antibióticos convencionales [122,123].

En este capítulo se analizó la actividad anti-biofilm de los PAMs diseñados frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, como inhibidores del proceso de formación de biofilm y como agentes capaces de destruir biofilms previamente formados.

MATERIALES Y METODOS

Inhibición de la formación de biofilm

La capacidad de inhibición de formación de biofilm se evaluó en placas de 96 pocillos de fondo plano. Se sembró un cultivo bacteriano de forma similar al procedimiento desarrollado en el protocolo de microdilución en caldo, pero en este caso, para permitir el desarrollo del biofilm, se trabajó en concentraciones sub-óptimas de los antimicrobianos, es decir, por debajo de la CIM (0,5xCIM y 0,25xCIM). Se evaluó la actividad de los PAMs y de un antibiótico al cual la cepa evaluada es sensible. La CIM de cada antimicrobiano se utilizó como control de actividad, medio de cultivo inoculado como control de crecimiento y medio de cultivo sin inocular como control de esterilidad. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hs. Terminada la incubación se midió DO₆₀₀ para obtener una medida del crecimiento bacteriano. Luego, se removieron las células no adherentes retirando el sobrenadante del cultivo de cada pocillo y lavando con solución fisiológica dos veces. Se fijó con 100µl de metanol 100% por 15 minutos y se tiñó con 100µl de cristal violeta 1% (v/v) durante 5 minutos. Los pocillos fueron enjuagados con agua destilada dos veces y se dejó secar a 37°C por 30 min. Una vez seco, se colocaron 100 µl de ácido acético glacial al 33%, se incubó 15 min y se homogenizó. Luego se midió la absorbancia a 595nm en lector de microplacas Rayto 6000, como medida indirecta de la formación de biofilm.

Se consideró como 100% de formación de biofilm al valor obtenido por las bacterias en medio de cultivo sin antibiótico o péptido. El blanco del ensayo se realizó con los pocillos utilizados para el control de esterilidad (solo medio de cultivo). Como antibiótico control se utilizó tobramicina para *P. aeruginosa* PAO1; vancomicina para *S. aureus* y tobramicina y gentamicina para *P. aeruginosa* M13513. Los resultados se presentaron como porcentaje de biofilm formado respecto del control (100%).

Ruptura de biofilm pre formado y viabilidad bacteriana

Para evaluar la actividad de los antimicrobianos sobre un biofilm pre-formado, en una placa de 96 pocillos se sembró la cepa evaluada en medio MHAC con inóculo de 5×10^5 UFC/ml. Luego de 24hs de incubación, en las cuales se desarrolla el biofilm, se retiró el sobrenadante y se colocó medio de cultivo fresco con los antimicrobianos a evaluar. Se trabajó en concentraciones de 8xCIM, 4xCIM y 2xCIM y CIM. Se utilizó medio de cultivo inoculado como control de crecimiento y medio de cultivo sin inocular como control de esterilidad. La placa se incubó nuevamente a 37°C por 24 hs y luego se midió DO_{600} para obtener una medida del crecimiento bacteriano.

Este ensayo se realizó por duplicado y luego una placa se utilizó para medir ruptura de biofilm pre-formado por el método de cristal violeta y la otra placa fue utilizada para evaluar viabilidad bacteriana dentro el biofilm.

En el primer caso se procedió con la misma técnica de tinción descrita en el apartado anterior.

Para evaluar viabilidad celular se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La reducción metabólica del MTT da como producto un compuesto coloreado insoluble llamado formazan, que luego puede ser disuelto por un solvente orgánico y medido por absorbancia a 570nm (A_{570}). La producción de formazán es proporcional a la cantidad de células vivas. Luego de retirar el sobrenadante de la placa, se lavó tres veces con solución fisiológica y se agregaron 100µl de MTT (0.05% p/v). Posteriormente la placa se incubó a 37°C, en oscuridad, por 3 hs. Finalmente, se homogenizó por agitación orbital durante 10 minutos y se midió A_{570} en el equipo Cytation 5 Imagine Reader from BioTec Instrument. Se consideró como 100% de viabilidad al valor obtenido por las bacterias en medio de cultivo sin antibiótico o péptido. El blanco del ensayo se realizó con el valor obtenido para el control de esterilidad (medio de cultivo sin inocular). Los resultados se representan como porcentaje de viabilidad bacteriana respecto del control (100%).

Microscopia confocal de barrido láser

Para el análisis de microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por su siglas en inglés), los biofilms se cultivaron en placas para microscopía confocal μ -dish^{35mm, low} ibiTreat (80136, Ibi, Fitchburg, WI, USA), utilizando las mismas condiciones de inhibición y ruptura de biofilm, con un volumen final de 300 μ l. Luego de la incubación con los péptidos, los biofilm fueron teñidos con el kit de viabilidad bacteriana BacLight para tinción de células vivas/muertas (L7007, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal de barrido marca Zeiss, modelo LSM 710 (Oberkochen, Alemania), equipado con un objetivo de aceite Plan-Apochromat 63 \times / 1.40. Los láseres utilizados fueron argón (λ_{exc} = 458, 488 and 514 nm, potencia máxima de 25 mW) y DPSS 561-10 (λ_{exc} = 561 nm, potencia máxima de 15 mW). Para las representaciones tridimensionales, se tomaron imágenes del mismo campo de la muestra a diferentes valores del eje z (z-stack), utilizando la misma distancia del centro de la imagen (\pm 20 μ m). Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software de edición Zen Black. La proporción de células vivas y muertas se determinó contando tres imágenes representativas de cada biofilm, utilizando el analizador de imágenes Icy [124,125].

Microscopía de fuerza atómica

Para realizar la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) se procedió según el protocolo de G.S Dominguez et al. [126]. Brevemente, las mismas muestras utilizadas para el análisis CLSM fueron lavadas cinco veces con agua destilada y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con un JPK NanoWizard IV (Berlín, Alemania) montado en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200. Las mediciones se realizaron en modo de contacto intermitente (aire) utilizando cantiléver o voladizo de silicona ACL (AppNano, Huntingdon, Reino Unido) con radio de punta de 6 nm, frecuencia de resonancia de aproximadamente 190 kHz y constante de resorte de 58N.m⁻¹. La

velocidad de barrido fue establecido entre 0,3 y 0,6 Hz y el punto de ajuste fue cercano a 0,3 V. Se midieron señales de error y altura, y las imágenes fueron analizadas con el software Gwyddion.

RESULTADOS

Los péptidos P1, P5, P6.2 y P8.1 fueron seleccionados para analizar su utilidad como agentes anti-biofilm. Se eligieron estos PAMs porque son las secuencias que poseen la mejor relación entre actividad antimicrobiana y menor hemólisis. En un primer análisis se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de inhibir la formación biofilm. Estos experimentos fueron realizados para las tres cepas bacterianas sobre las que previamente se había evaluado la actividad antimicrobiana: *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* M13513. Dado que éste último aislamiento clínico produce abundante biofilm, fue utilizada también en ensayos posteriores donde además se evaluó la capacidad de los PAMs de destruir un biofilm previamente establecido. En estos últimos experimentos también se analizó la viabilidad bacteriana dentro del biofilm luego del tratamiento con el antimicrobiano (PAM o antibiótico control).

Inhibición de la formación de biofilm

Para evaluar la capacidad de inhibir la formación de biofilm, se creció a las bacterias en medio MHAC con el objetivo de obtener un biofilm de 24 hs de desarrollo. El crecimiento se realizó en presencia de péptido o antibiótico control, en concentraciones menores a la CIM: 0,5xCIM y 0,25xCIM. Finalizada la incubación, se midió tanto el crecimiento bacteriano como la formación de biofilm. Las concentraciones de antimicrobiano por debajo de la CIM permiten que las bacterias se multipliquen en presencia de concentraciones no letales de péptido o antibiótico. Los resultados obtenidos se presentaron en gráficos de barras donde las cantidades están calculadas como porcentaje del control (bacterias sin antimicrobiano, considerado como el 100% de formación de biofilm)

Inhibición de la formación de biofilm en *S. aureus*

Para *S. aureus* ATCC25923 los cuatro péptidos evaluados presentaron reducción significativa de la formación de biofilm (Figura 22). El mayor efecto inhibitorio de la formación de biofilm se observó con P5 a concentración de 0,5xCIM y P8.1 a concentraciones de 0,5xCIM y 0,25xCIM, con una reducción de aproximadamente 40% del biofilm respecto del control positivo (100% de biofilm). Luego, P6.2 presentó una reducción del 35% pero sólo en concentraciones de 0,5xCIM. Por otro lado P1 redujo 25% y 23% la formación de biofilm en 0,5xCIM y 0,25xCIM, respectivamente. Con respecto a vancomicina, redujo un 30% la formación de biofilm en 0,5xCIM, en tanto que la concentración 0,25xCIM no presentó reducción estadísticamente significativa.

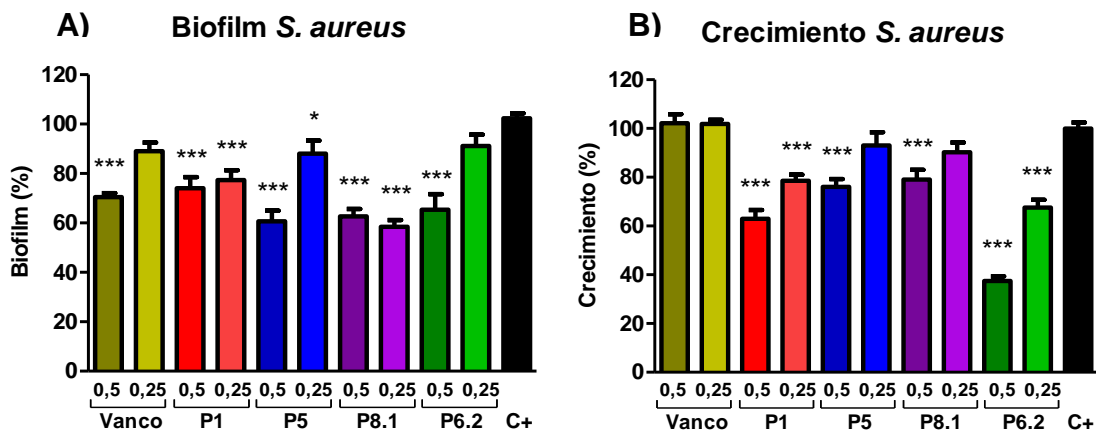


Figura 22 - Inhibición de la formación de biofilm (A) y control de crecimiento (B) en *S. aureus* ATCC25923. ANOVA de una vía con prueba post test de Dunnett: comparación de todos contra el control (C+); ***p<0,001; *p<0,05.

Antes de realizar la tinción con cristal violeta para la evaluación de biofilm, se midió la DO a 600nm como medida del crecimiento bacteriano. El objetivo fue analizar si estas concentraciones por debajo de la CIM también podrían afectar de manera significativa el crecimiento, y por ende la formación de biofilm. Como se puede observar en la figura 22 solamente para P5 y P8.1 en concentraciones de 0,25xCIM no hubo reducción significativa en el crecimiento bacteriano, aunque sí se observó inhibición de biofilm en estos casos. Por lo tanto, para estos PAMs y

en esta concentración, evidentemente el efecto de inhibición de formación de biofilm no se encuentra relacionado a la inhibición de crecimiento. Lo mismo puede observarse en el tratamiento con vancomicina 0,5xCIM. En los demás casos, no podríamos afirmar si el efecto de la disminución en el biofilm está dada por la inhibición a su formación promovida por el PAM, o simplemente porque hay menos bacterias debido a que se inhibió en parte su crecimiento. En el caso de P6.2, se observó que las concentraciones evaluadas fueron las que más afectaron el crecimiento bacteriano. La concentración 0,5xCIM mostró más del 50% de reducción de crecimiento, pero la reducción de biofilm fue similar a las de P5 0.5xCIM, el cual sólo redujo un 20% el crecimiento bacteriano respecto del control. Además, para P6.2 en 0,25xCIM, se observó reducción estadísticamente significativa de crecimiento, pero sin afectar la producción de biofilm.

Inhibición de la formación de biofilm en *P. aeruginosa* PAO1

En *P. aeruginosa* PAO1 se repitió el mismo ensayo con los mismos péptidos P1, P5, P6.2 y P8.1.

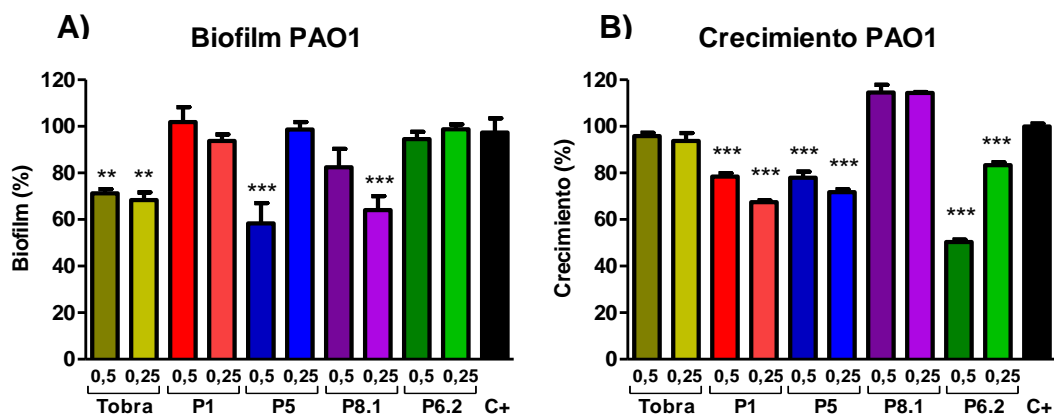


Figura 23 - Inhibición de la formación de biofilm (A) y control de crecimiento (B) en *P. aeruginosa* PAO1. ANOVA de una vía con prueba post test de Dunnett: comparación de todos contra el control (C+); ***p<0,001; **p<0,01.

Frente a esta cepa, la inhibición de biofilm observada fue mucho menor en comparación con lo observado en *S. aureus*. Solamente P5 0,5xCIM y P8.1 0,25xCIM presentaron actividad anti-biofilm frente a *P. aeruginosa*, al igual que tobramicina en las dos concentraciones evaluadas (Figura 23, A). Para estos casos se observó una formación de 30-40% menos de biofilm respecto del control. En el caso de P5 se observó además inhibición del crecimiento bacteriano estadísticamente significativo (Figura 23, B). Sin embargo, con P8.1 y tobramicina no se vio afectado el crecimiento de *P. aeruginosa* en ninguna concentración por debajo de la CIM. En este sentido, es importante destacar que el biofilm producido por esta cepa de *P. aeruginosa* si bien es mucho más abundante que el producido por la cepa de *S. aureus*, es también mucho más lábil y las mediciones resultaron más dispersas, lo que explica que en P8.1 a 0,5xCIM una diferencia del 20% no sea estadísticamente significativa.

P1 y P6.2 en ambas concentraciones, al igual que P5 0,25xCIM, presentaron reducción significativa de crecimiento, mientras que no mostraron reducción significativa de la formación de biofilm.

Está ampliamente reportado que el crecimiento bacteriano dentro de la estructura del biofilm le confiere al microorganismo resistencia a factores externos como la actividad de antibióticos e incluso le permite escapar a la detección de células del sistema inmune. Por lo tanto, cuando existen concentraciones de antibióticos que no son efectivas para erradicar al patógeno, es probable que esto se convierta en un factor de estrés capaz de estimular la producción de biofilm como estrategia de supervivencia del microorganismo. En este sentido, es importante contar con antimicrobianos que tengan actividad anti-biofilm, aun en concentraciones sub-óptimas.

Inhibición de la formación de biofilm en *P. aeruginosa* M13513

Posteriormente, se decidió evaluar la capacidad de inhibición de formación de biofilm de los PAMs P1, P5, P6.2 y P8.1 sobre el aislamiento clínico *P. aeruginosa* M13513 resistente a carbapenemes. Esta cepa es una gran productora de biofilm

de características extremadamente mucosas. En este caso, se evaluó además la actividad de dos antibióticos a los cuales la cepa es sensible: gentamicina y tobramicina.

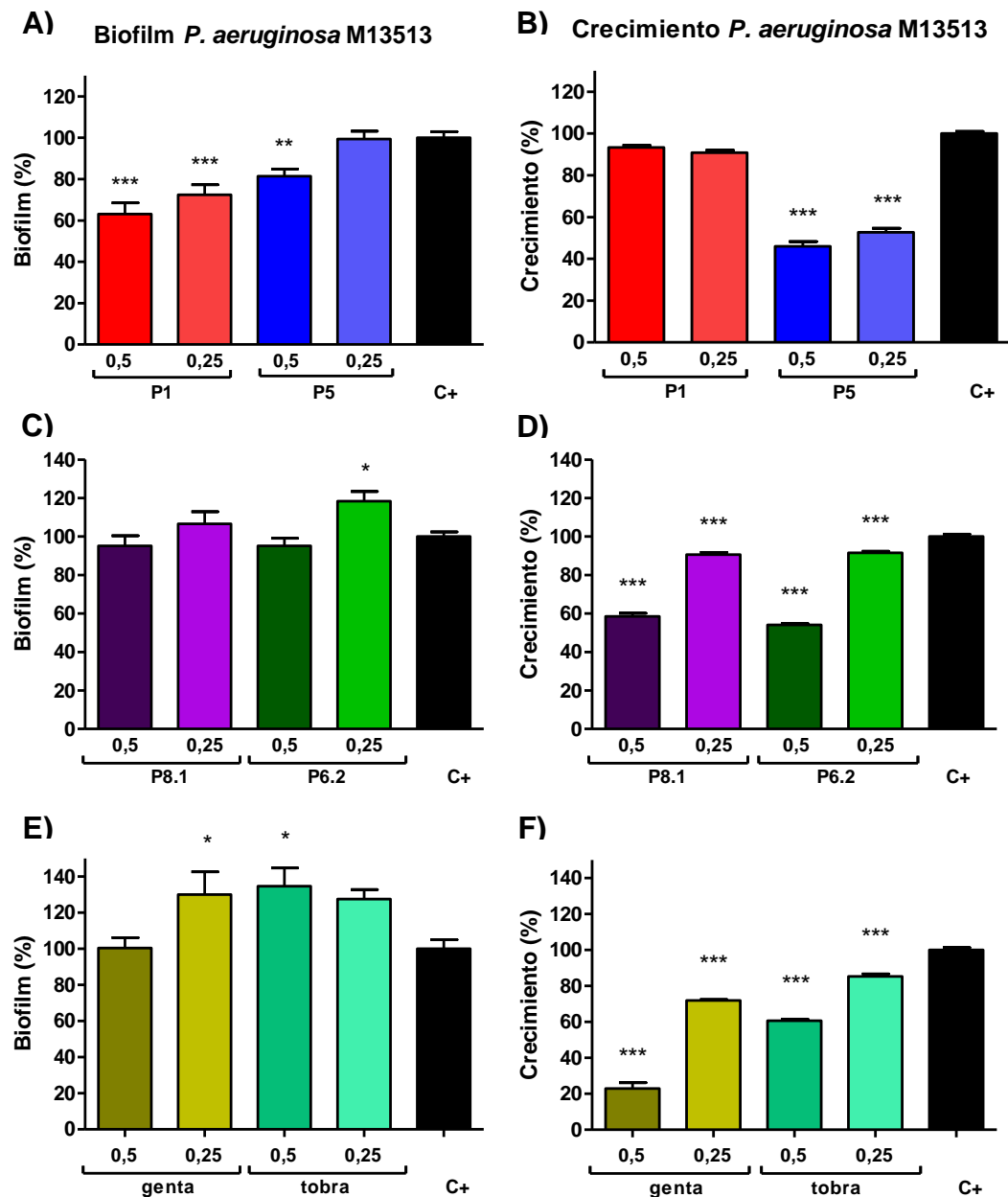


Figura 24 - Inhibición de la formación de biofilm (A, C y E) y control de crecimiento (B, D y F) en *P. aeruginosa* M13513. ANOVA de una vía con prueba post test de Dunnett: comparación de todos contra el control (C+); ***p<0,001; **p<0,01.

Como puede observarse en la Figura 24A, P1 fue el único PAM capaz de reducir la formación de biofilm en ambas concentraciones, con porcentajes de

reducción de 40% para 0,5xCIM y 30% para 0,25xCIM. Luego, P5 también presentó inhibición de la formación de biofilm, aunque en menor medida (20%) y solo en 0.5xCIM, aunque en este caso la inhibición del crecimiento fue aún mayor a la disminución del biofilm (Figura 24B). P8.1 y P6.2 no inhibieron la formación de biofilm de forma significativa (Figura 24C), así como tampoco lo hicieron los antibióticos gentamicina y tobramicina en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 24E). Por otra parte, P5, P6.2 y P8.1, así como los dos antibióticos, afectaron el crecimiento bacteriano en condiciones sub-inhedoras de antimicrobiano, tanto en 0,5xCIM como en 0,25xCIM. Sin embargo P1, que presentó reducción de biofilm en ambas concentraciones, no afectó el crecimiento en 0,5xCIM ni en 0,25xCIM (figura 26 B, D y F). Probablemente, en este caso, la actividad anti-biofilm esté relacionada a procesos metabólicos que no afectan el crecimiento pero sí la producción o establecimiento del biofilm.

Es importante notar que en esta cepa, que tiene gran capacidad de producción de biofilm, la presencia del antimicrobiano a concentraciones sub óptimas promueve la formación de biofilm, llegando a valores superiores al control positivo en algunos casos (Figura 26 C y E). Este efecto se pudo observar claramente para los péptidos P6.2 y P8.1 en 0,5xCIM, en gentamicina 0,25xCIM y tobramicina 0,5xCIM y 0,25xCIM. Esto pone de manifiesto la importancia de contar con nuevas moléculas que sean capaces de impedir la formación de biofilm en aislamientos clínicos, ya que, en general, éstas bacterias poseen gran capacidad de generación de biofilm como estrategia para evadir tanto al sistema inmune como a la terapia antibiótica. Si la infección fuera causada por una bacteria resistente, la exposición a dosis de antibióticos sub letales, podría incluso empeorar el cuadro clínico, promoviendo la generación y el establecimiento del biofilm y complicar una infección que podría llegar a convertirse en una enfermedad crónica.

Ruptura de biofilm pre-formado por *P. aeruginosa* M13513

Seguidamente se decidió evaluar si los PAMs son capaces de desintegrar un biofilm pre-formado y eliminar las bacterias dentro del mismo. Para ello se realizó un ensayo en el que se incubó a las bacterias sin antimicrobiano en medio MHAC,

por 24 hs, para formar el biofilm. Luego, se retiró el sobrenadante, se agregó medio de cultivo con péptido o antibiótico en concentraciones por encima de la CIM y se volvió a incubar por 24 hs. Se realizaron dos placas idénticas y luego de la incubación una se utilizó para cuantificación de biofilm con la técnica de cristal violeta y la otra fue utilizada para evaluar viabilidad bacteriana por MTT.

En la Figura 25 se presentan los gráficos de ruptura de biofilm y viabilidad. En este caso no se midió el crecimiento bacteriano previo a la tinción, ya que al final de la incubación todos los pocillos presentaban crecimiento bacteriano en la misma magnitud que el control positivo, en todas las concentraciones evaluadas.

Todos los péptidos analizados mostraron actividad anti-biofilm en las cuatro concentraciones ensayadas, logrando hasta un 50% de ruptura respecto del control positivo (Figura 25, A y C). P1 y P5 fueron los más activos, con 50% de ruptura en 8xCIM y 4xCIM. En 2xCIM y CIM también se observó ruptura con significancia estadística, aunque en menor medida, siendo mayor el efecto anti-biofilm en la concentración de PAM más elevada. Los PAMs P8.1 y P6.2 mostraron un comportamiento más parejo entre las distintas concentraciones evaluadas, con una ruptura de biofilm de aproximadamente 40% respecto del control (Figura 25,C). Por otra parte, con los antibióticos tobramicina y gentamicina no se observó ruptura de biofilm en ninguna de las concentraciones evaluadas(Figura 25, E). Cabe destacar la diferencia de actividad de los péptidos comparados con los antibióticos, ya que los primeros mostraron ruptura de biofilm incluso en la CIM, en tanto que en los últimos no se observó ruptura ni siquiera en la concentración más alta (8xCIM). De hecho, en algunos casos, en presencia de antibiótico se observó más biofilm que en el control positivo.

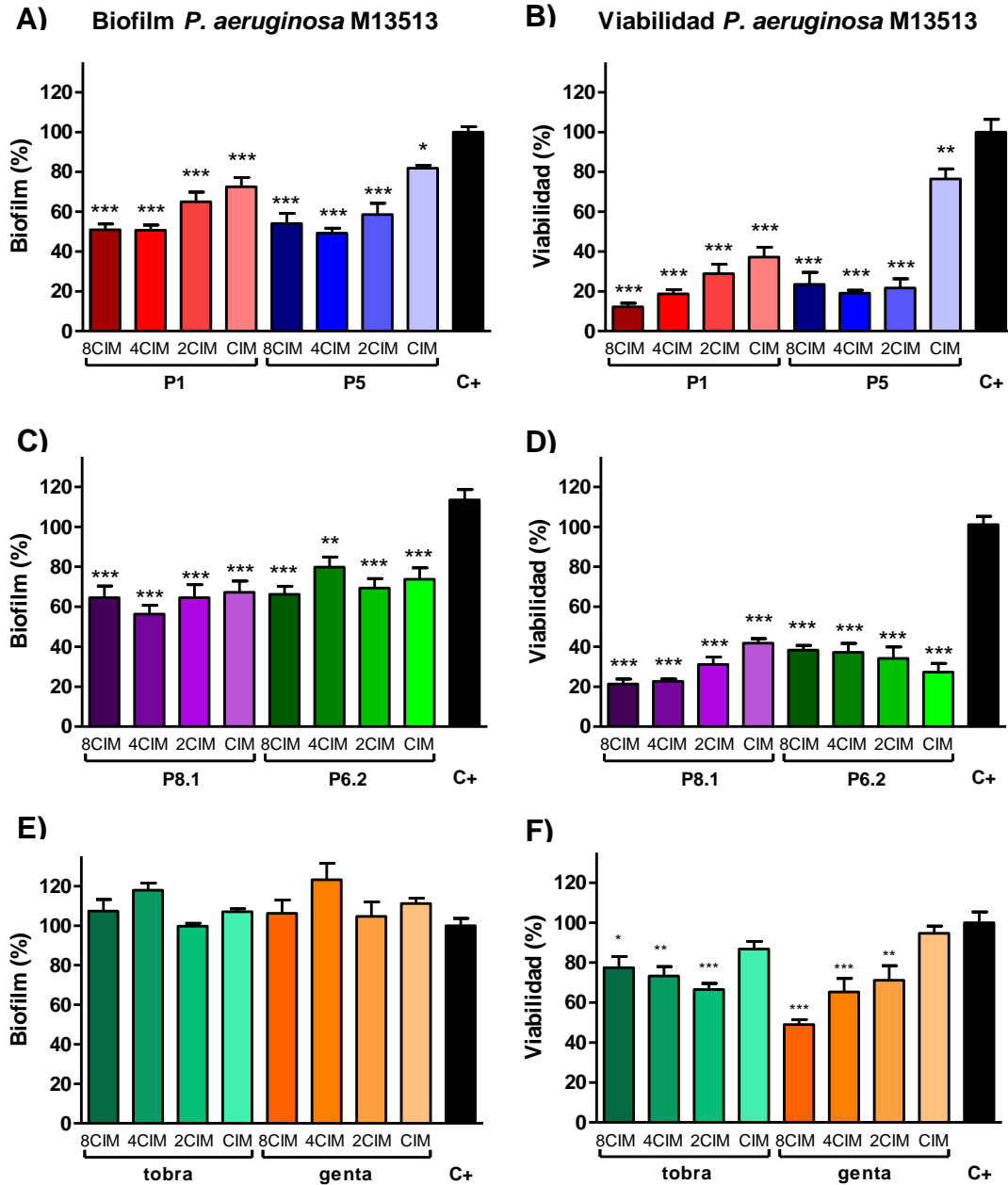


Figura 25 – Ruptura de biofilm pre-formado (izquierda) y viabilidad bacteriana (derecha) en *P. aeruginosa* M13513. ANOVA de una vía con prueba post test de Dunnett: comparación de todos contra el control (C+); tobra: tobramicina; genta: gentamicina; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. $n = 7$ por experimento, se muestran el promedio de los resultados de dos experimentos independientes.

En cuanto a la viabilidad (Figura 25, B, D y F), para los PAMs, se observó un fuerte efecto bactericida dentro del biofilm, siendo P1 en 8xCIM el más efectivo, con 12% de viabilidad respecto del control positivo. En las otras concentraciones

de P1, así como en todas las concentraciones de los demás PAMs, se observó viabilidad menor al 40%, excepto para P5 en su CIM, con viabilidad del 75%. Por otra parte, los antibióticos mostraron menor efecto bactericida dentro del biofilm. La viabilidad más baja fue del 40% y se obtuvo en la concentración más alta de gentamicina (8xCIM). En la concentración de CIM ni tobramicina ni gentamicina mostraron reducción de viabilidad estadísticamente significativa.

Como se puede observar en estos resultados, frente a un biofilm ya establecido, los antibióticos a los cuales la cepa es sensible resultan ineficientes aun a concentraciones 8 veces por encima de la CIM. Si bien tienen cierto efecto sobre la viabilidad bacteriana, no son capaces de disminuir el biofilm. Por el contrario, los PAMs, no solamente redujeron sensiblemente la viabilidad bacteriana dentro del biofilm, sino que además fueron capaces de romper la estructura y disminuir la cantidad de biofilm pre-formado.

Actividad anti-biofilm analizada por microscopía confocal

Posteriormente, se decidió utilizar la técnica de microscopia de barrido láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés) para confirmar la actividad anti-biofilm de los péptidos. Por cuestiones de disponibilidad de reactivos y de tiempo, solamente P5 fue seleccionado para estos ensayos, ya que mostró buena actividad contra la formación de biofilm y disminuyó fuertemente la viabilidad de biofilm pre-formado. Se realizaron experimentos de inhibición de formación de biofilm y de ruptura de biofilm pre-formado en las mismas condiciones que en los ensayos previos, pero en este caso se realizaron sobre placas “ μ -dish^{35mm}, lowibiTreat”, cuyo plástico posee calidad óptica para visualizar correctamente las imágenes al microscopio óptico. Para la tinción se utilizó el kit de viabilidad bacteriana “BacLight”, de colorantes fluorescentes que permite visualizar las bacterias vivas en color verde (mediante la sonda SYTO 9) y las muertas en color rojo (por incorporación de Ioduro de propidio). De esta forma lo que se puede

observar en las imágenes de microscopía confocal, utilizando este kit, es tanto la distribución celular dentro del biofilm, así como la viabilidad bacteriana.

En función de los resultados obtenidos por cristal violeta, se decidió evaluar la inhibición de biofilm con P5 en 0,5xMIC, ya que esta fue la única concentración que había mostrado inhibición en ese ensayo. Como puede observarse en la Figura 26 A, en el biofilm control (sin antibiótico) se observó una estructura homogénea y densa, que indica la presencia de biofilm sin alteraciones. Por el contrario, en el biofilm formado en presencia de una concentración sub-inhibitoria de P5, la imagen presentó estructura alterada, con algunas regiones libres de células (Figura 26, B). Sin embargo, la proporción de células vivas/muertas se mantuvo igual en ambas muestras (Figura 26, C).

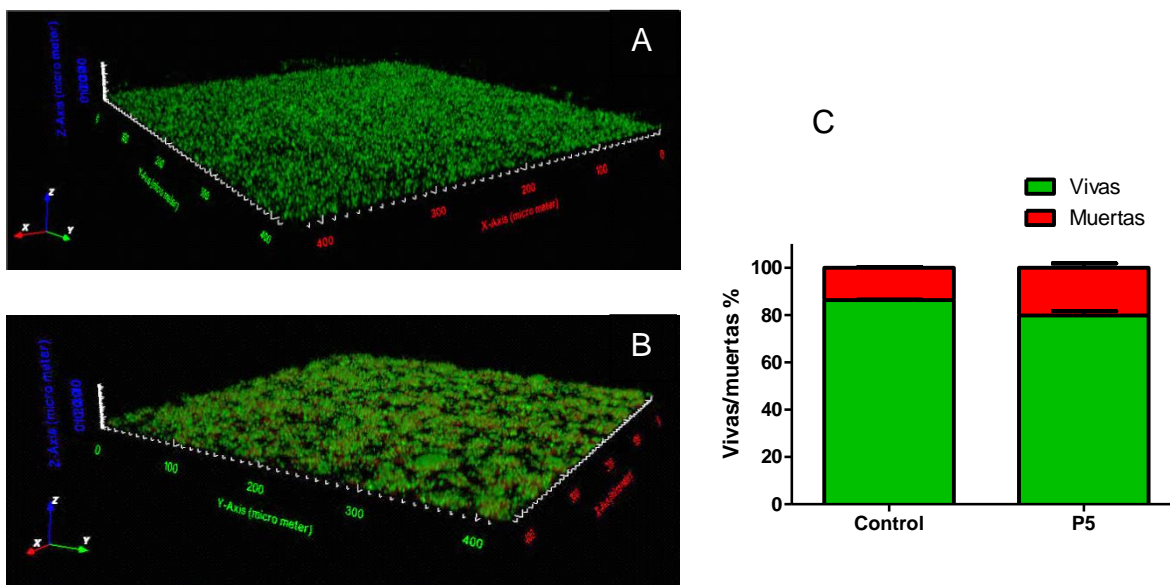


Figura 26 - Inhibición de la formación de biofilm de *P. aeruginosa* M13513 por microscopía confocal. Las células bacterianas se incubaron durante 24 h con P5 en 0,5 x MIC. La fluorescencia verde indica células vivas (SYTO9), la fluorescencia roja indica células muertas (Ioduro de propidio). Las imágenes corresponden a la reconstrucción tridimensional realizada a partir del apilamiento de las imágenes en el eje Z, visualizadas con aumento total de 200X. A) Biofilm control, sin antimicrobiano. B) Biofilm formado en presencia de P5 0,5xMIC. C) Relación porcentual de células vivas y muertas, calculado a partir del análisis de imágenes obtenidas con aumento 630X; las barras representan el promedio \pm DE de tres imágenes representativas.

Luego, se evaluó el efecto de P5 sobre un biofilm pre-formado. Este ensayo fue realizado en las mismas condiciones que los ensayos de ruptura previamente descritos. A un biofilm de 24hs de desarrollo se le agregó medio de cultivo fresco

con P5 a una concentración de 8xCIM y se incubó por otras 24 hs , para luego compararlo contra un biofilm control al que se le agregó solamente medio de cultivo fresco. En las imágenes de CLSM se puede observar que el biofilm control presentó estructura conservada de coloración verde intensa, que indica la presencia predominante de células vivas (Figura 27, A). Por otra parte, el biofilm tratado con P5 8xCIM mostró una estructura menos densa y coloración predominantemente roja, lo que indica la presencia de mayoría de células muertas (Figura 27, B). De hecho, la proporción de células vivas dentro del biofilm bajó de un 80% del recuento total de células en el control, a un casi 5% de células vivas en el biofilm tratado con P5 (Figura 27, C). Estos datos demuestran que el péptido es capaz de afectar la estructura de un biofilm previamente establecido y, además, penetrar en éste y matar una gran porción de células bacterianas.

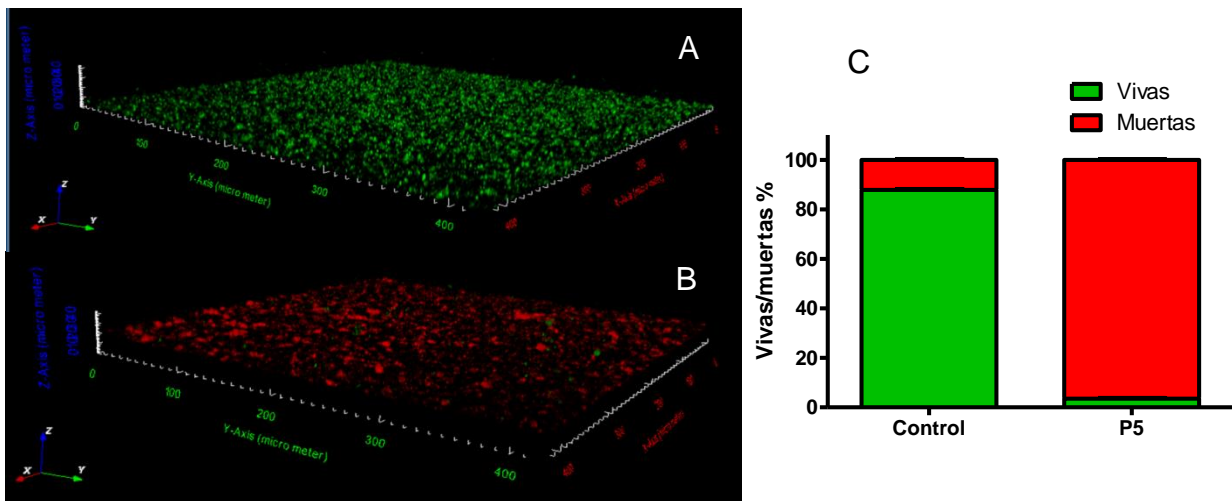


Figura 27 – Ruptura de biofilm pre-formado de *P. aeruginosa* M13513 por microscopía confocal. La fluorescencia verde indica células vivas (SYTO9), la fluorescencia roja indica células muertas (ioduro de propidio). Las imágenes corresponden a la reconstrucción tridimensional realizada a partir del apilamiento de las imágenes en el eje Z, visualizadas con aumento total de 200X. A) Biofilm control, sin antimicrobiano. B) Biofilm pre-formado por 24hs y luego tratado con P5 8xCIM. C) Relación porcentual de células vivas y muertas, calculado a partir del análisis de imágenes obtenidas con aumento 630X; las barras representan el promedio \pm DE de tres imágenes representativas.

Microscopía de fuerza atómica

Finalmente, la ruptura de biofilm pre-formado también fue verificada por microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés). Para ello, las mismas muestras utilizadas para la CLSM fueron posteriormente lavadas y visualizadas por AFM. Las imágenes obtenidas confirmaron lo observado con las técnicas previamente descritas. Como puede verse en la Figura 28, el biofilm control mostró estructura homogénea con alta densidad de células (Figura 28, A), en tanto que en el biofilm tratado con P5 se observó alteración de la estructura y heterogeneidad en el mismo, así como disminución de la densidad bacteriana con presencia de daño de la integridad celular (Figura 28, B).

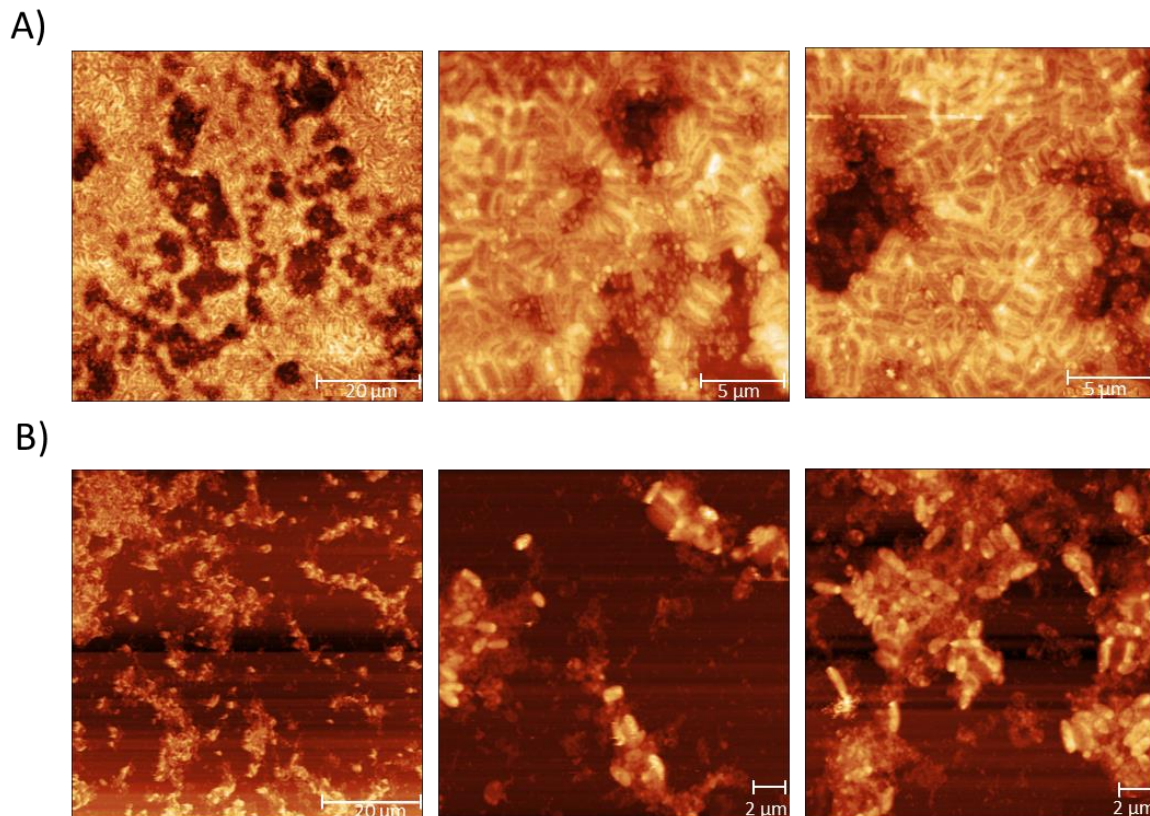


Figura 28 – Erradicación de biofilm pre-formado de *P. aeruginosa* M13513 por microscopía de fuerza atómica. Se muestran tres imágenes de altura de AFM representativas de cada muestra, A) biofilm control, sin antimicrobiano; B) biofilm de 24 hs de evolución luego tratado con P5 en 8xCIM

CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3

- En esta parte del trabajo pudimos observar que todos los PAMs presentaron actividad anti-biofilm frente a *S. aureus*. Sin embargo, frente a *P. aeruginosa* se observaron efectos dispares entre ambas cepas. En PAO1, P5 y P8.1 mostraron inhibición de la formación de biofilm, al igual que el antibiótico tobramicina. En cambio, en el aislamiento clínico M13513, P1 y P5 fueron los péptidos que mostraron inhibición, mientras que ninguno de los antibióticos (tobramicina y gentamicina) fue capaz de inhibir la formación de biofilm.
- En los ensayos previos de actividad antimicrobiana de los diferentes PAMs se observó que la actividad antimicrobiana era dependiente de la cepa. Estos datos demuestran que la actividad anti-biofilm también tendría el mismo comportamiento.
- Luego, en cuanto al efecto anti-biofilm sobre un biofilm previamente establecido, se pudo observar que los PAMs fueron capaces de romper la estructura del biofilm del aislamiento clínico. Los antibióticos, por el contrario, no lograron reducir el biofilm ni siquiera en la concentración más elevada, 8 veces por encima de la CIM. Además, si bien los antibióticos redujeron levemente la viabilidad bacteriana dentro del biofilm, este efecto fue ampliamente superior para los PAMs, con reducción de viabilidad alrededor de 80% en las concentraciones más elevadas de P1, P5 y P8.1.
- Mediante CLSM se pudo observar y confirmar la actividad del P5 de penetrar dentro del biofilm y ejercer allí una considerable actividad antimicrobiana. Además, mediante AFM pudimos corroborar la destrucción parcial de la estructura del biofilm pre formado que ejerce este péptido en la cepa *P. aeruginosa* M13513.



CAPITULO 4

Ensayos en larvas

de *Galleria mellonella*

INTRODUCCIÓN

En la investigación biomédica, cuando se investigan compuestos que tienen como objetivo su utilización en humanos o animales, es necesario realizar pruebas de actividad *in vivo*, que permitan comprobar su eficacia y posibles efectos tóxicos o adversos. Para ello actualmente se utilizan diversos modelos que varían en complejidad, costo y consideraciones éticas. Los roedores, en particular el ratón *Mus musculus* y la rata *Rattus norvegicus*, son los modelos más ampliamente utilizados en investigación, para los cuales hoy existen normas estrictas que aseguran que el trabajo con estos modelos se realice de forma segura garantizando el bienestar animal. Todos los protocolos experimentales que utilicen animales vertebrados deben ser aprobados por un comité de ética de la institución en la cual se llevará a cabo la investigación. Además de los procesos burocráticos que habilitan la utilización de dichos modelos, es necesario contar con instalaciones específicas y con personal altamente capacitado en el manejo animal. Desde hace algunos años ha crecido el interés en utilizar animales que permiten hacer evaluaciones *in vivo* en modelos más simples, sin implicancias éticas, con mayor facilidad de manipulación y menor costo de mantenimiento. Entre ellos se destacan el viejo modelo de la conocida mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra o *zebra fish* y las larvas de *Galleria mellonella* (GM) [127–129]. Los primeros son especialmente útiles para el estudio de la biología del desarrollo, genética y sistema nervioso, en tanto que GM está siendo ampliamente utilizada como modelo de infección. Estos modelos constituyen un primer abordaje al estudio *in vivo*, permitiendo trabajar con un amplio número de individuos por grupo, que aumentan la significancia estadística dando robustez a los resultados obtenidos.

Galleria mellonella es el nombre científico del insecto comúnmente conocido como polilla mayor de la cera. En investigación biomédica se ha utilizado para la evaluación de virulencia de muchos patógenos humanos, entre ellos bacterias y hongos; y como modelo de infección para la evaluación de nuevas drogas [130–132]. Su ciclo vital corto y la facilidad de manipulación hacen de este insecto un

agente excepcional para el trabajo en el laboratorio, sin necesidad de equipamiento sofisticado. Además, se los puede incubar a 37°, un requisito importante a la hora de evaluar modelos de infección de patógenos humanos. Puntualmente, lo que se utiliza es el último estadio larval del insecto, una oruga de aproximadamente 2 cm de largo. Si bien los insectos no poseen sistema inmune adaptativo, su respuesta inmune innata presenta una notable similitud con la respuesta innata observada en vertebrados [131]. Por otra parte, estudios científicos han reportado amplia correlación en la virulencia de algunos patógenos entre modelos de infección en ratones y GM [133]. Asimismo, se ha observado que los mecanismos de virulencia de algunos patógenos en GM tienen alto grado de semejanza con los observados en humanos [134]. La popularidad de este modelo animal ha aumentado en los últimos años y actualmente se pueden encontrar más de 2000 publicaciones científicas que tiene como protagonista a las larvas de GM, de las cuales, la mitad fue publicada en los últimos 7 años, según pubmed.

En este capítulo se presentan los estudios *in vivo* realizados en larvas de GM. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los PAMs frente infecciones por causadas por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, así como la posible sinergia de los PAMs con meropenem frente al aislamiento clínico *P. aeruginosa* M13513.

MATERIALES Y METODOS

Cría de larvas de GM

Los lepidópteros fueron criados en el laboratorio de forma estandarizada. Para ello se estableció un pie de cría y se contó con todos los estadios del ciclo de vida del insecto. Los adultos se colocaron en un contenedor plástico sin alimentación, a partir del cual se recolectaron los huevos. Luego, los huevos y las larvas fueron colocados en contenedores con alimento fresco, preparado a base de salvado de trigo autoclavado (50%), levadura en polvo (5%), cera de abejas (6%), miel (26%) y glicerina (13%). En cada ciclo de crecimiento un pool de larvas fue reservado para progresar a pupa y generación de adultos. Las larvas y los huevos fueron mantenidos a temperatura ambiente durante las estaciones cálidas y en estufa con control de humedad a 30°C durante las estaciones frías. Para cada ensayo, un lote de orugas del último estadio fue separado, almacenado en oscuridad a 10°-12°C para ser utilizadas dentro del lapso de una semana a partir de la recolección.

Inocuidad en larvas de GM

Para evaluar posibles efectos adversos a la administración de los PAMs, se probaron dosis de 10, 50 y 250mg/kg de cada péptido. Se trabajó con un n=10 por grupo. Para inyectar las larvas se utilizó una jeringa graduada tipo Hamilton con capacidad máxima de 25µl e intervalos de 1µl. El péptido fue administrado en una única dosis en volumen total de 10 µl, a través de la última propata izquierda. Las larvas se incubaron a 37°C y se evaluó sobrevida por cinco días.

Modelo de infección en larvas de GM

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron larvas de aproximadamente 2 cm de largo y de 250 mg de peso promedio, siendo este el peso utilizado para calcular las dosis de antimicrobiano.

El inóculo utilizado en los modelos de infección en larvas fue preparado a partir de un cultivo ON, al cual se le realizaron dos lavados con solución fisiológica y se ajustó por medición de DO₆₀₀. Las larvas fueron infectadas inyectado 10µl de la

suspensión bacteriana en la última propata izquierda. Una hora después de la infección, se administró el antimicrobiano en dosis única inyectando 10µl del mismo en la última propata derecha (péptido, antibiótico control, o solución fisiológica como control de infección). Además, en cada ensayo se incorporó un grupo de larvas no manipuladas como control de la viabilidad del lote de insectos y un grupo de larvas inyectadas con solución fisiológica en cada propata como control de daño. Se trabajó con un n=10 por grupo. Para inyectar las larvas se utilizó una jeringa graduada tipo Hamilton con capacidad máxima de 25µl con graduación de 1µl. Las larvas se incubaron a 37°C por cinco días y se registraron los eventos de muerte diariamente.

Para los modelos de infección con *P. aeruginosa* PAO1 se utilizó una suspensión bacteriana de 10⁵UFC/ml (10³UFC/larva). Como antibiótico control se utilizó tobramicina (T) 10mg/kg. Cada PAM fue inyectado a una concentración de 10 mg/kg.

Para los modelos de infección con de *S. aureus* ATCC25923 se utilizó una suspensión bacteriana de 10⁸UFC/ml (10⁶UFC/larva). Como antibiótico control se utilizó vancomicina (V) 10 mg/kg. Cada PAM fue inyectado a una concentración de 10 mg/kg.

Sinergia *in vivo* en GM

Para evaluar sinergia *in vivo* se procedió de igual forma que en los modelos de infección previamente descritos. Como inóculo de *Pae.* M13513 se utilizó una suspensión bacteriana de 10⁵UFC/ml (10³UFC/larva). Como tratamiento antimicrobiano se administró: meropenem en concentración adecuada para lograr la sobrevida de las larvas, combinaciones de meropenem y péptido en condiciones sub-óptimas para evaluar sinergia, y meropenem sola en condiciones sub óptimas como control. Las larvas se incubaron a 37°C y se evaluó sobrevida por cinco días.

RESULTADOS

Se trabajó con grupos de 10 individuos cada uno. Las larvas fueron infectadas y una hora después se les administró antibiótico, péptido o solución fisiológica. En cada experimento se agregó un grupo como control del daño mecánico, al que sólo se le administró solución fisiológica (SF) por la misma vía y en la misma cantidad de inyecciones que a los grupos infectados y tratados con antimicrobiano.

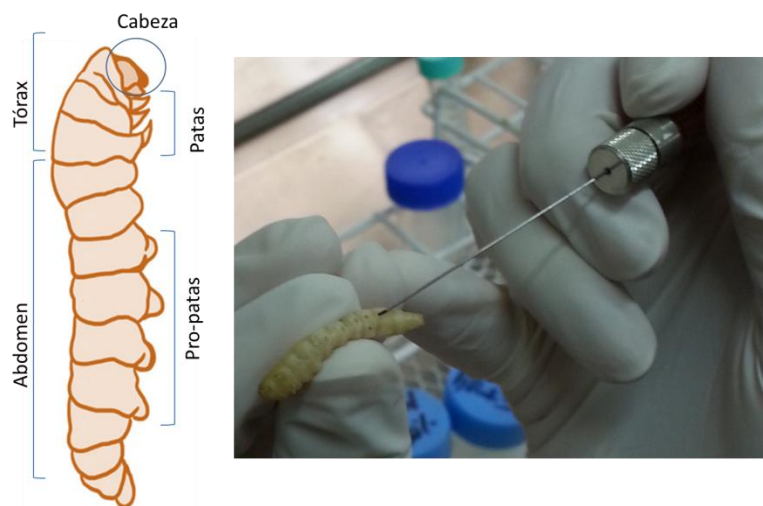


Figura 29 – Anatomía de larvas de *Galleria mellonella* (izquierda, adaptado de [135]). Inyección en ultima propata izquierda (derecha)



Figura 30 – Larvas de *Galleria mellonella* vivas (izquierda) – muertas (derecha)

Tanto la infección como el tratamiento antimicrobiano se realizaron por inyección directa al hemocele de las larvas (compartimiento interno por el que

circula la hemolinfa), a través de las últimas propatas de la oruga (Figura 29). Las larvas fueron incubadas a 37 °C y la sobrevida se registró diariamente (Figura 30).

PAMs en *Galleria mellonella*

Antes de evaluar la actividad de los PAMs *in vivo* en larvas de GM se analizó si la inyección de los péptidos directamente en la hemolinfa presentaba efectos tóxicos para las orugas. Se probaron dosis de 10, 50 y 250 mg/k de cada PAM, en dosis únicas, y se evaluó sobrevida de las larvas por 3 días. Además se trabajó con un grupo control al que sólo se le administró solución fisiológica (SF).

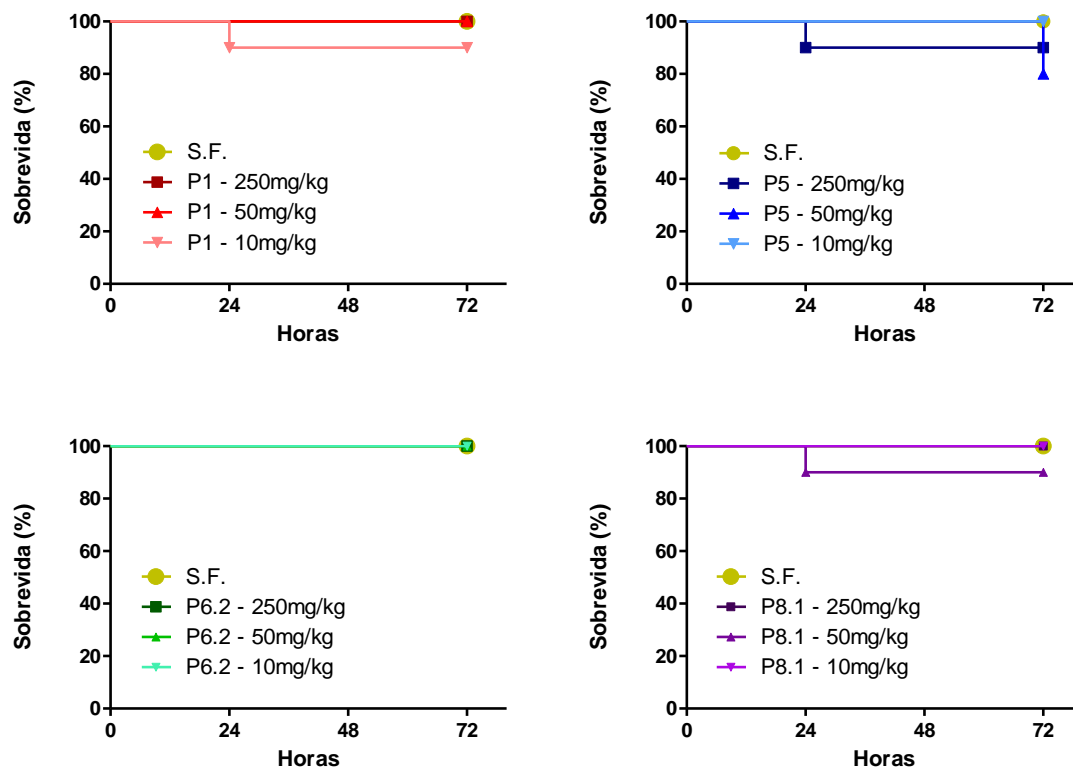


Figura 31 – Toxicidad de los péptidos. Efecto de la administración de los péptidos P1, P5, P6.2 y P8.1 en diferentes dosis en larvas de GM. SF: solución fisiológica. N=10 por grupo.

La inyección de los PAMs no afectó la viabilidad de las orugas de forma significativa en las dosis evaluadas (Figura 31). Tampoco se observaron cambios

de color en la pigmentación de las larvas, los cuales son indicadores de la reacción inmune del insecto.

Evaluación de los PAMs *in vivo* frente a *P. aeruginosa* PAO1

Para el modelo de infección con *P. aeruginosa* se estableció una dosis de infección de 10^3 UFC/larva. Este microorganismo es un patógeno natural de GM por lo que la administración de un inóculo pequeño es capaz de generar infección y muerte en pocas horas. El antibiótico control (tobramicina) o los PAMs fueron administrados una hora después de la infección en dosis única de 10mg/k.

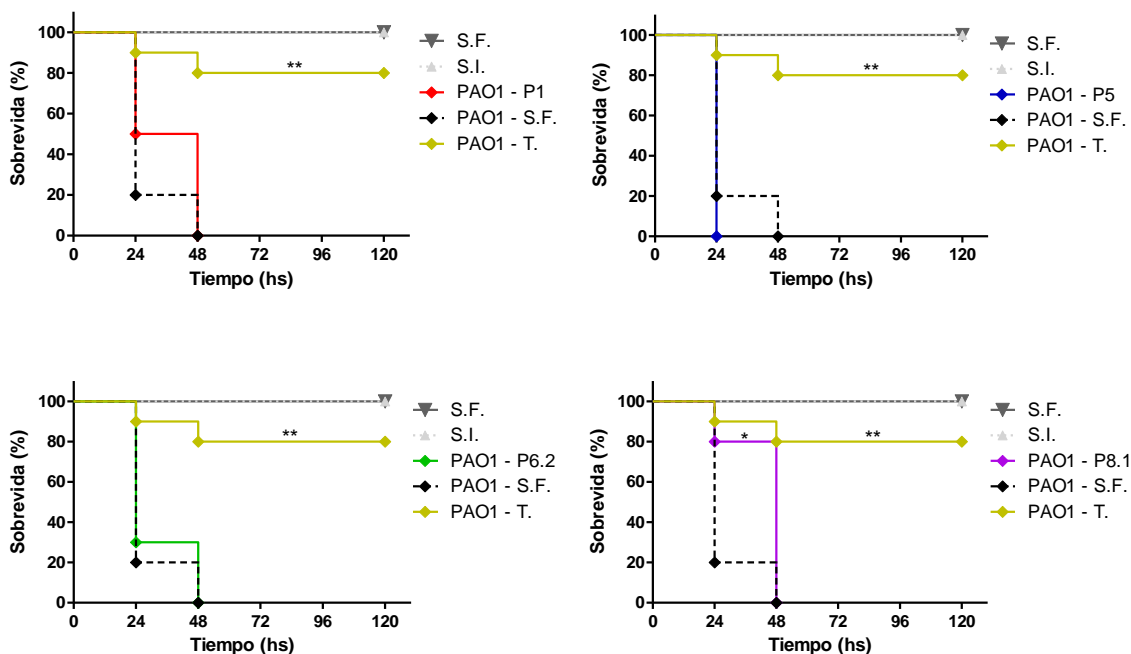


Figura 32 – Evaluación *in vivo* de los PAMs frente a *P. aeruginosa* PAO1 - Las larvas fueron infectadas con 10^3 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; SI: sin inyección; T: tobramicina. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “log rank test”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (PAO - S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$

En la Figura 32 se presentan las curvas de sobrevivencia. Para simplificar la visualización de los efectos del tratamiento con los PAMs, se muestran cuatro gráficos separados, uno para cada PAM evaluado. Sin embargo, todas las curvas pertenecen al mismo experimento y los controles graficados son los mismos para los cuatro gráficos.

El análisis estadístico se realizó comparando los tratamientos contra el control, en este caso el grupo de larvas infectadas y que luego recibieron solución fisiológica como placebo. El tratamiento con tobramicina aumentó la sobrevivencia de las larvas, observándose un 80% de sobrevivencia al final del ensayo. En cuanto a los PAMs, sólo P8.1 mostró diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo control. La principal diferencia entre estos grupos es que a las 24hs, el grupo tratado con P8.1 presentó 80% de sobrevivencia, mientras que el control mostró solamente 20%. Sin embargo, a las 48hs, para ambos grupos se observó muerte total de las larvas.

Evaluación de los PAMs *in vivo* frente a *S. aureus* ATCC25923

Para el modelo de infección con *S. aureus* se estableció una dosis de infección de 10^6 UFC/larva. Estudios previos sobre agentes antiestafilocócicos han reportado infecciones en GM por *S. aureus* en dosis similares, ya que esta especie bacteriana es poco virulenta para el insecto[136,137]. El antibiótico control (vancomicina) o los PAMs fueron administrados una hora después de la infección en dosis única de 10mg/k.

Como puede observarse en la Figura 33, el tratamiento con vancomicina aumentó la sobrevivencia de las larvas de forma significativa. Sin embargo, ninguno de los PAMs mejoró la sobrevivencia de las larvas respecto del grupo control (S.a. – S.F.), en las concentraciones evaluadas.

Tanto en el modelo de infección con *P. aeruginosa* PAO1 como *S. aureus* ATCC25923, los PAMs fueron evaluados en la dosis más baja de las utilizadas en

el ensayo de toxicidad. Por lo tanto, en los próximos trabajos se tiene previsto llevar a adelante la evaluación usando otras concentraciones de PAMs frente a ambas cepas.

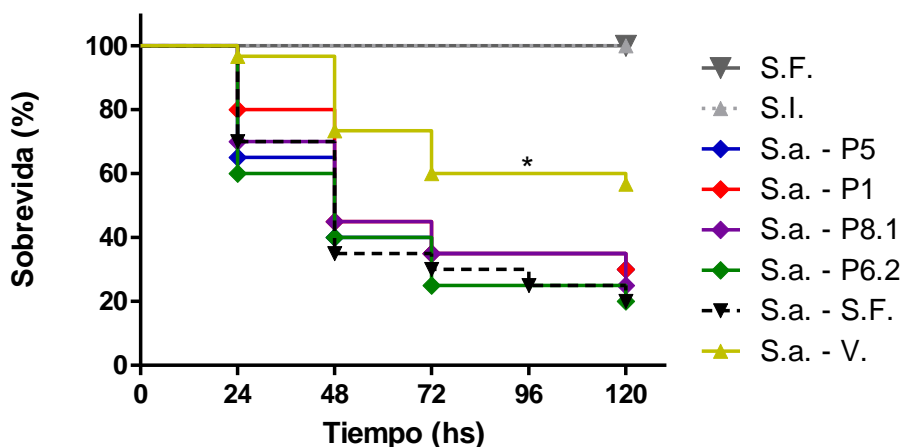


Figura 33 – Evaluación *in vivo* de los PAMs frente a *S. aureus* - Las larvas fueron infectadas con 10^6 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; SI: sin inyección; V: vancomicina. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “*log rank test*”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (S.a. + S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$. Datos agrupados de dos experimentos independientes. N=10 por grupo, por experimento.

Evaluación de los PAMs *in vivo* frente a *P. aeruginosa* M13513

Dado que la actividad de los PAMs es dependiente de la cepa (Anexo I), para su evaluación en el modelo de GM frente al aislamiento clínico se decidió utilizar aquellos péptidos que previamente habían demostrado actividad sinérgica y efecto bactericida en combinación con meropenem (Capítulo 2). Estos PAMs fueron P5 y P6.2. En primer lugar se evaluó la actividad de cada péptido de forma individual y luego se analizó la actividad sinérgica con meropenem *in vivo*.

Ambos péptidos fueron evaluados en cinco concentraciones diferentes: 5, 10, 20, 40 y 80mg/k. Como antibiótico control se utilizó meropenem 12mg/k.

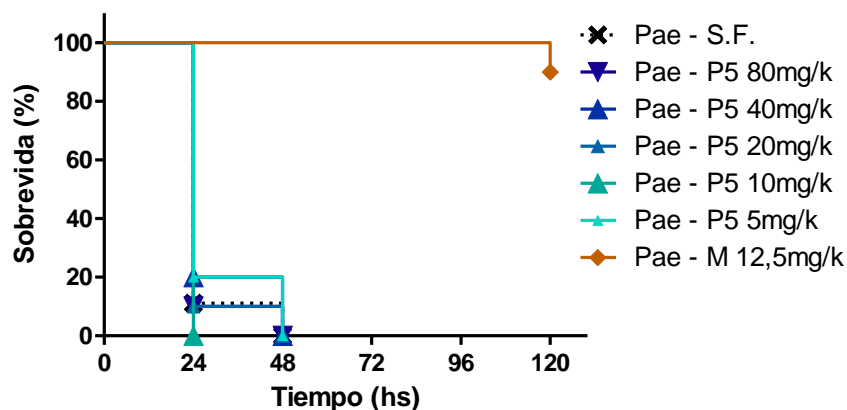


Figura 34 – Evaluación *in vivo* de P5 frente a *P. aeruginosa* M13513 - Las larvas fueron infectadas con un inóculo de 10^3 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; M: meropenem. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “log rank test”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (Pae + S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$. Datos agrupados de dos experimentos independientes. N=10 por grupo, por experimento.

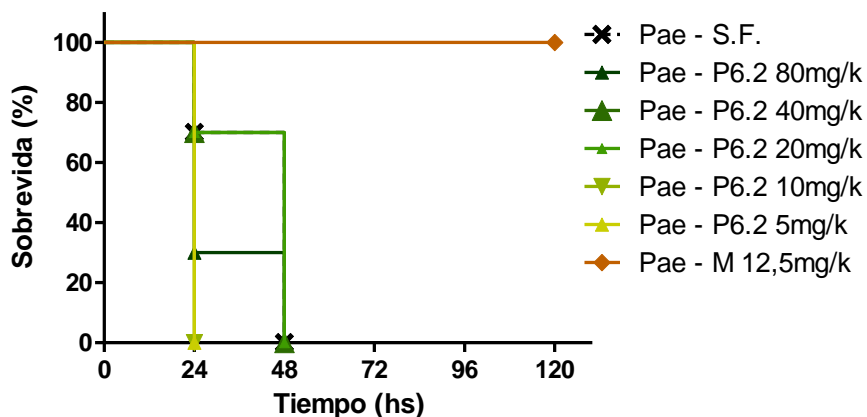


Figura 35 – Evaluación *in vivo* de los P6.2 frente a *P. aeruginosa* M13513 - Las larvas fueron infectadas con 10^3 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; M: meropenem. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “log rank test”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (Pae + S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$. Datos agrupados de dos experimentos independientes. N=10 por grupo, por experimento.

Como puede observarse en la Figura 34, el tratamiento con distintas concentraciones P5 no aumentó la sobrevida de las larvas infectadas con el aislamiento clínico, en tanto que con meropenem 12mg/k se obtuvo 90% de sobrevida a las 120hs.

En el caso de P6.2, tampoco se observó aumento de sobrevida en las concentraciones evaluadas, en tanto que con meropenem 12,5 mg/k se obtuvo 100% de sobrevida a las 120hs (Figura 35).

Evaluación de actividad sinérgica *in vivo* entre P5 y Meropenem

A pesar que un agente antimicrobiano no posea actividad al ser administrado solo, puede sin embargo poseer actividad sinérgica en combinación con otro antimicrobiano. En este trabajo, si bien no se observó aumento de sobrevida de las larvas tratadas con los PAMs, se decidió evaluar la posible actividad sinérgica con meropenem, ya que en los ensayos *in vitro* previamente descritos se había observado sinergia de P5 y P6.2 con meropenem, sobre *P. aeruginosa* M13513

Para evaluar esta posibilidad, se analizaron combinaciones de PAMs con meropenem, a concentraciones por debajo de la CIM. Para esto se probaron tres combinaciones: los PAMs se evaluaron en 5, 10 y 20 mg/k combinados con meropenem siempre en 2,5mg/k.

Estas dosis fueron determinadas de manera empírica, confirmando que sean no efectivas por si solas. Antes de realizar los ensayos se hicieron pruebas de sobrevida con diferentes concentraciones de meropenem y se observó que en dosis por debajo de 12,5mg/k los resultados de viabilidad eran variables y recién en 2,5mg/k se obtenía 10-20% de sobrevida al final del ensayo. Para evaluar sinergia *in vitro* se utilizan combinaciones de antibióticos en concentraciones diversas, siendo las sinérgicas aquellas que son efectivas en concentraciones por debajo de la CIM. Por lo tanto, para el ensayo *in vivo* se decidió utilizar una dosis de meropenem que no lograra el 100% de sobrevida, pero que presentara un poco

de actividad remanente, de modo tal de poder visualizar el posible aumento de sobrevida comparado frente a una combinación de antimicrobianos.

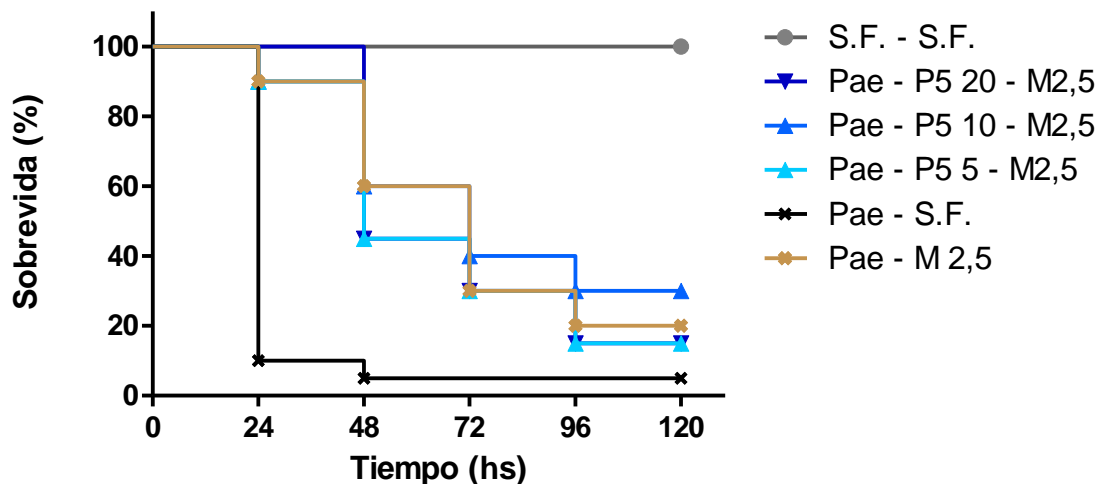


Figura 36 – Evaluación *in vivo* de posible sinergia entre P5 y meropenem frente a *P. aeruginosa* M13513 - Las larvas fueron infectadas con 10^3 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; M: meropenem. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el "log rank test". La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (Pae + S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$

Todas las combinaciones de P5-meropenem mostraron aumento de sobrevida respecto del grupo infectado sin tratamiento antimicrobiano (Pae – S.F.). Sin embargo, la sobrevida de los grupos de las combinaciones no presentó diferencia significativa respecto del grupo al que sólo se le administró meropenem 2,5mg/k. Por lo tanto no se le podría atribuir el aumento de sobrevida a la combinación ya que su efecto fue estadísticamente igual al de meropenem sólo (Figura 36).

Evaluación de actividad sinérgica *in vivo* entre P6.2 y meropenem

Al igual que para P5, todas las combinaciones de P6.2-meropenem (Figura 37) mostraron aumento de sobrevida respecto del grupo infectado sin tratamiento antimicrobiano (Pae – S.F.). Pero en este caso, al comparar con el grupo al que sólo se le administró meropenem 2,5mg/k, se observó que la combinación P6.2

10mgk con meropenem 2,5mg/k presentó diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0,01$). Para corroborar estos datos se proyecta realizar nuevos experimentos con un número mayor de grupos y de larvas para confirmar los resultados observados.

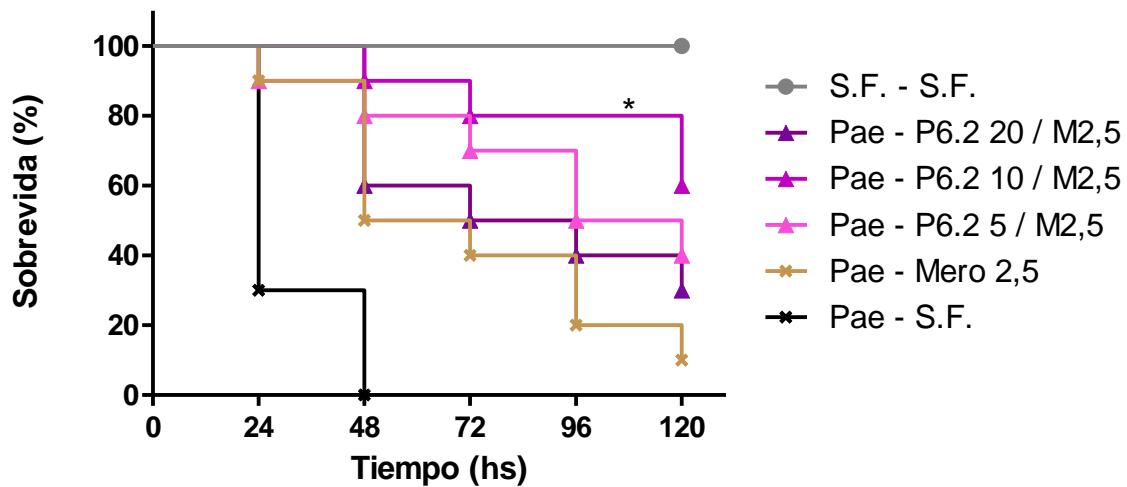


Figura 37 – Evaluación *in vivo* de posible sinergia entre P5 y meropenem frente a *P.aeruginosa* M13513 - Las larvas fueron infectadas con 10^3 UFC/larva. Una hora después de la infección se administró péptido o antibiótico. SF: solución fisiológica; M: meropenem. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “log rank test”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales de cada grupo contra el control (PAO + S.F.), a partir de la cual se definió * $p < 0,01$

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4

- Se pudo poner a punto el modelo de infección en larvas de *Galleria mellonella*, tanto para las cepas de referencia (*P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* ATCC25923), como para el aislamiento clínico (*P. aeruginosa* M13513).
- La administración de PAMs por vía directa a la hemolinfa de las larvas no afectó la viabilidad de las mismas.
- Solamente P8.1 mostró actividad *in vivo* en el modelo de infección con *P. aeruginosa* PAO1. Ninguno de los otros PAMs aumentó la sobrevivencia de las larvas en ninguno de los tres modelos, en las dosis evaluadas. Sin embargo no se analizaron otras concentraciones de PAMs potencialmente efectivas, por lo que se proyecta realizar esos estudios a futuro.
- En cuanto a la actividad sinérgica, la combinación de P6.2 10mg/k con meropenem 2.5mg/k pareciera tener efecto sinérgico. Se requieren más experimentos con mayor número de larvas para comprobar de manera fehaciente la efectividad de la terapia combinada.

CAPÍTULO 5

***Análisis de un mecanismo de
protección mediado por NDM-1
en *Galleria mellonella*.***

INTRODUCCIÓN

Los carbapenemes son antibióticos pertenecientes al grupo de β -lactámicos, que se utilizan como último recurso para combatir bacterias resistentes a múltiples fármacos. Sin embargo, su eficacia está siendo amenazada por la gran diseminación global de carbapenemasas, entre las enterobacterias y *Acinetobacter*. Dentro de las carbapenemasas, las metalo- β -lactamasas (MBL) son de gran importancia, ya que aún no se han desarrollado agentes terapéuticos inhibidores para estas enzimas [138].

Las MBL son, en general, enzimas periplásmicas solubles, que necesitan la presencia de iones metálicos de Zn (II) para unirse e hidrolizar antibióticos β -lactámicos. Condiciones de carencia del cofactor metálico reducen la actividad y la vida media de la enzima. Entre las MBL se destaca la Nueva Delhi Metalo- β -lactamasa (NDM-1) que, en particular, se encuentra unida a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y posee gran estabilidad. Es la MBL que ha alcanzado la extensión geográfica más rápida y más grande, involucrando actualmente a más de 70 países [139].

Los doctores Lisandro González y Alejandro Vila, investigadores de CONICET, pertenecientes al Laboratorio de Metaloproteínas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario; han abordado el tema de la resistencia antimicrobiana enfocándose en la caracterización de las metalo- β -lactamasas, en particular en la carbapenemasa NDM-1. En un trabajo previo [140] demostraron que el anclaje a la membrana es lo que le otorga a la enzima su estabilidad inusual y, además, promueve su secreción en vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés). En ese trabajo, los autores postularon que las OMVs que poseen NDM-1 podrían proteger a poblaciones bacterianas cercanas, y que las OMVs de aislamientos clínicos que expresan NDM-1 pueden llevar no sólo a la enzima MBL, sino también al gen que la codifica.

Como última parte de este trabajo de tesis doctoral, se propuso evaluar *in vivo* en el modelo de GM, un posible mecanismo de protección mediado por NDM-1

anclada a vesículas de membrana externa. En particular, el objetivo de este capítulo fue i) evaluar si la presencia de OMVs con NDM-1 es capaz de brindar protección frente a un tratamiento por meropenem a una cepa de *E. coli* sensible causante de infección, y ii) evaluar si existe protección cruzada en una co-infección entre cepas de *E. coli* productoras OMVs con NDM-1 y una cepa de *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes.

MATERIALES Y METODOS

Inocuidad de vesículas con y sin NDM-1

Para evaluar los efectos de la administración de vesículas de membrana externa (OMVs) en larvas de GM, en principio, se realizó un ensayo de inyección de OMVs portadoras NDM-1 (OMVs_NDM-1) y OMVs sin la enzima (OMVs_SE), y se evaluó la sobrevivencia de las larvas por 5 días. Las OMVs fueron obtenidas de cultivos de *E. coli* productoras de estas vesículas. Se trabajó con grupos de 10 larvas cada uno, a los que se les administró 10µl de OMVs con o sin enzima (366µg/ml), o bien solución fisiológica, inyectadas a través de la última propata izquierda. Además se agregó un grupo control de lote de larvas, que no recibió inyecciones. Las larvas se incubaron a 37°C, en oscuridad y se registró el estado de las larvas diariamente.

Protección de *E. coli* sensible por OMVs_NDM-1

Las larvas fueron inoculadas con una mezcla de *E. coli* ATCC 25922 (sensible a meropenem) y OMVs_NDM-1 u OMVs_SE (purificadas de cultivos de *E. coli* DH5α productora de NDM-1 anclada a membrana. A través de la última propata izquierda se inyectó una mezcla de 5 µl de una suspensión bacteriana de 2×10^8 UFC/ml y 5 µl de vesículas (366µg/ml). Una hora después de la infección, se administraron 10 µl de meropenem (10 mg/k), a través de la última propata derecha. También se trabajó con un grupo infectado sólo con *E. coli* ATCC 25922 que no recibió OMVs, tratado con meropenem o solución fisiológica. Las larvas se incubaron a 37 °C durante 5 días y se registraron diariamente los eventos de muerte en cada grupo.

Concentración mínima de OMVs

Con el objetivo de definir la concentración mínima de OMV_NDM-1 necesaria para ejercer protección *in vivo* sobre una cepa bacteriana sensible, se probaron cuatro diluciones seriadas al medio a partir del stock de purificación de las OMVs:

366; 183; 91,5 y 47,5 µg/ml. La infección y tratamiento se realizaron de la misma forma detallada en el ensayo previamente descrito.

Estabilidad de OMVs en el tiempo

Para probar la estabilidad *in vivo* de las OMVs_NDM-1, se evaluó la actividad enzimática de vesículas inyectadas a distintos tiempos pre-infección con *E. coli* ATCC 25922. Las OMVs_NDM-1 fueron administradas 22 y 6 horas antes, o en el mismo momento de la infección. Una hora pos-infección se administró meropenem 10 mg/k. También se trabajó con un grupo infectado sólo con *E. coli* ATCC 25922 que no recibió OMVs, tratado con meropenem o solución fisiológica. Se trabajó con grupos de 10 larvas cada uno, los cuales fueron incubados a 37 °C, durante 5 días, registrando diariamente los eventos de muerte.

Actividad de NDM-1 en OMVs vs proteína NDM-1 purificada

Se procedió de forma similar al ensayo previamente descrito, pero en este caso comparando la actividad de las OMVs_NDM-1 vs. la enzima NDM-1 purificada de cultivo de *E. coli* productora de NDM-1 de forma soluble. Ambas formas de la enzima fueron administradas 6 horas pre-infección.

Evaluación *in vivo* de las variante de *E. coli* que expresan NDM-1

Se trabajó con 4 variantes de cepas mutantes de *E. coli* ATCC25922, realizadas en el IBR por el Dr. Lisandro González. Las distintas variantes difieren en la forma de expresión de la metalo-β-lactamasa, según se indica a continuación:

- *E. coli* ATCC 25922 NDM-1: enzima NDM-1 *wild type* (wt) que se expresa anclada a la cara interna de la membrana externa; secreta NDM-1 en OMVs.
- *E. coli* ATCC 25922 C26A: variante de la enzima NDM-1 no lipidada que se encuentra de forma soluble en espacio periplásmico y también es secretada al medio extracelular.

- *E. coli* ATCC 25922 Δ degP NDM-1: expresión aumentada de OMVs por inactivación insercional con un cassette Cm; expresa OMVs cien veces más que la cepa *wt*.

- *E. coli* ATCC 25922 pMBLe: contiene el plásmido pMBLe y no expresa metalo- β -lactamasa. Este plásmido fue utilizado para obtener todas las construcciones genéticas de las variantes de NDM-1.

El procedimiento para realizar los ensayos de sobrevida con las variantes de *E. coli* fue similar al descrito previamente para los modelos de infección en GM. El inóculo utilizado en este caso fue de 10^8 UFC/ml. A todos los grupos se le administró meropenem (10mg/k) o solución fisiológica para el grupo control de infección.

Para preparar el inóculo bacteriano las cepas se crecieron en medio LB, suplementado con IPTG 20 μ M y gentamicina 30 μ g/ml. Se realizó un cultivo ON y luego un subcultivo al 2% hasta fase exponencial. Los cultivos fueron lavados dos veces con solución fisiológica y ajustados por medición de DO₆₀₀. A las suspensiones bacterianas que se utilizaron para inocular las larvas se les agregó IPTG 20 μ M. Se trabajó con n=10 en cada grupo y las larvas fueron incubadas a 37°C por cinco días, registrando eventos de muerte de forma diaria.

Transformación de *P. aeruginosa* PAO1

Se prepararon células competentes de *P. aeruginosa* PAO1. Para ello se realizó un cultivo ON en medio LB. Se separaron 6 ml del cultivo en alícuotas de 1,5ml y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1-2 min a 16.000 \times g. Luego cada uno de los precipitados fue lavado dos veces con 1 ml de solución de sacarosa 300 mM y se resuspendió todo en un volumen final de 100 μ l, conteniendo aproximadamente 10^9 - 10^{10} bacterias viables. Se agregaron 2 μ l de una solución de plásmido pBBR1 MCS2 con resistencia a kanamicina, 50ng/ml (100 ng de ADN), y luego se electroporó. Para la electroporación se utilizaron las siguientes condiciones: 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Luego del pulso de electroporación se agregó 1ml de medio LB a temperatura ambiente, se traspasó a un tubo de

vidrio y se incubó en agitación a 37°C por 2 hs. La muestra se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, se quitaron 900µl del sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el sobrante de medio. La selección de clones resistentes se realizó por plaqueo en medio LB agar con y sin kanamicina 1000µg/ml. Como controles se sembraron células competentes sin electroporar y células competentes electroporadas sin ADN.

Protección cruzada entre *E. coli* productora de NDM1 y *P. aeruginosa*

POA1 KnR

Se realizó un ensayo de co-infección en larvas para evaluar la posible protección cruzada entre una cepa resistente a meropenem por ser productora de NDM-1 y otra cepa sensible al carbapeneme. Se trabajó con las mismas variantes de cepas productoras de MBL que en el ensayo descrito previamente, realizando el mismo procedimiento de infección y tratamiento con antibiótico/solución fisiológica. Las larvas fueron incubadas a 37°C por 24 hs.

En este caso, luego de la incubación, se evaluó la carga microbiana realizando recuentos de UFC/ml de cada una de las cepas co-infectadas. Para ello se realizó un homogenizado de cada larva como se detalla a continuación. De cada grupo se tomaron 5 larvas al azar, se sumergieron en etanol 70% y se agito con vórtex por 30 segundos. Se dejaron secar sobre un refrigerante cubierto con papel absorbente y cada oruga fue colocada en un microtubo de 1,5ml con 300 µl de solución fisiológica. Se homogenizó con vástago y se agregaron 300 µl más de solución fisiológica. A partir 30 µl de cada homogenizado se realizaron diluciones seriadas al décimo en placas de 96 pocillos y luego cada dilución fue sembrada en LB agar con antibiótico para la selección diferencial de las cepas co-infectadas. Se sembró por método de la gota (50µl), por triplicado. Se utilizó gentamicina 200µg/ml para los recuentos de *E. coli* y kanamicina 1000µg/ml para los recuentos de *P. aeruginosa*. Las placas se incubaron a 37°C por 24 hs y luego se realizó el recuento de UFC/larva.

RESULTADOS

Inocuidad de vesículas

En una primera instancia se utilizaron OMVs portadoras NDM-1 (OMVs_NDM-1) y OMVs sin la enzima (OMVs_SE), purificadas de cultivos de *E. coli* productoras de estas vesículas. Se evaluó la inocuidad de éstas OMVs en larvas de GM y se pudo observar que no son letales aún 120 hs después de la inyección, en la concentración utilizada. Sin embargo, se observó que luego de la inyección de OMVs, las larvas presentaron el típico cambio de color debido a la pigmentación que produce el proceso de melanización de la respuesta inmune en estos insectos. Cabe destacar que los cambios de coloración observados fueron leves y también esperables, debido a que las vesículas están constituidas por componentes de la membrana externa de la bacteria que la secreta. Sin embargo, como puede apreciarse en la siguiente tabla, la administración de OMVs no afectó la viabilidad de las larvas en los 5 días de seguimiento del experimento.

GRUPO	Viabilidad a la 120hs
Sin inyectar	100%
Sc. fisiológica	100%
OMVs_SE	100%
OMVs_NDM-1	100%

Tabla 7 - Efecto de las OMVs en la viabilidad de las larvas de GM

Protección de *E. coli* sensible por OMVs_NDM-1

Posteriormente se propuso evaluar si las OMVs_NDM-1 podían proteger frente a un tratamiento con meropenem a una cepa de *E. coli* sensible en un modelo de infección *in vivo*. Para ello se infectaron larvas de GM con la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (2×10^6 UFC/larva) conjuntamente con OMVs_NDM-1 (366ug/ml), y una hora después se administró meropenem (10mg/kg) en la dosis habitual usada para la eliminar la infección y obtener el 100% de sobrevivida (Figura 38). Por otro lado, otro grupo de larvas se infectó con la misma cepa pero acompañada de OMVs_SE

y se administró meropenem de la misma forma que el grupo anterior. Como controles se utilizaron larvas infectadas con la cepa sensible, tratadas con meropenem o solución fisiológica, y un control de manipulación de larvas, inyectadas con solución fisiológica. En este primer experimento se utilizó la concentración de OMVs_NDM-1 más elevada con la que contábamos, que es la obtenida en el proceso de purificación (366 µg/ml, 10 µl por larva). Asimismo, se utilizó una concentración equivalente de OMVs_SE, calculada en función de la masa de proteínas totales. En la Figura 39 se observan las curvas de sobrevida del ensayo.

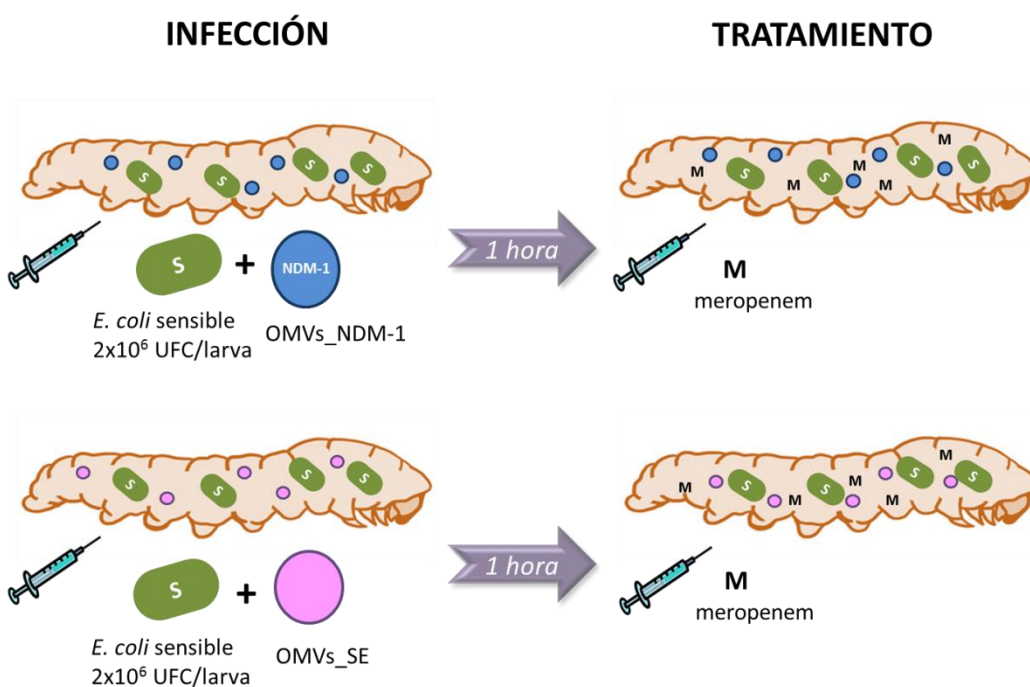


Figura 38 - Diagrama experimental - Protección de *E. coli* sensible por OMVs_NDM-1 - Larvas de GM infectadas con *E. coli* ATCC 25922 + OMVs_SE u OMVs_NDM-1, y posteriormente tratadas con meropenem 10mg/kg.

En el grupo de larvas infectadas con *E. coli* ATC25922 (2×10^6 UFC/larva) que no recibieron tratamiento con antibiótico ni fueron inoculadas con OMVs, se observó 10% de sobrevida, demostrando que la cepa utilizada es capaz de infectar y matar a las larvas en las concentraciones ensayadas (Figura 39). Por otra parte, el grupo infectado al que no se le administraron OMVs y sí recibió

tratamiento con meropenem, presentó un porcentaje de sobrevida del 80%, corroborando la sensibilidad de la cepa al antibiótico administrado.

El grupo al que se le inyectó *E. coli* ATCC25922 en conjunto con OMVs_NDM-1 mostró resistencia al tratamiento con meropenem. La presencia de OMVs_NDM-1 permitió la infección por la cepa sensible a carbapenemes, inclusive en presencia de meropenem, generando el 100% de muerte de las larvas a las 24hs (Figura 39). Por el contrario, el grupo infectado con *E. coli* ATCC 25922 junto con OMVs_SE mostró un 80% de sobrevida, indicando que las bacterias no tuvieron protección frente al tratamiento con meropenem. El porcentaje de sobrevida observado fue similar al grupo infectado con *E. coli* y tratado con antibiótico. Por lo tanto, podemos concluir que la presencia de OMVs_NDM-1 es capaz de proteger a una cepa de *E. coli* sensible a meropenem, y permite que ésta desarrolle la infección en presencia de concentraciones de antibiótico suficientes para tener una eliminación efectiva de las bacterias. Esta protección está relacionada con la presencia de NDM-1 que estaría hidrolizando el meropenem utilizado como tratamiento.

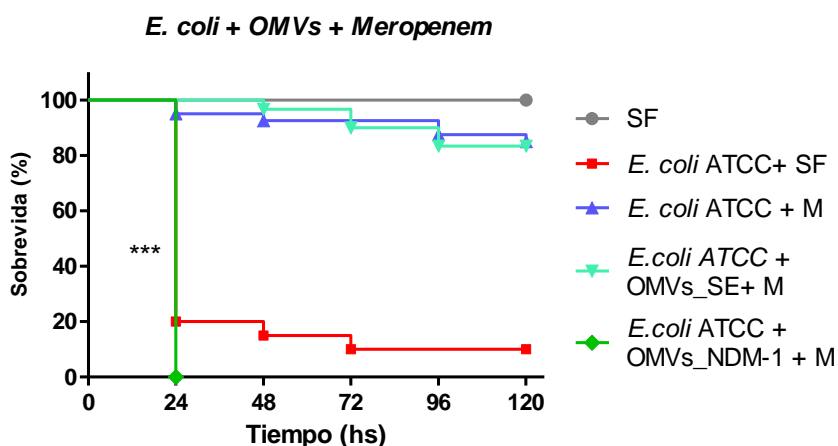


Figura 39 - Curvas de sobrevida - Protección de *E. coli* sensible por OMVs_NDM-1. Larvas de GM infectadas con *E. coli* ATCC + OMVs_SE u OMVs_NDM-1, y posteriormente tratadas con meropenem 10mg/kg. SF: solución fisiológica. M: meropenem. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el "log rank test". La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones de los grupos contra el control (*E. coli* + M), a partir de la cual se definió $***p < 0,0001$.

Concentración mínima de OMVs

Luego de comprobar que las OMVs_NDM-1 podían proteger a la cepa de *E. coli* sensible a meropenem, se decidió evaluar cuál era la mínima concentración de OMVs necesaria para otorgar dicha protección al tratamiento con 10 mg/k de meropenem. Para ello, se repitió el ensayo anterior probando cuatro concentraciones de OMVs_NDM-1, realizando 3 diluciones seriadas al medio a partir del stock purificado.

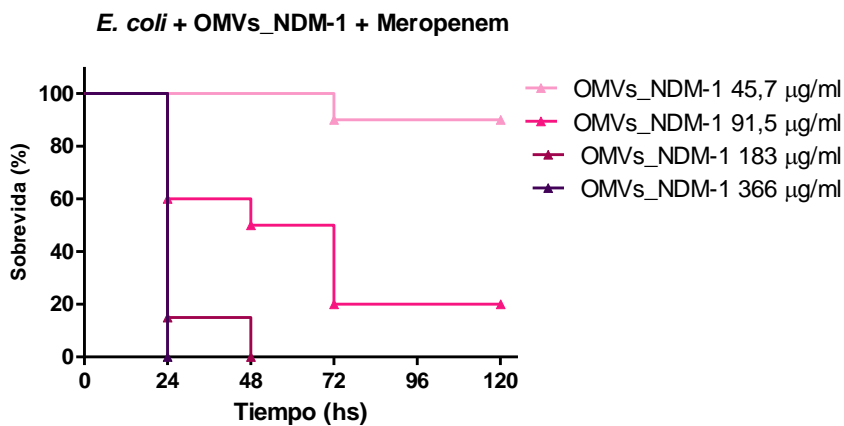


Figura 40 - Determinación de la cantidad mínima OMVs_NDM-1 necesaria para obtener 0% de supervivencia, en una infección con *E. coli* sensible y tratamiento con meropenem.

En la Figura 40 se puede observar una relación directamente proporcional entre la concentración de OMVs_NDM-1 administrada y la resistencia a 10 mg/k de meropenem, medida como porcentaje de muerte de las larvas. A medida que disminuye la concentración de OMVs_NDM-1, disminuye la viabilidad de *E. coli* sensible y se observa una mayor supervivencia de larvas. A partir de este ensayo, se estableció 183µg/ml como la concentración mínima para otorgar resistencia a meropenem, administrado en una dosis única de 10µl/larva, ya que esta es la mínima cantidad de OMVs_NDM-1 que produjo 100% de muerte de las larvas. Posteriormente, todos los ensayos se realizaron con esta concentración de OMVs_NDM-1.

Estabilidad de OMVs

Luego de comprobar la actividad de OMVs_NDM-1 en el modelo de infección en larvas, se decidió evaluar si la NDM-1 anclada a OMVs podía mantener su actividad luego de permanecer un largo periodo de tiempo en la hemolinfa de las larvas. Con este objetivo, se realizó un ensayo similar al previamente descrito, pero en este caso la inyección de OMVs se realizó a distintos tiempos antes de la inoculación con *E. coli* ATCC 25922; 22, 6 y 0 horas antes de la inoculación.

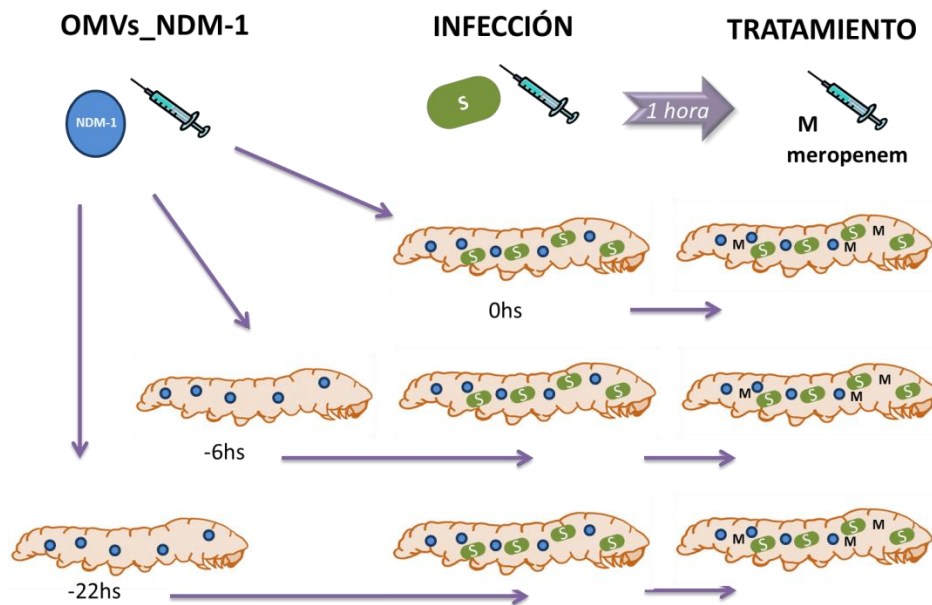


Figura 41 - Diagrama experimental – Estabilidad de las OMVs. Las vesículas de membrana externa fueron administradas a las larvas a diferentes tiempos pre-infección (22, 6 y 0 hs pre-inoculación). Luego se infectó con *E. coli* ATCC 25922 sensible a carbapenemes y una hora después se administró 10 mg/kg de meropenem.

Como se observa en la Figura 42, las OMVs_NDM-1 inyectadas 22 hs antes de la inoculación con *E. coli* ATCC25922, mostraron pérdida de la actividad carbapenemasa, es decir menor protección de las bacterias frente al antibiótico. De hecho, la curva de supervivencia de este grupo es similar a la del grupo control “*E. coli* + M”. Cuando las OMVs_NDM-1 fueron inyectadas 6 horas antes de la inoculación, también se observó pérdida de actividad enzimática, pero en este caso la supervivencia de las larvas disminuyó considerablemente, llegando al 15% de

sobrevida de larvas al final del ensayo (120hs). En cuanto a las OMVs_NDM-1 inyectadas 0hs antes de la inoculación, tal como se esperaba, se obtuvo 0% de supervivencia de las larvas a las 48 hs, demostrando la protección de las bacterias. Estos resultados muestran que en la hemolinfa de las larvas se produce una pérdida gradual de actividad betalactamasa, y que cuanto más tiempo pasan las OMVs en la hemolinfa, menos actividad enzimática presenta la NDM-1.

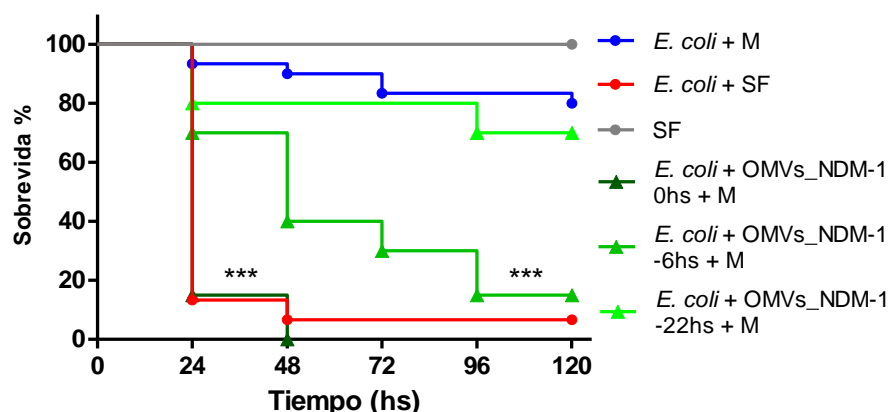


Figura 42 - Efecto de la pre-incubación de las OMVs_NDM-1 en la hemolinfa de larvas a distintos tiempos. S: solución fisiológica; M: meropenem. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el "log rank test". La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones de los grupos contra el control (*E. coli* + M), a partir de la cual se definió $*** < 0,0001$

Actividad enzimática de OMVs_NDM-1 vs. NDM-1 soluble

Para poder responder si el anclaje de la MβL a membrana de la OMV le otorga más estabilidad a la enzima con respecto a la NDM-1 soluble, se realizó el mismo ensayo de infección con la cepa de *E. coli* ATCC25922 sensible a meropenem, y se comparó la actividad de las OMVs_NDM-1 vs. NDM-1 soluble. En base a los resultados obtenidos a distintos tiempos con OMVs_NDM-1, se decidió realizar este ensayo inyectando la NDM-1 (soluble o anclada a OMVs) 6 horas antes de la inoculación con *E. coli*.

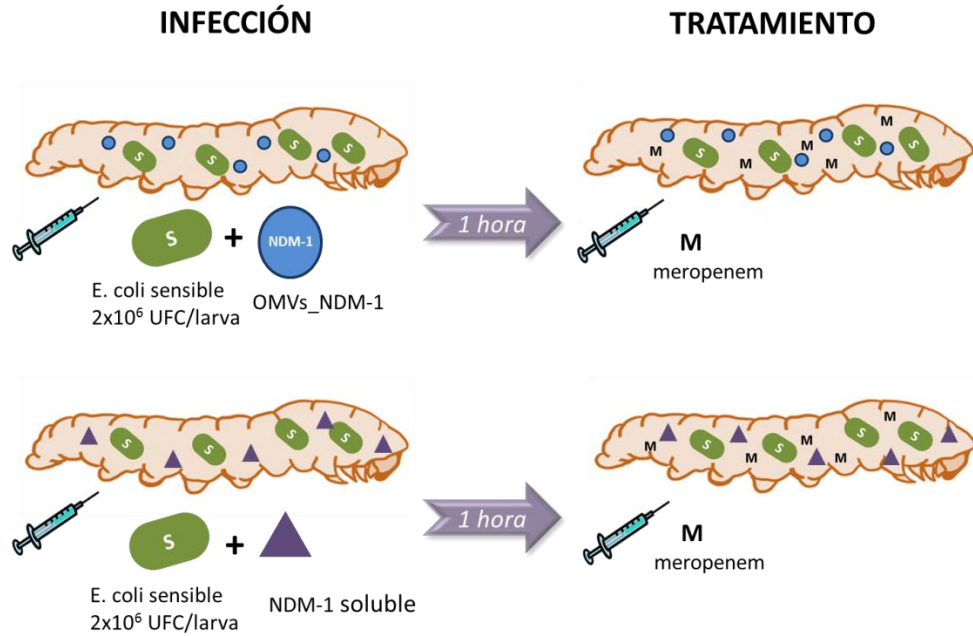


Figura 43 - Diagrama experimental – Actividad enzimática de OMVs_NDM-1 vs. NDM-1 soluble

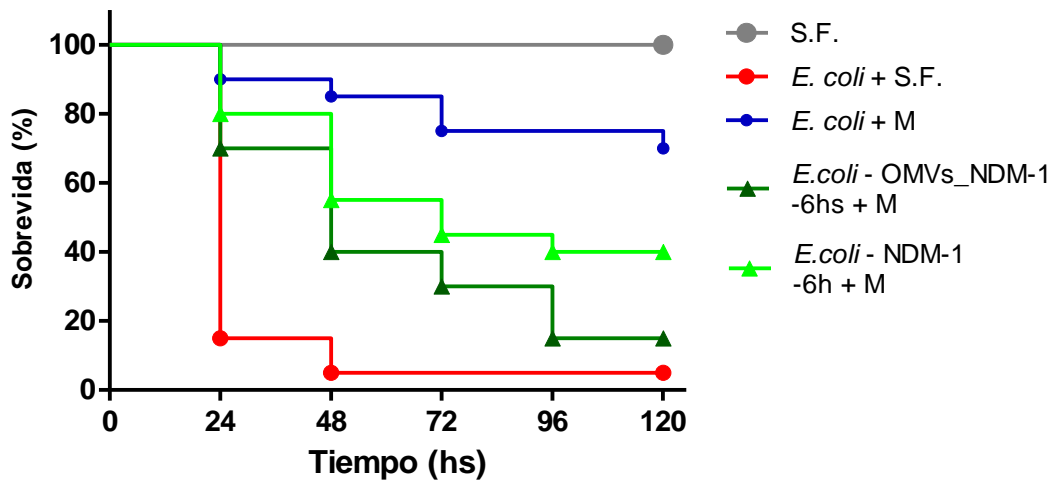


Figura 44 - Comparación *in vivo* de la protección ejercida por las OMVs_NDM-1 vs. NDM-1 soluble. Las vesículas o proteína soluble fueron administradas 6 hs previo a la infección con *E. coli* sensible a carbapenemes. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el "log rank test". La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones individuales entre grupos.

Como se puede observar en el gráfico de sobrevivencia de larvas (Figura 44), al inyectar la NDM1 tanto anclada a vesículas como en su forma soluble 6 hs antes de la inoculación con *E. coli*, disminuye la actividad enzimática. La curva de la proteína purificada muestra mayor sobrevivencia de larvas (menor actividad carbapenemasa) que la curva de la NDM-1 anclada a vesícula. Esto podría indicar que las OMVs_NDM-1 confieren mayor estabilidad a la enzima NDM-1 respecto de la NDM-1 soluble, incrementando la protección de la cepa de *E. coli* sensible a meropenem, aunque la diferencia no posee significancia estadística.

Descripción de construcciones genéticas de *E. coli* productoras de NDM-1

Para ahondar en el mecanismo involucrado en la protección de cepas sensibles por OMVs, decidimos evaluar en el modelo de infección *in vivo* si la producción de OMVs_NDM-1 por una cepa bacteriana resistente es capaz de brindar protección cruzada a una cepa sensible, en condiciones de co-infecciones. Para ello se realizaron co-infecciones simultáneas de *E. coli* secretora de OMVs_NDM-1 y *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes.

Para ello se construyeron cepas de *E. coli* que secretan cantidades variables de NDM-1 en OMVs (con resistencia variables a carbapenemes). A tal fin se transformó *E. coli* ATCC25922 con un plásmido que expresa NDM-1 salvaje y es secretada eficientemente en OMVs; a esta cepa la denominamos *E. coli* NDM-1 *wt*. Otra variante fue construida sobre la misma cepa pero en este caso con un plásmido que expresa NDM-1 soluble dirigida al espacio periplásmico y con secreción limitada al medio extracelular, a la que denominamos *E. coli* NDM-1 C26A. En una tercera variante se construyó una cepa hyperproductora de OMVs que expresa la NDM-1 salvaje; en este caso la enzima se secreta anclada a las OMVs pero esta cepa produce mayor cantidad de OMVs que la *wt* (>100X). A esta tercera variante la denominamos $\Delta degP$ NDM-1 (Figura 45). Como control en los ensayos se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922 transformada con el plásmido pMBLe sin el gen de NDM-1, la cual fue denominada *E. coli* pMBLe.

CEPA	CIM Meropenem (µg/ml)	Secreción de NDM-1 en OMVs	Producción bacteriana de OMVs
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,032	No	Estándar
<i>E. coli</i> NDM-1 wt	65,6	Si	Estándar
<i>E. coli</i> NDM-1 C26A	8,2	Muy bajo (se secreta además enzima soluble al MEC)	Estándar
<i>E. coli</i> ΔdegP NDM-1	32,8	Si	Aumentada (>100X)
<i>E. coli</i> pMBLe	0,032	No	Estándar

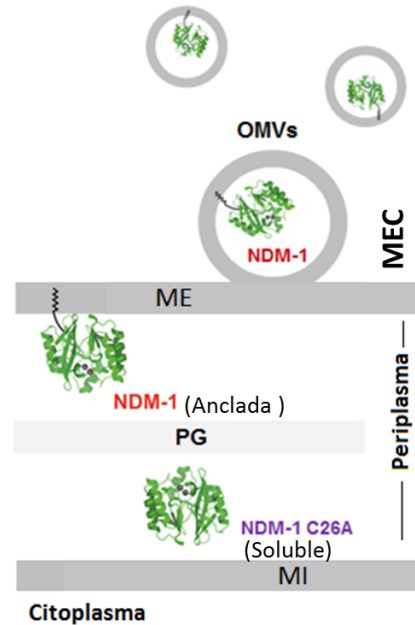


Figura 45 - Características de las variantes genéticas de *E. coli*. MEC: medio extra extracelular; ME: membrana externa; MI: membrana interna; PG: peptidoglicano.

Ensayos de sobrevivencia en GM con las variantes genéticas de *E. coli*

En primer lugar decidimos probar la efectividad de las variantes de *E. coli* con resistencia a carbapenemes en el modelo de infección. Se realizaron ensayos de sobrevivencia con las nuevas cepas de *E. coli* y a cada grupo se le administró meropenem o solución fisiológica. Se evaluaron las variantes wt, C26A y pMBLe.

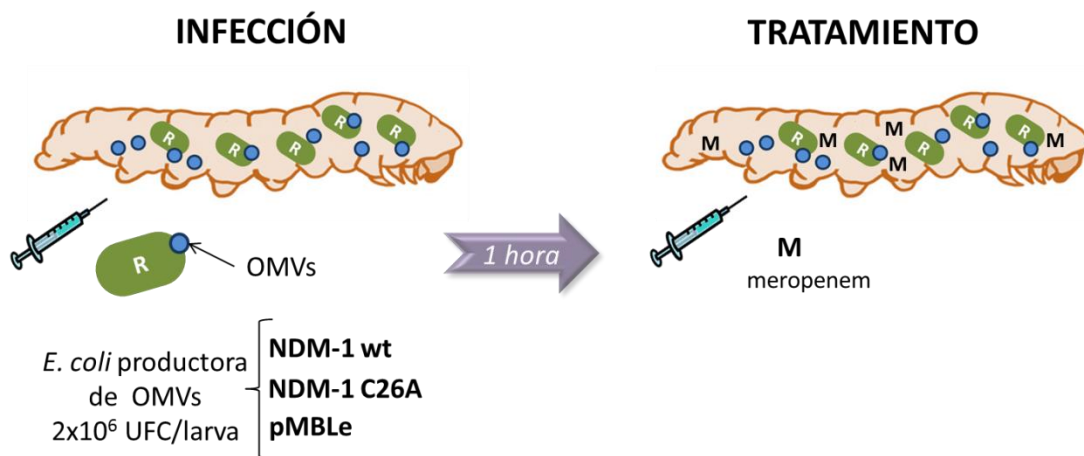


Figura 46 - Ensayos de sobrevivencia en GM con las variantes genéticas de *E. coli*

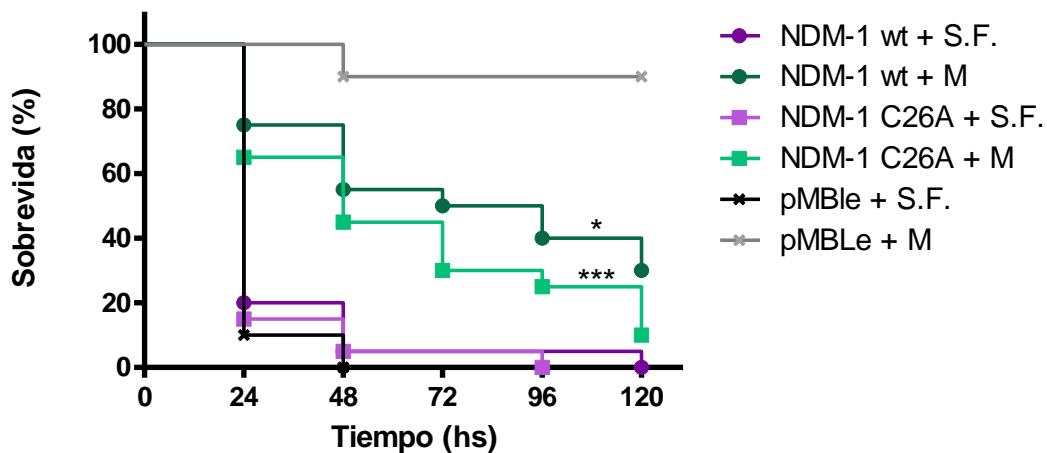


Figura 47 – Sobrevida de larvas inoculadas con *E. coli* NDM-1 wt , *E. coli* NDM-1 C26A y *E. coli* pMBLe *in vivo*. Se utilizaron dos grupos de larvas (n=10) para cada variante genética, a los cuales se les administró solución fisiológica (SF) o meropenem (M). Se muestran resultados de dos experimentos independientes. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes. Los datos fueron graficados utilizando el método Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el “log rank test”. La significancia estadística general fue establecida en $p < 0,05$; y luego se utilizó la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones de los grupos contra el control (pMBLe + M), a partir de la cual se definió $*** < 0,0001$

En este ensayo se puede observar que en el grupo infectado con la cepa control pMBLe y tratado con solución fisiológica (SF) se produce la muerte de la totalidad de las larvas en 48hs (sobrevida de 0%), en contraste con el mismo grupo tratado con meropenem, cuyo porcentaje de supervivencia fue del 90% (Figura 47). De esta manera se demuestra que la cepa ATCC transformada con el plásmido sin el gen de la NDM-1 es sensible al antibiótico, y, por lo tanto, en presencia de meropenem las bacterias no son capaces de afectar la viabilidad de las larvas.

En los grupos infectados con las cepas NDM-1 wt y NDM-1 C26A se observó supervivencia del 5% a las 48 hs, llegando a la totalidad de muerte de las larvas al final del ensayo. En estos mismos grupos, al administrarles meropenem, mostraron un leve aumento de supervivencia al quinto día del ensayo. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia observado fue apenas del 10% para NDM-1 C26A y de 30% para NDM-1 wt, lo cual contrasta con el 90% de supervivencia observado en el grupo infectado con la cepa pMBLe. Este resultado indica que las cepas

productoras de NDM-1 poseen resistencia a meropenem, y pueden causar infección y la muerte de larvas aun en presencia del antibiótico.

Co-infección de *E. coli* productora de OMVs_NDM-1 con *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes

Finalmente, con el objetivo de evaluar si las variantes genéticas productoras de NDM-1 son capaces de proteger de manera cruzada a una cepa sensible en una co-infección; se decidió realizar una infección conjunta de *E. coli* productora de NDM-1 con *P. aeruginosa* PAO1 sensible a carbapenemes. En esta ocasión, en lugar de evaluar sobrevida, se decidió medir la carga bacteriana dentro de las larvas a las 24 hs post co-infección y tratamiento con meropenem. Para ello se realizaron recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) por larva, utilizando medios selectivos (LB agar + antibiótico) que permitieran contar de forma independiente, por un lado las UFC de *E. coli* y por otro lado las UFC de *P. aeruginosa* a partir de la misma muestra. Para las cepas de *E. coli* se aprovechó la resistencia a gentamicina del plásmido productor de NDM-1 con el que se transformó la cepa. Para *P. aeruginosa* PAO1, se transformó esta cepa con un plásmido de resistencia a kanamicina, generando una variante capaz de tolerar 1mg/ml de dicho antibiótico. A esta cepa la denominamos *P. aeruginosa* PAO1Kn^r. De esta manera se pudieron seleccionar una u otra cepa según el antibiótico usado.

Cabe destacar que en este experimento se redujo la dosis de antibiótico de 10mg/k a 2mg/k, respecto de los ensayos de sobrevida. Este ajuste en la dosis de meropenem se realizó para poder observar mejor las diferencias en los recuentos bacterianos, ya que las UFC/larva de los inóculos también fueron menores que en los ensayos de sobrevida. Asimismo, la reducción en la carga bacteriana del inóculo fue ajustada a fin de obtener inóculos bacterianos de cada cepa capaces de infectar las larvas en co-infección, sin producir la muerte de los individuos a las

24 hs; de forma tal que fuera posible contar con larvas vivas al momento de realizar el homogenizado y recuento bacteriano

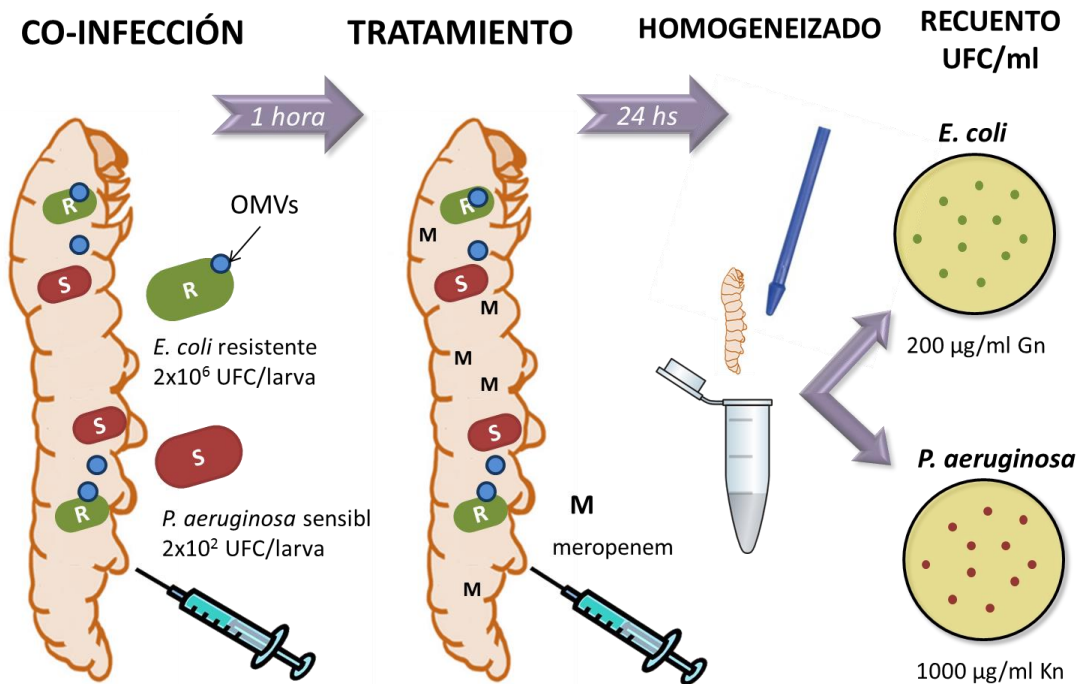


Figura 48 – Diagrama experimental - Co-infección de *E. coli* productora de OMVs_NDM-1 con *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes

De esta manera se co-infectaron las distintas variantes de *E. coli* (NDM-1 wt, NDM-1 C26A, $\Delta degP$ NDM-1 y pMBLe) a una concentración de $\approx 10^6$ UFC/larva, y de *P. aeruginosa* PAO1Kn^r a una concentración de $\approx 10^2$ UFC/larva. Posteriormente, 1h más tarde, se administró una dosis única de meropenem de 2mg/k a cada larva. Luego de 24hs se realizó un homogenizado individual de cada larva. Las muestras fueron diluidas y se realizaron los recuentos de UFC por el método de la gota, en los medios selectivos. Como controles se utilizaron dos grupos de larvas infectados con la cepa pMBLe, tratados con meropenem o solución fisiológica (SF).

Grupos de co-infección:

- 1) *E. coli* NDM-1 wt + *P. aeruginosa* PAO1 Kn^r / Meropenem 2mg/k
- 2) *E. coli* $\Delta degP$ NDM-1 + *P. aeruginosa* PAO1 Kn^r / Meropenem 2mg/k
- 3) *E. coli* NDM-1 C26A + *P. aeruginosa* PAO1 Kn^r / Meropenem 2mg/k
- 4) *E. coli* pMBLe + *P. aeruginosa* PAO1 Kn^r / Meropenem 2mg/k
- 5) *E. coli* pMBLe + *P. aeruginosa* PAO1 Kn^r / Solución fisiológica

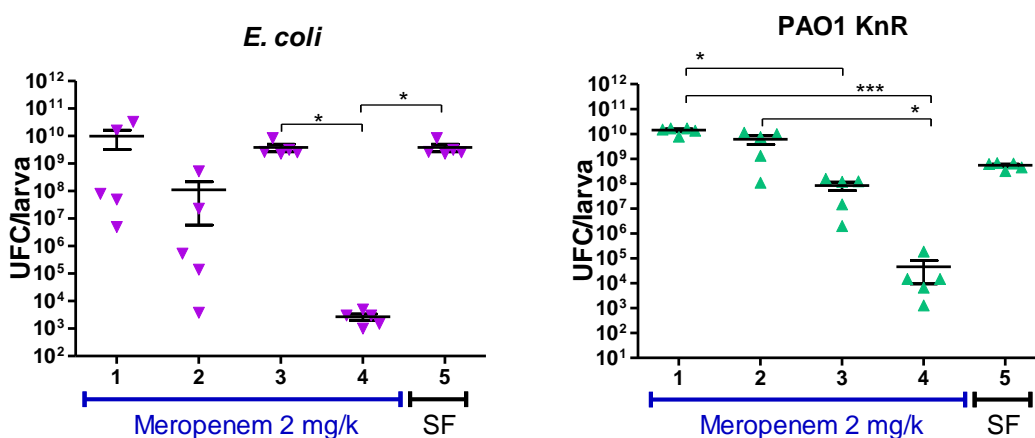


Figura 49 - Recuentos de UFC/larva (para cada larva individual) a las 24 hs de la co-infección de cada una de las variantes de *E. coli* con PAO1 Kn^r. Los números del eje "X" corresponden al grupo de tratamiento de larvas a partir del cual se realizaron los recuentos. Análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis; * p<0,05; *** p<0,001.

Como puede observarse en la Figura 49 el grupo de larvas co-infectado con la cepa de *E. coli* pMBLe y sin tratamiento antibiótico (Grupo 5) presentó un recuento promedio de *E. coli* de 4×10^9 UFC/ml y de PAO1Kn^R de 5×10^8 UFC/ml. Estos resultados demuestran que en ausencia de meropenem, ambas cepas son capaces de producir infección dentro de las larvas, en las dosis inoculadas, durante una co-infección.

Por otra parte, cuando a los mismos grupos se les administró el tratamiento con meropenem (grupo 4), se observó en ambos casos una reducción considerable (≈ 4 log para *E. coli* y ≈ 3 log para *P. aeruginosa*) del número de UFC, demostrando que el meropenem es activo en el modelo de co-infección, en la dosis utilizada.

Para las tres variantes genéticas que expresan la NDM-1 (grupos 1, 2 y 3) los recuentos de *E. coli* (UFC/larva) fueron superiores a 10^8 en presencia de meropenem, lo que demuestra que todas las cepas de *E. coli* presentaron resistencia al antibiótico. El grupo de *E. coli* NDM-1 wt (grupo 1) y *E. coli* $\Delta degP$ NDM-1 (grupo 2) presentaron recuentos muy dispersos en comparación con los demás grupos. Esto podría estar relacionado al esfuerzo que supone para la bacteria la producción de las vesículas de membrana externa. Esto requiere un gasto de energía extra para la síntesis y liberación de OMVs, y podría afectar el crecimiento bacteriano dentro de las larvas. En contraste, el grupo infectado con *E. coli* NDM-1 C26A (grupo 3) presentó un recuento mucho más homogéneo entre larvas, al igual que en los grupos infectados con la variante no productora de NDM-1 (variante *E. coli* pMBLe).

En cuanto a los recuentos de PAO1Kn^R, en los grupos co-infectados con las variantes de *E. coli* que expresan NDM-1 (grupos 1, 2 y 3), se observó un aumento significativo de las UFC/larva respecto del grupo co-infectado con la cepa no productora de la enzima y tratado con meropenem (grupo 4). Esto indica que todas las variantes de *E. coli* productoras de NDM-1 tienen efecto protector sobre la cepa de *P. aeruginosa* sensible co-infectada, ya sea que expresen la NDM-1 anclada a OMVs (variante wt y $\Delta degP$) o de forma soluble (variante C26A). Sin embargo, la co-infección con la variante C26A presentó recuento promedio de 8×10^7 UFC/larva; más bajo que lo observado para el grupo al que no se le administró antibiótico (7×10^8 UFC/larva). Esto demuestra que la presencia de NDM-1 soluble le permite a PAO1 crecer en presencia de meropenem, pero con menor éxito que en ausencia de antibiótico. Por otro lado, los grupos co-infectados con las variantes NDM-1 wt y NDM-1 $\Delta degP$, que expresan la NDM-1 anclada a OMVs, presentaron recuentos de *P. aeruginosa* mayores, con valores de 1×10^{10} UFC/larva y 6×10^9 UFC/larva, respectivamente. Estos resultados indican que la presencia de la NDM-1 secretada en OMVs de *E. coli* fue más eficiente en la protección cruzada de *P. aeruginosa*, y los recuentos bacterianos de estos grupos fueron incluso mayores que los del grupo al que no se le administró meropenem.

Con el objetivo de mostrar de manera más clara los resultados obtenidos se elaboró un índice de protección que cada variante de *E. coli* ejerce durante la co-infección con *P. aeruginosa*. Para ello se realizó un cociente de las UFC/larva de PAO1Kn^r sobre las UFC/larva de *E. coli* de forma individual para cada larva del grupo. Es decir, cuantas UFC de *P. aeruginosa* se protegen por cada UFC de *E. coli* en cada larva infectada

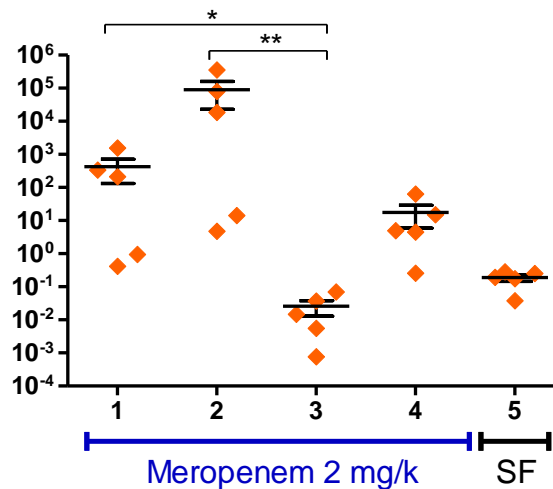


Figura 50 - Índice de protección calculado como: UFC PAO1 Kn^r / UFC *E. coli*, para cada larva. Análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis; * p<0,05; ** p<0,01.

Como se observa en la Figura 50, el grupo que presenta mayor protección es el NDM-1 $\Delta degP$, lo que indica que con menos cantidad de bacterias *E. coli* se obtiene mayor número de UFC de *P. aeruginosa* PAO1Kn^r durante la co-infección. Luego, con un valor un poco menor (<2log), se encuentra la cepa NDM-1 wt. Por último, con cuatro órdenes de magnitud por debajo de la cepa NDM-1 wt y 6 órdenes de magnitud por debajo de la variante $\Delta degP$ NDM-1, se encuentra NDM-1 C26A. Estos resultados demuestran que existe una concordancia entre el número de bacterias resistentes y la cantidad de NDM-1 secretada en OMVs. Esto pone de manifiesto que la presencia de OMVs_NDM-1 es mucho más efectiva en

la protección de una cepa sensible a meropenem que la forma soluble de la enzima, y que la hiperproducción de OMVs aumenta esta protección.

Como conclusión general de estos experimentos, podemos decir que la NDM-1 secretada en vesículas de membrana externa sería capaz de proteger a poblaciones bacterianas sensibles cercanas durante una co-infección. Este hecho es de gran relevancia ya que demuestra que no sería necesaria la transferencia horizontal genética para que exista un efecto protector “en comunidad” frente a un antibiótico. Como pudimos comprobar en estos estudios, las bacterias sensibles que participan de una infección mixta pueden estar protegidas frente al tratamiento con carbapenemes, cuando participe de la co-infección una cepa productora de NDM-1 anclada a OMVs.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5

- La presencia de OMVs_NDM-1 es capaz de otorgar protección *in vivo* a meropenem durante una infección con *E. coli* sensible a carbapenemes.
- La protección mediada por OMVs_NDM-1 es proporcional a la concentración de OMVs.
- La permanencia de las OMVs_NDM-1 en la hemolinfa de las larvas produce pérdida de actividad betalactamasa.
- La NDM-1 anclada a OMVs pareciera tener mayor eficiencia que la NDM-1 soluble en otorgar protección a cepas de *E. coli* sensibles a meropenem durante una infección en GM.
- Cepas de *E. coli* productoras de OMVs_NDM-1 mostraron resistencia a meropenem en infecciones de GM.
- Cepas de *E. coli* productoras de OMVs_NDM-1 son capaces de proteger a *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes, durante co-infecciones en larvas de GM.
- La protección de *P. aeruginosa* durante la co-infección con *E. coli* productora de NDM-1 es proporcional a la cantidad de OMVs producidas y la protección es significativamente mayor cuando la betalactamasa está anclada a OMVs.
- Como conclusión general de este capítulo podemos decir que los resultados obtenidos son de gran relevancia ya que demuestran un efecto protector de *E. coli* productora de NDM-1 en OMVs sobre una cepa de *P. aeruginosa* sensible a carbapenemes, durante una co-infección y tratamiento con meropenem



CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

Hoy en día se disponen de pocos tratamientos efectivos para la mayoría de las infecciones. El abuso y mal uso de los antibióticos, realizado durante décadas, ha conducido a la generación de cepas resistentes a los antimicrobianos de uso habitual, principalmente a través de la transferencia horizontal de genes entre microorganismos patógenos.

La resistencia a antibióticos representa uno de los principales problemas de la población en lo referente a salud pública y a la práctica clínica. Esto es debido al incesante incremento en el uso de antibióticos durante los últimos 50 años, además de que las bacterias resistentes a los antibióticos se han propagado de forma abrumadora. Esta progresiva disminución en la eficacia de los antibióticos de primera elección, enfatiza la necesidad de nuevas clases de drogas y sus formas de aplicación. Varios grupos de investigación y algunas pocas empresas farmacéuticas, están investigando los péptidos antimicrobianos como posibles drogas terapéuticas para el tratamiento de infecciones.

En este trabajo de tesis hemos llevado adelante el diseño y la evaluación de una serie de nuevos péptidos antimicrobianos, su análisis estructural y físico químico, y su evaluación *in vitro* e *in vivo* frente a bacterias modelo y un aislamiento clínico resistente a carbapenemes. En el proceso de análisis estructural y físico químico pudimos generar datos relevantes para la construcción de modelos teóricos de actividad biológica de este tipo de antimicrobianos; conocimiento indispensable para futuros desarrollos y mejoras de estas moléculas como drogas terapéuticas.

Además, los péptidos antimicrobianos con actividad anti-biofilm representan un enfoque muy prometedor para tratar infecciones asociadas a la formación de biofilms. En este trabajo se analizó la actividad de los PAMs frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, como inhibidores del proceso de formación de biofilm y como agentes capaces de destruir biofilms previamente formados. Los ensayos mostraron interesantes resultados en cuanto al efecto anti-biofilm sobre un biofilm

previamente establecido, demostrando la capacidad de estos PAMs de romper la estructura del biofilm inclusive de un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*.

Como modelo *in vivo* de infección hemos puesto a punto y utilizado un modelo de larvas de *G. mellonella*. Este modelo se ha utilizado en investigación biomédica para la evaluación de virulencia de muchos patógenos humanos, entre ellos bacterias y hongos; y como modelo de infección para la evaluación de nuevas drogas. En estos ensayos se pudo observar que el péptido P8.1 mostró actividad *in vivo* en el modelo de infección con *P. aeruginosa* PAO1. En cuanto a la actividad sinérgica, la combinación de P6.2 con meropenem mostró tener un interesante efecto sinérgico.

Como última parte del trabajo se llevaron adelante estudios de gran relevancia clínica sobre la protección frente a carbapenemes que puede brindar la metalo- β -lactamasa NDM-1 anclada a OMVs producidas por *E. coli*. En estos ensayos pudimos comprobar, *in vivo*, en el modelo de GM, que NDM-1 anclada a vesículas de membrana externa ejerce un efecto protector frente a un tratamiento con carbapeneme, sobre aislamientos sensibles a estas drogas. Este efecto se ve inclusive en casos de co-infecciones con bacterias distintas, siendo una productora de OMVs con NDM-1 y la otra sensible al carbapeneme. Este novedoso mecanismo de protección comunitaria abre un nuevo panorama en el tratamiento de las infecciones y co-infecciones bacterianas, que demandan nuevas estrategias para el control de la resistencia a los antimicrobianos.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Como perspectivas a futuro se propone:

- Evaluar algunos PAMs en formulaciones liposomales o en nanopartículas, tanto *in vitro* como *in vivo*
- Expresar de manera recombinante en *E. coli* algunos de los PAMs estudiados, con el objetivo de bajar los costos de producción de estas moléculas.
- Profundizar en los estudios de sinergia con antibióticos habituales en modelos de infección animal. Se evaluarán diferentes concentraciones de PAMs y combinaciones con otros antibióticos en modelos de infección con cepas resistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CDC Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019, (n.d.). www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html.
- [2] J.-I. Alós, Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>.
- [3] J.M. Sierra, E. Fusté, F. Rabanal, T. Vinuesa, M. Viñas, An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development, *Expert Opin. Biol. Ther.* (2017). <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>.
- [4] S.A. Billstein, How the pharmaceutical industry brings an antibiotic drug to market in the United States, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1994). <https://doi.org/10.1128/AAC.38.12.2679>.
- [5] N.B. da Cunha, N.B. Cobacho, J.F.C. Viana, L.A. Lima, K.B.O. Sampaio, S.S.M. Dohms, A.C.R. Ferreira, C. de la Fuente-Núñez, F.F. Costa, O.L. Franco, S.C. Dias, The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts, *Drug Discov. Today.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.017>.
- [6] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature.* (2002). <https://doi.org/10.1038/415389a>.
- [7] F. C.D., H. J.A., H. R.E.W., S. G., Designing antimicrobial peptides: Form follows function, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2012).
- [8] R.E.W. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0).
- [9] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* (2006). <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.
- [10] A.K. Marr, W.J. Gooderham, R.E. Hancock, Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook, *Curr. Opin. Pharmacol.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>.
- [11] P.H. Mygind, R.L. Fischer, K.M. Schnorr, M.T. Hansen, C.P. Sönksen, S. Ludvigsen, D. Raventós, S. Buskov, B. Christensen, L. De Maria, O. Taboureau, D. Yaver, S.G. Elvig-Jørgensen, M. V. Sørensen, B.E. Christensen, S. Kjærulff, N. Frimodt-Møller, R.I. Lehrer, M. Zasloff, H.H. Kristensen, Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus, *Nature.* (2005). <https://doi.org/10.1038/nature04051>.
- [12] W. Van 'T Hof, E.C.I. Veerman, E.J. Heimerhorst, A. V. Nieuw Amerongen, Antimicrobial peptides: Properties and applicability, *Biol. Chem.* (2001). <https://doi.org/10.1515/BC.2001.072>.
- [13] F. Guilhelmelli, N. Vilela, P. Albuquerque, L. da S. Derengowski, I. Silva-Pereira, C.M. Kyaw, Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance, *Front. Microbiol.* (2013). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>.
- [14] R.E.W. Hancock, H.G. Sahl, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nat. Biotechnol.* (2006). <https://doi.org/10.1038/nbt1267>.
- [15] R.E.W. Hancock, The bacterial outer membrane as a drug barrier, *Trends Microbiol.* (1997). [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)81773-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)81773-8).
- [16] R.E.W. Hancock, R. Lehrer, Cationic peptides: A new source of antibiotics, *Trends Biotechnol.* (1998). [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01156-6).
- [17] V. Teixeira, M.J. Feio, M. Bastos, Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes, *Prog. Lipid Res.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>.
- [18] Y. Huang, J. Huang, Y. Chen, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure

and function, *Protein Cell*. (2010). <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>.

- [19] R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999). <https://doi.org/10.1128/aac.43.6.1317>.
- [20] Y. Shai, Z. Oren, From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides, *Peptides*. (2001). [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00498-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00498-3).
- [21] S. Rotem, A. Mor, Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.020>.
- [22] Y. Lai, R.L. Gallo, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, *Trends Immunol.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>.
- [23] T. Nakatsuji, R.L. Gallo, Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas, *J. Invest. Dermatol.* (2012). <https://doi.org/10.1038/jid.2011.387>.
- [24] C.L. Friedrich, D. Moyles, T.J. Beveridge, R.E.W. Hancock, Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram- positive bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000). <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2086-2092.2000>.
- [25] R. Gennaro, M. Zanetti, Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides, *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* (2000). [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<31::AID-BIP40>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<31::AID-BIP40>3.0.CO;2-9).
- [26] J. Vizioli, M. Salzet, Antimicrobial peptides from animals: Focus on invertebrates, *Trends Pharmacol. Sci.* (2002). [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02105-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02105-3).
- [27] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* (2005). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- [28] B. Bechinger, M. Zasloff, S.J. Opella, Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Protein Sci.* (1993). <https://doi.org/10.1002/pro.5560021208>.
- [29] T. Mehra, M. Köberle, C. Braunsdorf, D. Mailänder-Sanchez, C. Borelli, M. Schaller, Alternative approaches to antifungal therapies, *Exp. Dermatol.* (2012). <https://doi.org/10.1111/exd.12004>.
- [30] F. Harris, S. Dennison, D. Phoenix, Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms, *Curr. Protein Pept. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.2174/138920309789630589>.
- [31] M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00201-1).
- [32] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplepsins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2).
- [33] K. Lohner, New strategies for novel antibiotics: Peptides targeting bacterial cell membranes, *Gen. Physiol. Biophys.* (2009). https://doi.org/10.4149/gpb_2009_02_105.
- [34] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* (2003). <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- [35] M.N. Melo, M.A.R.B. Castanho, The mechanism of action of antimicrobial peptides: Lipid vesicles vs. bacteria, *Front. Immunol.* (2012). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00236>.
- [36] K. Lohner, E.J. Prenner, Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane- mimetic systems, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00204-7).
- [37] G. Ehrenstein, H. Lecar, Electrically gated ionic channels in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys.* (1977).

<https://doi.org/10.1017/S0033583500000123>.

- [38] E. Breukink, B. De Kruijff, The lantibiotic nisin, a special case or not?, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00208-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00208-4).
- [39] L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, H.W. Huang, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X).
- [40] Z. Oren, Y. Shai, Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers.* (1998). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F).
- [41] P. Casteels, P. Tempst, Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Nonporeforming Mechanism Involving Stereospecificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1234>.
- [42] P. Bulet, L. Urge, S. Ohresser, C. Hetru, L. Otvos, Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*, *Eur. J. Biochem.* (1996). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0064q.x>.
- [43] S.K. Straus, R.E.W. Hancock, Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.009>.
- [44] B. de Kruijff, V. van Dam, E. Breukink, Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2008.09.020>.
- [45] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2013). <https://doi.org/10.1111/nyas.12005>.
- [46] M.R. Islam, J.I. Nagao, T. Zendo, K. Sonomoto, Antimicrobial mechanism of lantibiotics, in: *Biochem. Soc. Trans.*, 2012. <https://doi.org/10.1042/BST20120190>.
- [47] J.H. Cho, B.H. Sung, S.C. Kim, Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.025>.
- [48] A. Giacometti, O. Cirioni, R. Ghiselli, F. Mocchegiani, M.S. Del Prete, C. Viticchi, W. Kamysz, E. Łempicka, V. Saba, G. Scalise, Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2002). <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2132-2136.2002>.
- [49] M.L. Mangoni, Y. Shai, Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.021>.
- [50] N. Mookherjee, L.M. Rehaume, R.E.W. Hancock, Cathelicidins and functional analogues as antiseptic molecules, *Expert Opin. Ther. Targets.* (2007). <https://doi.org/10.1517/14728222.11.8.993>.
- [51] M. Zanetti, Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity, *J. Leukoc. Biol.* (2004). <https://doi.org/10.1189/jlb.0403147>.
- [52] N.C. Kaneider, A. Djanani, C.J. Wiedermann, Heparan sulfate proteoglycan-involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39, *ScientificWorldJournal.* (2007). <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.285>.
- [53] H.G. Boman, B. Agerberth, A. Boman, Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine, *Infect. Immun.* (1993).
- [54] Y.R. Chan, M. Zanetti, R. Gennaro, R.L. Gallo, Anti-microbial activity and cell binding are controlled by sequence determinants in the anti-microbial peptide PR-39, *J. Invest. Dermatol.* (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01231.x>.
- [55] R. Bals, J.M. Wilson, Cathelicidins - A family of multifunctional antimicrobial peptides, *Cell. Mol. Life*

- Sci. (2003). <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2186-9>.
- [56] R.I. Lehrer, A. Barton, K.A. Daher, S.S.L. Harwig, T. Ganz, M.E. Selsted, Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity, *J. Clin. Invest.* (1989). <https://doi.org/10.1172/JCI114198>.
- [57] E. de Leeuw, C. Li, P. Zeng, C. Li, M.D. de Buin, W.Y. Lu, E. Breukink, W. Lu, Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II, *FEBS Lett.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>.
- [58] T. Abee, Á.T. Kovács, O.P. Kuipers, S. van der Veen, Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.016>.
- [59] A. Brooun, S. Liu, K. Lewis, A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000). <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>.
- [60] P. Pi, W. Rd, S.G.S. Full, Biofilms made easy, *Wounds Int.* (2010).
- [61] M.S. Blackledge, R.J. Worthington, C. Melander, Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms, *Curr. Opin. Pharmacol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.07.004>.
- [62] D.J. Stickler, Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: Something needs to be done, *J. Intern. Med.* (2014). <https://doi.org/10.1111/joim.12220>.
- [63] M. Abdallah, C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster, N.E. Chihib, Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments, *Arch. Microbiol.* (2014). <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>.
- [64] P. Knezevic, O. Petrovic, A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *J. Microbiol. Methods.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.005>.
- [65] J. Overhage, A. Campisano, M. Bains, E.C.W. Torfs, B.H.A. Rehm, R.E.W. Hancock, Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation, *Infect. Immun.* (2008). <https://doi.org/10.1128/IAI.00318-08>.
- [66] M. Dawgul, W. Baranska-Rybak, E. Kamysz, A. Karafova, R. Nowicki, W. Kamysz, Activity of short lipopeptides and conventional antimicrobials against planktonic cells and biofilms formed by clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *Future Med. Chem.* (2012). <https://doi.org/10.4155/fmc.12.100>.
- [67] M.D. Seo, H.S. Won, J.H. Kim, T. Mishig-Ochir, B.J. Lee, Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review, *Molecules.* (2012). <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>.
- [68] A. Di Grazia, F. Cappiello, H. Cohen, B. Casciaro, V. Luca, A. Pini, Y.P. Di, Y. Shai, M.L. Mangoni, D-Amino acids incorporation in the frog skin-derived peptide esculentin-1a(1-21)NH₂ is beneficial for its multiple functions, *Amino Acids.* (2015). <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2041-y>.
- [69] W. Xu, X. Zhu, T. Tan, W. Li, A. Shan, Design of embedded-hybrid antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity and anti-biofilm activity, *PLoS One.* (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098935>.
- [70] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Emerging Themes and Therapeutic Prospects for Anti-Infective Peptides, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2012). <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134535>.
- [71] B. Mishra, S. Reiling, D. Zarena, G. Wang, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>.
- [72] G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education, *Nucleic Acids Res.* (2016). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
- [73] M. Pirtskhalava, A. Gabrielian, P. Cruz, H.L. Griggs, R.B. Squires, D.E. Hurt, M. Grigolava, M. Chubinidze, G. Gogoladze, B. Vishnepolsky, V. Alekseev, A. Rosenthal, M. Tartakovsky, DBAASP v.2:

An enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides, *Nucleic Acids Res.* (2016). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1174>.

- [74] D. Faccone, O. Veliz, A. Corso, M. Noguera, M. Martínez, C. Payes, L. Semorile, P.C. Maffia, Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates, *Eur. J. Med. Chem.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.065>.
- [75] A. Hollmann, M. Martínez, M.E. Noguera, M.T. Augusto, A. Disalvo, N.C. Santos, L. Semorile, P.C. Maffia, Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>.
- [76] P. Maturana, M. Martinez, M.E. Noguera, N.C. Santos, E.A. Disalvo, L. Semorile, P.C. Maffia, A. Hollmann, Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.003>.
- [77] M.E. Del Cogliano, A. Hollmann, M. Martinez, L. Semorile, P.D. Ghiringhelli, P.C. Maffia, L. V. Bentancor, Cationic antimicrobial peptides inactivate Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages, *Front. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00122>.
- [78] R. Gautier, D. Douguet, B. Antony, G. Drin, HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties, *Bioinformatics.* (2008). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.
- [79] heliquet, (n.d.). <http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>.
- [80] agadir, (n.d.). <http://agadir.crg.es/>.
- [81] ExPasy, (n.d.). http://web.expasy.org/compute_pi/.
- [82] S.H. Lee, S.J. Kim, Y.S. Lee, M.D. Song, I.H. Kim, H.S. Won, De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition, *Regul. Pept.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.08.010>.
- [83] N. Asthana, S.P. Yadav, J.K. Ghosh, Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: A leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity, *J. Biol. Chem.* (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M408881200>.
- [84] Clinical and Laboratory Standards Institute, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Document M07 A6. Wayne (PA): The Institute; 2003., CLSI. (2015).
- [85] M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson, Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra, *Analyst.* (1994). <https://doi.org/10.1039/AN9941900417>.
- [86] A.S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S.H. White, How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?, *Anal. Biochem.* (2000). <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4773>.
- [87] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *BBA - Biomembr.* (1986). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90302-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90302-0).
- [88] F. Szoka, F. Olson, T. Heath, W. Vail, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *BBA - Biomembr.* (1980). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90558-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90558-1).
- [89] F. Nicol, S. Nir, F.C. Szoka, Effect of phospholipid composition on an amphipathic peptide-mediated pore formation in bilayer vesicles, *Biophys. J.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76639-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76639-2).
- [90] N.C. Santos, M. Prieto, M.A.R.B. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2003). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00112-3).
- [91] S.W. Chiu, S. Subramaniam, E. Jakobsson, Simulation study of a gramicidin/lipid bilayer system in

- excess water and lipid. I. Structure of the molecular complex, *Biophys. J.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77352-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77352-2).
- [92] P.M. Matos, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, HIV-1 fusion inhibitor peptides enfuvirtide and T-1249 interact with erythrocyte and lymphocyte membranes, *PLoS One.* (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009830>.
- [93] P.M. Matos, T. Freitas, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, The role of blood cell membrane lipids on the mode of action of HIV-1 fusion inhibitor sifuvirtide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.013>.
- [94] E. Gross, R.S. Bedlack, L.M. Loew, Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential, *Biophys. J.* (1994). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80471-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80471-0).
- [95] R.J. Clarke, D.J. Kane, Optical detection of membrane dipole potential: Avoidance of fluidity and dye-induced effects, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (1997). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00188-5).
- [96] J. Cladera, P. O'Shea, Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide, *Biophys. J.* (1998). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77951-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77951-2).
- [97] H.G. Franquelim, L.M.S. Loura, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Sifuvirtide screens rigid membrane surfaces. Establishment of a correlation between efficacy and membrane domain selectivity among HIV fusion inhibitor peptides, *J. Am. Chem. Soc.* (2008). <https://doi.org/10.1021/ja711247n>.
- [98] N.C. Santos, M. Prieto, M.A.R.B. Castanho, Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectroscopy study, *Biochemistry.* (1998). <https://doi.org/10.1021/bi9803933>.
- [99] J.F. Nagle, M.C. Wiener, Structure of fully hydrated bilayer dispersions, *BBA - Biomembr.* (1988). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90268-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90268-4).
- [100] I. Zelezetsky, U. Pag, H.G. Sahl, A. Tossi, Tuning the biological properties of amphipathic α -helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions, *Peptides.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.05.002>.
- [101] L.M. Yin, M.A. Edwards, J. Li, C.M. Yip, C.M. Deber, Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions, *J. Biol. Chem.* (2012). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303602>.
- [102] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Omiganan, CID=16131445, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Omiganan> (accessed August 7, 2019).
- [103] F. Pasteran, D. Faccone, S. Gomez, S. De bunder, F. Spinelli, M. Rapoport, A. Petroni, M. Galas, A. Corso, Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina, *J. Antimicrob. Chemother.* (2012). <https://doi.org/10.1093/jac/dks032>.
- [104] J.M.S. Arthur L. Barry, William A. Craig, Harriette Nadler, .: Barth reller, Christie C. Sanders, M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, *Int. Clin. Lab. Stand. Guidel. ICLS.* (2016).
- [105] R.H.K. Eng, C. Cherubin, S.M. Smith, F. Buccini, Examination of gram-negative bacilli from meningitis patients who failed or relapsed on moxalactam therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1984). <https://doi.org/10.1128/AAC.26.6.850>.
- [106] E. Bouza, P. Muñoz, Monotherapy versus combination therapy for bacterial infections, *Med. Clin. North Am.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70293-5](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70293-5).
- [107] M. Wilmes, M. Stockem, G. Bierbaum, M. Schlag, F. Götz, D.Q. Tran, J.B. Schaal, A.J. Ouellette, M.E. Selsted, H.G. Sahl, Killing of staphylococci by θ -defensins involves membrane impairment and activation of autolytic enzymes, *Antibiotics.* (2014). <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040617>.

- [108] P. Abraham, S. George, K.S. Kumar, Novel antibacterial peptides from the skin secretion of the Indian bicoloured frog *Clinotarsus curtipes*, *Biochimie*. (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.005>.
- [109] V.S. Paulsen, H.M. Blencke, M. Benincasa, T. Haug, J.J. Eksteen, O.B. Styrvold, M. Scocchi, K. Stensvåg, Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Arasin 1 - And Mode of Action Studies of the N-Terminal, Proline-Rich Region, *PLoS One*. (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053326>.
- [110] R.J.W. Lambert, J. Pearson, Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values, *J. Appl. Microbiol.* (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>.
- [111] M. Martinez, S. Gonçalves, M.R. Felício, P. Maturana, N.C. Santos, L. Semorile, A. Hollmann, P.C. Maffia, Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.008>.
- [112] NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1999, (n.d.).
- [113] A. Hollmann, M. Martinez, P. Maturana, L.C. Semorile, P.C. Maffia, Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics, *Front. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00204>.
- [114] K. Lee, S.S. Yoon, *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2017). <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>.
- [115] K. Lewis, Persister Cells, *Annu. Rev. Microbiol.* (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
- [116] A.L. Spoering, K. Lewis, Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *J. Bacteriol.* (2001). <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>.
- [117] N.K. Archer, M.J. Mazaitis, J. William Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirtliff, *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease, *Virulence*. (2011). <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.
- [118] S.M. Jones, M. Morgan, T.J. Humphrey, H. Lappin-Scott, Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms, *Lancet*. (2001). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03572-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03572-8).
- [119] T.S. Murray, M. Egan, B.I. Kazmierczak, *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients, *Curr. Opin. Pediatr.* (2007). <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3280123a5d>.
- [120] S.S. Yoon, D.J. Hassett, Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis airway disease: Metabolic changes that unravel novel drug targets, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* (2004). <https://doi.org/10.1586/14787210.2.4.611>.
- [121] S.L. Gellatly, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses, *Pathog. Dis.* (2013). <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.
- [122] D. Pletzer, S.R. Coleman, R.E.W. Hancock, Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare, *Curr. Opin. Microbiol.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>.
- [123] P.Y. Chung, R. Khanum, Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>.
- [124] F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, J.C. Olivo-Marin, Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research, *Nat. Methods*. (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>.

- [125] ICY, (n.d.). <http://icy.bioimageanalysis.org>.
- [126] G.S. Domingues MM, Felício MR, Antimicrobial Peptides: Effect on Bacterial Cells., *Methods Mol Biol.* (2019) 233–242. https://doi.org/doi:10.1007/978-1-4939-8894-5_13.
- [127] I.A. Freires, J. de C.O. Sardi, R.D. de Castro, P.L. Rosalen, Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden?, *Pharm. Res.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>.
- [128] K. Agnoli, S. Schwager, S. Uehlinger, A. Vergunst, D.F. Viteri, D.T. Nguyen, P.A. Sokol, A. Carlier, L. Eberl, Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid, *Mol. Microbiol.* (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07937.x>.
- [129] Y. López Hernández, D. Yero, J.M. Pinos-Rodríguez, I. Gibert, Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens, *Front. Microbiol.* (2015). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00038>.
- [130] S.M. Cook, J.D. McArthur, Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens, *Virulence.* (2013). <https://doi.org/10.4161/viru.25240>.
- [131] C.J.Y. Tsai, J.M.S. Loh, T. Proft, *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing, *Virulence.* (2016). <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.
- [132] K. Kavanagh, J.P. Fallon, *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence, *Fungal Biol. Rev.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.04.001>.
- [133] M. Brennan, D.Y. Thomas, M. Whiteway, K. Kavanagh, Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2002). [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00374-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00374-7).
- [134] O.L. Champion, I.A.M. Cooper, S.L. James, D. Ford, A. Karlyshev, B.W. Wren, M. Duffield, P.C.F. Oyston, R.W. Titball, *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*, *Microbiology.* (2009). <https://doi.org/10.1099/mic.0.026823-0>.
- [135] P. Singkum, S. Suwanmanee, P. Pumeesat, N. Luplertlop, A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (2019). <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>.
- [136] A.P. Desbois, P.J. Coote, Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents, *J. Antimicrob. Chemother.* (2011). <https://doi.org/10.1093/jac/dkr198>.
- [137] A.Y. Peleg, D. Monga, S. Pillai, E. Mylonakis, R.C. Moellering, G.M. Eliopoulos, Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection, *J. Infect. Dis.* (2009). <https://doi.org/10.1086/596511>.
- [138] G. Patel, R.A. Bonomo, “Stormy waters ahead”: Global emergence of carbapenemases, *Front. Microbiol.* (2013). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>.
- [139] L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann, Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria, *Biomed Res. Int.* (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/249856>.
- [140] L.J. González, G. Bahr, T.G. Nakashige, E.M. Nolan, R.A. Bonomo, A.J. Vila, Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase, *Nat. Chem. Biol.* (2016). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2083>.



ANEXO

Actividad de los PAMs parentales sobre bacterias Gram-negativas

Cepas	ID	Gen de resistencia	CIM (ug/ml)			
			Omiganan	P1	P2	P5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=12)						
<i>P. aeruginosa</i>	M13513	<i>kpc</i>	256	32	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M11005	<i>kpc</i>	512	64	64	128
<i>P. aeruginosa</i>	M7723	<i>kpc</i>	256	64	64	32
<i>P. aeruginosa</i>	M7728	<i>imp</i>	512	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M5109	<i>vim</i>	256	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M5200	<i>vim + ges</i>	512	64	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M7525	<i>spm</i>	512	64	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M7712	<i>spm</i>	512	64	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M5470	ND ¹	512	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	M7907	<i>per</i>	128	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	COS 12p	ND.	512	64	64	64
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	WT	256	64	64	64
<i>Acinetobacter spp.</i> (n=10)						
<i>A. baumannii</i>	M13523	<i>oxa-51</i>	64	64	32	4
<i>A. baumannii</i>	FAV-1	<i>per + oxa-51 + oxa-58</i>	64	64	16	16
<i>A. baumannii</i>	M5179	<i>oxa-51</i>	64	64	32	32
<i>A. baumannii</i>	M7978	<i>imp</i>	64	64	16	8
<i>A. junii</i>	M9013	<i>oxa-51 + imp</i>	64	32	32	8
<i>A. baumannii</i>	M5277	<i>per</i>	32	64	32	8
<i>A. baumannii</i>	M5949	<i>oxa-23 + oxa-GVI</i>	128	256	32	16
<i>A. baumannii</i>	M7489	<i>oxa-51 + tem</i>	32	64	8	16
<i>A. baumannii</i>	M9665	<i>oxa-51</i>	64	128	4	32
<i>A. baumannii</i>	M5282	<i>oxa-51</i>	16	64	8	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=12)						
<i>K. pneumoniae</i>	M5825	<i>ges-3 + ctx-m-2</i>	64	>1024	8	32
<i>K. pneumoniae</i>	M7647	<i>vim-like+ctx-m-2+tem-1+shv-1</i>	1024	>1024	32	32
<i>K. pneumoniae</i>	M13540	<i>kpc</i>	256	>1024	16	64
<i>K. pneumoniae</i>	M9885	<i>kpc</i>	256	>1024	64	32
<i>K. pneumoniae</i>	M11245	<i>kpc + per-2</i>	32	1024	16	8
<i>K. pneumoniae</i>	M1803	<i>ctx-m-2+per-2+tem-1+shv+oxa-9</i>	1024	>1024	32	64
<i>K. pneumoniae</i>	M9140	<i>cit</i>	64	1024	32	32
<i>K. pneumoniae</i>	M9310	<i>ctx-m-2+shv-1+tem-1</i>	64	>1024	16	32
<i>K. pneumoniae</i>	M9375	<i>ctx-m-2+shv-1+tem-1</i>	32	1024	64	16
<i>K. pneumoniae</i>	M9170	<i>oxa-GIII</i>	128	>1024	32	64
<i>K. pneumoniae</i>	M9491	<i>mox</i>	128	1024	64	64
<i>K. pneumoniae</i>	FAV3	WT	128	1024	128	128
<i>Escherichia coli</i> (n=9)						
<i>E. coli</i>	Cos15	<i>per+tem</i>	64	128	64	64
<i>E. coli</i>	M9884	WT	64	128	32	32
<i>E. coli</i>	M9209	<i>kpc</i>	64	128	64	128
<i>E. coli</i>	M7859	<i>cit</i>	64	128	32	16
<i>E. coli</i>	NEU23	<i>oxa-GIII+tem</i>	32	128	32	32
<i>E. coli</i>	ABC11	<i>ctx-m-2</i>	64	128	32	32
<i>E. coli</i>	LCA1	<i>ctx-m-2+tem-1</i>	64	128	64	64
<i>E. coli</i>	M5306	<i>ctx-m-2+tem-1+per-2</i>	64	128	4	64
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	WT	64	256	32	32

Actividad de los PAMs parentales sobre bacterias Gram-positivas

Cepas	ID	Gen de resistencia	CIM (ug/ml)			
			Omiganan	P1	P2	P5
Staphylococcus aureus (n=11)						
<i>S. aureus</i>	ATCC29213	WT	32	32	64	32
<i>S. aureus</i>	M6794	<i>mecA</i>	64	32	64	64
<i>S. aureus</i>	204	<i>ermA</i>	64	64	64	32
<i>S. aureus</i>	28	<i>ermA</i>	32	32	64	64
<i>S. aureus</i>	33	<i>msrA</i>	32	32	128	64
<i>S. aureus</i>	239	<i>ermC</i>	32	32	64	64
<i>S. aureus</i>	M6276	<i>ermA + lnuA</i>	32	16	128	64
<i>S. aureus</i>	M2832	<i>mecA</i>	64	32	128	64
<i>S. aureus</i>	M4046	<i>mecA</i>	32	32	128	32
<i>S. aureus</i>	M6820	<i>mecA</i>	128	64	128	64
<i>S. aureus</i>	M6784	<i>mecA</i>	32	32	32	32
Staphylococcus coagulasa negativos (CNS) (n=12)						
<i>S. epidermidis</i>	M2919	<i>mecA</i>	8	16	16	8
<i>S. epidermidis</i>	M2921	<i>mecA</i>	8	8	8	8
<i>S. saprophyticus</i>	M4070	<i>mecA</i>	8	16	32	8
<i>S. saprophyticus</i>	M2981	<i>mecA</i>	8	16	8	8
<i>S. epidermidis</i>	M2923	WT	8	16	16	16
<i>S. epidermidis</i>	M2931	WT	16	16	16	8
<i>S. haemolyticus</i>	M2976	<i>mecA</i>	4	16	8	8
<i>S. haemolyticus</i>	M3014	WT	4	16	8	8
<i>S. hominis</i>	M2973	<i>mecA</i>	4	4	4	4
<i>S. hominis</i>	M2967	<i>mecA</i>	4	8	8	8
<i>S. warnerii</i>	M6823	<i>mecA</i>	8	8	8	8
<i>S. cohnii</i>	M6767	<i>mecA</i>	4	16	16	8
Enterococcus spp. (n=17)						
<i>E. faecium</i>	M2304	<i>vanA</i>	4	16	16	8
<i>E. faecium</i>	M2664	<i>vanA</i>	8	16	8	8
<i>E. faecium</i>	M2619	<i>vanB</i>	16	32	16	16
<i>E. faecium</i>	M2481	<i>vanB</i>	16	32	16	16
<i>E. faecium</i>	ZAP95	WT	16	32	16	16
<i>E. faecium</i>	M6261	N.D	16	32	16	16
<i>E. faecalis</i>	M4899	<i>vanB</i>	256	256	128	256
<i>E. faecalis</i>	M6534	<i>vanB</i>	256	128	256	256
<i>E. faecalis</i>	M4992	<i>vanA</i>	128	128	128	128
<i>E. faecalis</i>	M6383	<i>vanA</i>	128	128	128	128
<i>E. faecalis</i>	M4449	<i>vanA</i>	128	128	128	128
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51299	<i>vanB</i>	256	256	256	256
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	WT	128	64	128	128
<i>E. faecalis</i>	M6983	<i>vanA</i>	128	64	128	128
<i>E. gallinarum</i>	M2723	<i>vanC1 + vanA</i>	16	32	32	16
<i>E. gallinarum</i>	M2685	<i>vanC1 + vanA</i>	16	16	16	16
<i>E. raffinosus</i>	M6187	<i>vanA</i>	4	ND	8	8