



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la actividad antibiopelícula de péptidos sintéticos análogos a catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. en Bogotá Colombia

Fredy Alexander Guevara Agudelo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Genética
Bogotá, Colombia

2017

**Evaluación de la actividad antibiopelícula de péptidos sintéticos
análogos a catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de
Staphylococcus spp. en Bogotá Colombia**

Fredy Alexander Guevara Agudelo

Tesis de grado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Genética Humana

Directora:

Msc. Liliana Muñoz Molina

Codirectora:

Dr.Sc. Luz Mary Salazar Pulido

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Genética
Bogotá, Colombia

2017

A Dios y a mi familia

Puedo escribir los versos más tristes esta noche.
Escribir, por ejemplo: " La noche está estrellada,

y tiritan, azules, los astros, a lo lejos".
El viento de la noche gira en el cielo y canta.

Puedo escribir los versos más tristes esta noche.
Yo la quise, y a veces ella también me quiso.

En las noches como ésta la tuve entre mis brazos.
La besé tantas veces bajo el cielo infinito.

Ella me quiso, a veces yo también la quería.
Cómo no haber amado sus grandes ojos fijos.

Puedo escribir los versos más tristes esta noche.
Pensar que no la tengo. Sentir que la he perdido.

Oír la noche inmensa, más inmensa sin ella.
Y el verso cae al alma como al pasto el rocío. [...]

A TU MEMORIA....

PABLO NERUDA

Agradecimientos

A Dios por bendecirme y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida y llenarme de fortaleza en mi diario vivir.

A mi familia porque son mi soporte para seguir adelante con todos mis proyectos.

A Yurany por su apoyo incondicional por creer en mí y brindarme todo su amor.

A la profesora Liliana Muñoz Molina Pulido, directora de mi trabajo de tesis de Maestría, por su apoyo incondicional e instrucción,

A la Dra Luz Mary Salazar, por su apoyo, motivación y confianza en todo el desarrollo de mi Maestría.

A la Dra Clara Arteaga por su inmensa ayuda y colaboración desinteresada.

A Mireya Sarmiento por su excelente gestión facilitando información y trámites

A la Universidad Nacional de Colombia, porque me ha brindado todo su apoyo para lograr mis metas a nivel académico; a todos los profesores por su dedicación.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su apoyo en todo este proceso en especial a las docentes Gladys Pinilla y Jeannette Navarrette por todos sus consejos y palabras de ánimo

A la división de investigación sede Bogotá de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por toda su gestión administrativa.

Al profesor Bob Hancock por su invaluable ayuda y colaboración en la realización de este trabajo, y todo su magnífico grupo de trabajo que me colaboraron durante el tiempo que estuve en Vancouver, Canadá.

Y a todas y cada una de las personas que de una u otra forma participaron en este bello proceso

A todos, mil gracias.

Resumen

En este trabajo, se diseñaron con ayuda de herramientas bioinformáticas cuatro secuencias análogas a la catelicidina humana LL-37, (LL37-1, LL37-2, LL37-3 y LL37-4) con el fin de probar su actividad anti-biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus spp*, caracterizadas genotípica (identificación de los genes operón *IcaRADBC*) y fenotípicamente (formación de biopelícula y perfil de resistencia). Los péptidos fueron sintetizados usando la estrategia de Fmoc, se purificaron por RP-HPLC y se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF MS. Los ensayos *in vitro* de la actividad antibiopelícula por cabina de flujo continuo celular muestran que una concentración de 5 μM fue suficiente para inhibir la formación de biopelícula de *Staphylococcus spp*; mientras que, en ensayos estáticos por cristal violeta se necesitó una concentración entre 25-50 μM . Además se evaluó el posible efecto de letreo de las secuencias peptídicas mediante la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en células humanas y su actividad hemolítica. Según los resultados de citotoxicidad, a una concentración de 6,125 μM se presentó un nulo efecto hemolítico, incluso a concentraciones elevadas de (100 μM) y un bajo porcentaje de citotoxicidad (menor al 10%) en PBMCs. Por lo anterior, el uso de péptidos análogos de la catelicidina representa una alternativa promisorio para tratar infecciones asociadas a la biopelícula.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, LL-37, biopelículas, diseño bioinformático, *Staphylococcus*

Abstract

In this work, four sequences analogous to human cathelicidin LL-37 (LL37-1, LL37-2, LL37-3 and LL37-4) were designed with the help of bioinformatic tools in order to test their anti-biofilm activity in Clinical isolates of *Staphylococcus* spp, characterized genotypic (identification of genes operon *IcaRADBC*) and phenotypically (biofilm formation and resistance profile). Peptides were synthesized using the Fmoc strategy, purified by RP-HPLC and characterized by MALDI-TOF MS mass spectrometry. In vitro assays of the antibiotic activity by continuous cell flow showed that a concentration of 5 μM was sufficient to inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus* spp; while in static crystal violet tests a concentration between 25-50 μM was required. In addition, the possible spelling effect of the peptide sequences was evaluated by the release of the enzyme Lactate Dehydrogenase (LDH) in human cells and their hemolytic activity. According to the cytotoxicity results, at a concentration of 6,125 μM there was no hemolytic effect, even at high concentrations of (100 μM) and a low percentage of cytotoxicity (less than 10%) in PBMCs. Therefore, the use of analogous peptides of cathelicidine represents a promising alternative to treat infections associated with the biofilm.

Keywords: Antimicrobial peptides, LL-37, biofilm, bioinformatic design, *Staphylococcus*.

Contenido

	Pág.
Resumen	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas	13
Introducción	14
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo general	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2. Marco teórico y estado del arte	17
2.1 Biopelículas	17
2.2 Papel de las biopelículas en infecciones humanas	18
2.3 Etapas en la formación de biopelículas	21
Biopelículas en <i>Staphylococcus spp.</i>	22
2.4 Resistencia a los antibióticos por biopelículas bacterianas	24
2.5 Péptidos antimicrobianos (AMPs)	25
2.6 Historia Péptidos Antimicrobianos	25
2.7 Mecanismos de acción	28
2.8 Catelicidinas	29
2.9 Actividad antimicrobiana y anti- biopelícula de LL-37	32
2.10 Péptidos antimicrobianos como alternativa a los antibióticos convencionales	33
2.11 Diseño racional de péptidos antimicrobianos (AMPs)	34
2.12 Características de optimización	35
2.13 Bases de datos de AMPs	36
2.14 Síntesis química de péptidos	37
2.15 Síntesis química de péptidos en fase solida.....	37
3. Materiales y métodos	39
3.1 Diseño computacional y síntesis de péptidos.....	39
3.2 Purificación y caracterización de los péptidos	44
3.3 Selección de aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus sp.</i>	46
3.4 Caracterización aislamientos clínicos	47
3.5 Relación clonal de los aislamientos clínicos	48
3.6 Ensayo de placa en 96 pozos para biopelículas	49
3.7 Cultivo de biopelícula en la cámara de flujo celular y microscopía confocal ..	49
3.8 Experimentos de crecimiento microbiano	50
3.9 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados en células humanas	51
3.10 Efecto Hemolítico de los péptidos sintetizados	52
3.11 Análisis estadístico	53
4. Resultados y Discusión	54
4.1 Análisis computacional y síntesis de péptidos.....	54

4.2	Caracterización de los péptidos sintetizados.....	60
4.3	Comparación estructura predicha con dicroísmo circular	69
4.4	Caracterización de aislamientos clínicos	71
4.5	Confirmación de especie y presencia de operón <i>icaRADBC</i> de <i>Staphylococcus sp.</i>	72
4.6	Relación clonal de los aislamientos clínicos.....	78
4.7	Capacidad de formación de biopelícula de los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i>	79
4.8	Actividad de los péptidos análogos de LL-37 sobre la formación de biopelícula.....	84
4.9	Inhibición de biopelículas en los aislamientos clínicos.....	86
4.10	LL37-1 como potente péptido anti-biopelícula.....	90
5.	Evaluación crecimiento microbiano	95
5.1	Actividad citotóxica de los péptidos LL37-1 y LL37-2.....	97
6.	Conclusiones y recomendaciones	100
6.1	Conclusiones	100
6.2	Recomendaciones.....	100
7.	Productos académicos	101
	Bibliografía	103

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Publicaciones sobre biopelículas en PubMed,.....	18
Figura 2: Representación esquemática de la formación de biopelícula,.....	22
Figura 3: Exopolisacárido -N-acetilglucosamina (PIA)	23
Figura 4: Mecanismos de acción de AMPs, tomado de (11)	29
Figura 5: Estructura de la catelicidina humana LL-37	31
Figura 6: Los principales pasos de SPPS por Fmoc.....	38
Figura 7: Algoritmo para el diseño de los péptidos análogos a catelicidina humana LL-37.....	40
Figura 8: Proyecciones axiales de rueda helicoidal por Modelos Schiffer–Edmundson para los péptidos diseñados. a) LL37-1, b) LL37-2, c) LL37-3, d) LL37-4.	59
Figura 9: Cromatogramas analíticos de calidad de síntesis por HPLC antes de la purificación.....	61
Figura 10: Purificación de los péptidos por cromatografía semi-preparativa por columnas Sepak C-18.....	63
Figura 11: Cromatogramas de los cuatro péptidos después de la purificación por columnas de Sepak-C18	64
Figura 12: Espectros de masas de los 4 péptidos crudos antes de la purificación por columnas de Sepak-C18	65
Figura 13: Análisis de masas después de la purificación por Sepak C-18 de los péptidos LL37-1 y LL37-2.....	67
Figura 14: Espectros de dicroísmo circular para los péptidos en estudio	71
Figura 15: Detección del gen <i>UreD</i> en los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i>	72
Figura 16: Detección de la presencia del operón <i>IcaRADBC</i> en los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus sp</i>	74
Figura 17: Relación clonal de los aislamientos de <i>Staphylococcus sp</i>	79
Figura 18: Caracterización fenotípica de la formación de biopelícula de los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus spp</i>	81
Figura 19: Modificaciones en las condiciones de formación de biopelícula en los aislamientos de <i>Staphylococcus spp</i>	82
Figura 20: Tamizaje de actividad de los péptidos análogos a LL-37	85
Figura 21: Actividad de los péptidos sobre la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i>	88

Figura 22: Inhibición de biopelículas del péptido LL37-1 por cabina de flujo continuo celular	92
Figura 23: Curvas de crecimiento de los aislamientos de S.epidermidis en presencia del péptido LL37-1	96
Figura 24: Actividad Citotóxica de los péptidos LL37-1 y LL37-2	99

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Lista parcial de infecciones humanas asociadas con biopelículas.....	20
Tabla 2: Nombre y secuencias de péptidos empleados para la generación de secuencias péptidos híbridos con sus respectivos puntajes antimicrobianos	42
Tabla 3: Iniciadores operón <i>icaRADBC</i>	47
Tabla 4: Análisis <i>in silico</i> de la secuencia completa del péptido nativo LL-37	57
Tabla 5: Nombre y secuencia de péptidos comparados y sintetizados	58
Tabla 6: Aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> sp, presencia operón <i>IcaRADBC</i> y su perfil de resistencia.....	76
Tabla 7: Aislamientos utilizados para verificar actividad anti-biopelícula de los péptidos LL37-1 y LL37-2.....	87

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AMPs	Péptidos antimicrobianos
MRSA	Resistente a la Meticilina
MDR	Multidrogo resistentes
MSSA	Sensible a la Meticilina
PIA	Proteína de Adhesion Intercelular
CDC	Centro Estadounidense para el Control y la Prevención de Enfermedades
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
CL	Cardiolipina
PG	Fosfatidilglicerol
APD	Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos
dPABBs	Base de Datos de Péptidos Anti-biopelículas
SPSS	Síntesis de péptidos en fase solida
FMOC	9- Fluorenilmetiloxycarbonilo
BOC	tert-butoxicarbonil
tBu	tert-butil
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
DCC	N,N'- dicitclohexilcarbodiimida
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato
DIEA	N,N-Diisopropiletilamina
DCM	Diclorometano
IPA	Isopropanol
DMF	N,N'-dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
HPLC-RT	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
DC	Dicroísmo circular
TFE	Trifluoroetanol
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
OD	Densidades ópticas
BHI	Brain heart infusion
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colonia
CV	Cristal violeta
LDH	Lactato deshidrogenasa
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matriz Molecules
CH50	Concentration hemolítica media

Introducción

Las infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos médicos son un problema de salud pública en nuestro país por su frecuencia, severidad y alto costo. Uno de los más importantes patógenos asociado a este problema, es el *Staphylococcus* spp, por su capacidad de adaptación a condiciones ambientalmente desfavorables y la facilidad de adherencia que presentan especialmente en catéteres intra-vasculares, prótesis, sondas etc. Estos microorganismos pueden formar estructuras tridimensionales denominadas biopelículas o “biofilm” por su definición en inglés, los cuales por medio de la producción de polisacáridos extracelulares pueden adherirse a prácticamente cualquier tipo de superficie sólida, evadir la acción del sistema inmunológico y aumentar considerablemente la resistencia hacia moléculas antimicrobianas.

En el área de la medicina, la investigación sobre biopelículas se ha centrado en su relación con infecciones bacterianas y resistencia a fármacos. Las infecciones bacterianas son una enfermedad grave y la principal causa de muertes en todo el mundo. La creciente resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema médico importante en países en vía de desarrollo (1). En el año 2000, un informe del gobierno estadounidense identificó las enfermedades infecciosas como una de las principales causas de muerte en todo el mundo y la tercera causa principal de muerte en los Estados Unidos (2). De hecho en el año 2015, como política nacional el gobierno de Estados Unidos, se implementó un plan de acción nacional para combatir bacterias resistentes a los antibióticos (3).

Se ha estimado que el 60-80% de las infecciones microbianas humanas son causadas por bacterias asociadas a biopelículas (4). Patógenos multirresistentes, como *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., son de alta prevalencia en la mayoría de los hospitales de EE.UU (5). A medida que patógenos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y otros patógenos resistentes capaces de formar biopelículas continúen emergiendo y propagándose,

la comprensión y la acción en contra de la resistencia de las biopelículas es una necesidad primordial (6).

El fenotipo multirresistente que otorgan las biopelículas a los microorganismos que las componen, se ha convertido en tema de importantes estudios, como el realizado por María Kostakioti y colaboradores (7), el cual está orientado a la identificación de nuevos compuestos que sean capaces de destruir células en estado libre (planctónico). Sin embargo, pocos son los estudios que demuestren actividad contra estructuras tridimensionales bacterianas como la biopelícula.

Recientemente los péptidos catiónicos han surgido como un modelo interesante para la generación de fármacos promisorios anti-biopelícula, debido a sus propiedades inherentes inmunomoduladoras, específicamente antimicrobianas, presentando características de selectividad y especificidad aún mayores en comparación con los antibióticos convencionales. Actualmente, se han realizado estudios donde péptidos de naturaleza humana presentan actividad rápida y potente, generando buenas perspectivas para ser empleados como nuevos fármacos anti-microbianos o colaboradores al tratamiento, que actúen de forma sinérgica con los antibióticos ó la respuesta inmune. Uno de los péptidos más promisorios es el LL-37, el cual presenta una actividad significativa en la disgregación de células que forman biopelículas por ejemplo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (8) como también el aumento de la fagocitosis de microorganismos como *Escherichia coli* por macrófagos humanos, evidenciando una actividad dual, tanto de inmunomodulación como eliminación microbiana (9).

La importancia del uso del péptido LL-37 no sólo se debe a sus características intrínsecas antimicrobianas, sino también a las interacciones sinérgicas y antagónicas que presenta con otros mediadores inmunológicos, estas propiedades subyacentes de LL-37 han sido explotadas para crear péptidos reguladores de defensa innata que representan un nuevo enfoque inmunomodulador para el tratamiento de infecciones (10).

Los péptidos antimicrobianos son un grupo diverso de moléculas, que se dividen en subgrupos sobre la base de su composición y estructura de aminoácidos con un tamaño generalmente entre 12 y 50 aminoácidos (11). Estos péptidos usualmente dentro de su secuencia tienen dos o más residuos cargados positivamente como arginina o lisina y una gran proporción de residuos hidrófobos (generalmente >50%) (12). La mayoría de los péptidos antimicrobianos presentan una estructura secundaria de α -helicoidal (13), además la distribución de residuos cargados positivamente les proporciona un cierto grado de selectividad por los fosfolípidos de la membrana bacteriana, debido a su carácter aniónico. Se ha observado que la correcta optimización de parámetros de las moléculas peptídicas como carga y/o estructura, conllevan a una selectividad mayor hacia células microbianas y a disminuir la citotoxicidad frente a las células del hospedero (14).

Todas las características mencionadas tanto de actividad antimicrobiana como su capacidad de inmunomodulación, hacen del péptido LL-37 ideal para su utilización como plantilla en el diseño de péptidos miméticos bioinformáticamente optimizados, que puedan ser empleados como estrategia para inhibir la conglomeración de microorganismos en biopelículas. Por todo lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿El empleo de péptidos sintéticos análogos de la catelicidina humana LL-37 podrá ser una estrategia útil de inhibición en la formación de biopelículas de aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp de Bogotá, Colombia?

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad anti-biopelícula de péptidos sintéticos análogos a la catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp

1.2 Objetivos específicos

- Diseñar por medio de herramientas bioinformáticas péptidos análogos a la catelicidina humana LL-37 con posible actividad de inhibición en la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp.
- Determinar fenotípicamente la capacidad de formación de biopelícula y perfil de resistencia y de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp.
- Identificar los genes asociados al operón *Ica* responsable de la formación de biopelícula, (*IcaA*, *IcaB*, *IcaD* e *IcaR*) en los aislamientos de *Staphylococcus* spp.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y/o anti-biopelícula de los péptidos sintetizados y determinar el posible efecto citotóxico en células humanas.

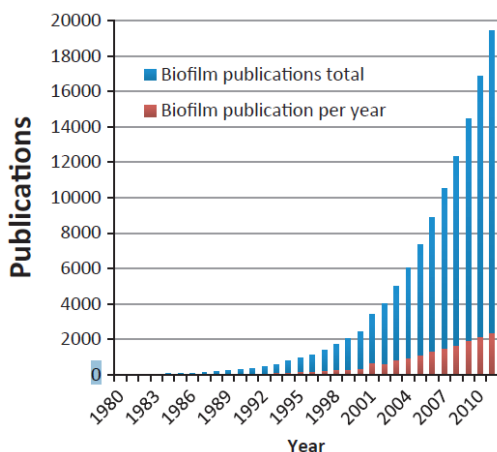
2. Marco teórico y estado del arte

2.1 Biopelículas

Las biopelículas son una parte natural de la ecología de la tierra, y corresponden a una "estructura social" de los microorganismos, en comparación con un estado libre o planctónico (15). Es un fenómeno microbiano ubicuo que se ha observado en bacterias, hongos, algas, levaduras, protozoos y otros organismos. En una biopelícula compuesta por organismos diversos, la interacción entre especies puede variar de neutral a cooperativo, a competitivo, y finalmente, a antagónico (16). La diversidad de organismos capaces de auto-organizarse y formar biopelículas es muy interesante y puede proporcionar información sobre la evolución de los organismos multicelulares (17). Lo cual permite el planteamiento

de la siguiente pregunta ¿son las biopelículas un estado de transición de evolución y conforman la base de los organismos multicelulares? ó ¿las biopelículas son simplemente un estado muy organizado de organismos de células individuales?. El hecho de que las biopelículas proporcionen una ventaja significativa de supervivencia de adaptación a diferentes condiciones ambientales, probablemente explica su amplia difusión. Durante los últimos 15 años, la literatura sobre biopelículas ha aumentado dramáticamente en términos de publicaciones (Figura 1) y también se encuentran disponibles numerosos libros sobre el tema.

Figura 1: Publicaciones sobre biopelículas en PubMed,



En la Figura 1 se observa el crecimiento exponencial en el número de publicaciones desde el año 1990 hasta el año 2010 donde se observa que prácticamente año tras año se duplican el número de publicaciones (18).

2.2 Papel de las biopelículas en infecciones humanas

Las bacterias son capaces de cambiar entre el estado de crecimiento planctónico ó (libre) a un estado de biopelícula. En contraste con el estado planctónico, las bacterias en biopelícula son agregadas y embebidas entre ellas mismas en una matriz autogenerada formada por sustancias poliméricas extracelulares, que facilita la unión y/o adherencia a una superficie determinada (19). Las infecciones agudas son, en general, causadas por células planctónicas, que pueden tratarse con éxito mediante la administración de antibióticos. Sin embargo, las infecciones crónicas

se cree que involucran a bacterias en estado de biopelícula. El sistema inmune del huésped y los antimicrobianos convencionales a menudo no logran erradicar tales infecciones (20,21) Se estima que las biopelículas son responsables del 65-80% de las infecciones que ocurren en el cuerpo humano (22), las cuales, por su persistencia y naturaleza crónica, representan una enorme carga en los sistemas sanitarios en todo el mundo. A través de los procesos de dispersión, las biopelículas pueden provocar nuevas infecciones en el huésped y resultar en la transmisión de bacterias entre diferentes huéspedes (23).

Hasta el desarrollo relativamente reciente de vacunas y antibióticos, la humanidad ha sido acosada por infecciones agudas y enfermedades epidémicas, causadas por células planctónicas de patógenos como *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*. Actualmente más de la mitad de las enfermedades infecciosas, involucran especies bacterianas que son comensales con el ser humano, o son comunes en nuestros entornos. Por ejemplo, bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* pueden causar infecciones crónicas (24).

Una fuente significativa de infecciones relacionada con biopelículas es la enfermedad cardíaca, que también es una de las principales causas de mortalidad en los Estados Unidos (25). Las técnicas quirúrgicas invasivas son inevitablemente necesarias para tratar los síntomas resultantes de la enfermedad cardíaca, que puede conducir a infecciones mortales causadas por *Staphylococcus* como la endocarditis (26), las infecciones procedentes de implantes y dispositivos médicos por ejemplo, marcapasos (27), catéteres vasculares (28,29), y dispositivos de asistencia ventricular son causas comunes de infección. Las biopelículas también se han identificado en otros dispositivos médicos (30). Tales como lentes de contacto, tubos endotraqueales, catéteres venosos centrales, y prótesis que representan más del 80% de las infecciones microbianas en el cuerpo. La infección del tracto urinario asociada a catéteres urinarios es también una fuente común de infecciones de biopelículas (31).

Las infecciones asociadas a dispositivos médicos, causadas más frecuentemente por *Staphylococcus* coagulasa-negativa, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, son de creciente importancia en la medicina moderna. Usualmente, la

terapia antimicrobiana falla, dejando como última alternativa el retiro del dispositivo implantado. El factor más importante en la patogénesis de las infecciones por *Staphylococcus* asociadas a los dispositivos médicos es la formación de biopelícula bacteriana adherentes y en multicapa (32). Estas infecciones pueden ser causadas por una sola especie o por una mezcla de especies de bacterias. En la Tabla 1 (33), se muestra una lista de patógenos causantes de infecciones humanas asociadas a la formación de biopelícula.

Tabla 1: Lista parcial de infecciones humanas asociadas con biopelículas.

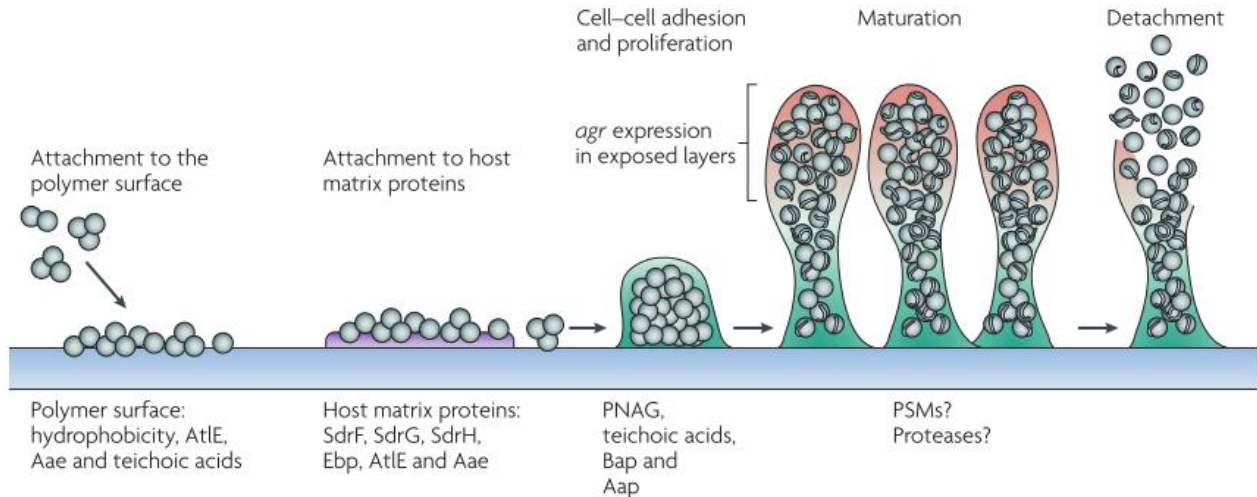
Infección o enfermedad	Especies bacterianas comunes de biopelículas
Caries dentales	Cocos Gram-positivos acidificantes (por ejemplo, <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Bacterias orales anaeróbicas Gram-negativas
Otitis media	Cepas no tipificables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones musculo esqueléticas	Cocos Gram-positivos (por ejemplo, <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	Estreptococos del grupo A
Infección del tracto biliar	Bacterias entéricas (por ejemplo, <i>Escherichia coli</i>)
Osteomielitis	<i>S.aureus</i>
Prostatitis bacteriana	<i>E.coli</i> y otras bacterias Gram-negativas
Endocarditis nativa de la válvula	<i>Streptococcus Viridans</i>
Neumonía por fibrosis quística	<i>P. aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones nosocomiales	
Suturas	<i>S.epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Derivaciones arterio-venosas	<i>S.epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Lentes de contacto	<i>P.aeruginosa</i> y cocos Gram-positivos
Cistitis de catéter urinario	<i>E.coli</i> y otras bacterias Gram-negativas
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres venosos centrales	<i>S.epidermidis</i> y otros
Válvulas cardíacas mecánicas	<i>S.aureus</i> y <i>S.epidermidis</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram-positivos
Aparatos ortopédicos	<i>S.aureus</i> y <i>S.epidermidis</i>
Prótesis de pene	<i>S.aureus</i> y <i>S.epidermidis</i>

Las infecciones de biopelícula comparten características clínicas y se desarrollan preferentemente en superficies inertes, y en dispositivos médicos; también pueden formarse en tejidos, como en el caso de la endocarditis (26).

2.3 Etapas en la formación de biopelículas

La formación y estructura de las biopelículas bacterianas ha sido ampliamente revisada (34,35). Una biopelícula se compone de tres partes principalmente: un núcleo vivo o no vivo que proporciona una superficie húmeda para la estructura altamente organizada microbiana; Una matriz hecha de proteínas extracelulares, ADN, y polisacáridos unido al polímero (β -1,6 N-acetilglucosamina) (36) y un agregado de microorganismos en comunidad que intercambian nutrientes y señales químicas (37). El ciclo de vida de la biopelícula puede ser dividido en tres pasos: unión, crecimiento y propagación (Figura 2). Primero, algunas colonias se adhieren reversiblemente a la superficie a través de fuerzas de van der Waals y atracciones iónicas para crear un sitio de iniciación. Esto es seguido por una unión irreversible de células a través de la producción de una matriz de exopolisacáridos y crecimiento celular (7), el cual no es uniforme, permitiendo la formación de canales (38), que participan en el intercambio de nutrientes y liberación de compuestos tóxicos. Finalmente, el desprendimiento de células individuales y la dispersión de las mismas, que permite que la biopelícula se disemine y colonice nuevas superficies (15).

Las biopelículas se observan como capas de bacterias encapsuladas en diferentes microambientes, debido a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes (39) y diferentes densidades celulares. Las bacterias dentro del núcleo de la biopelícula existen en una fase de crecimiento estacionaria o latente (39) y son fisiológicamente distintas de las bacterias planctónicas (40). Así, antibióticos con diana celular relacionado a mecanismos celulares asociados con el crecimiento bacteriano, presentan una actividad reducida contra biopelículas. Las biopelículas forman estructuras espaciales irregulares, que son afectadas por diferentes factores ecológicos, biológicos, químicos y físicos. El efecto de estos factores en la formación de biopelícula se ha investigado extensamente usando una variedad de simulaciones *in silico* (41).

Figura 2: Representación esquemática de la formación de biopelícula

En la Figura 2 se observa los pasos de formación de una biopelícula bacteriana desde la adhesión inicial de células en estado planctónico a una superficie, la formación de proteínas de matriz extracelular, su maduración y finalmente su liberación, imagen tomada de (7).

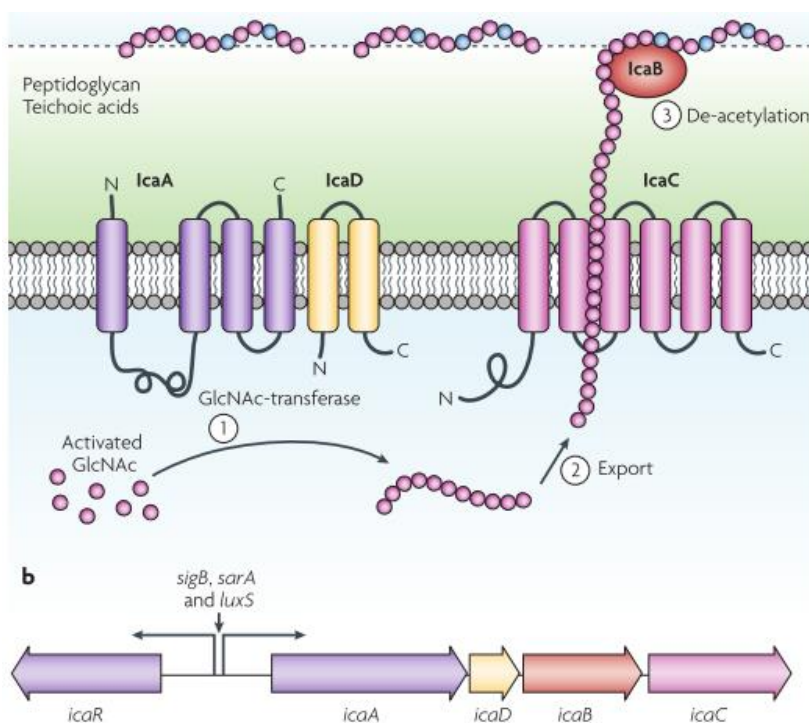
Biopelículas en *Staphylococcus* spp.

Una de los géneros bacterianos que forman biopelículas médicamente relevantes es *Staphylococcus* spp, la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biopelículas especialmente de las especies *S. aureus* y *S. epidermidis* los catalogan como unos de los patógenos más importantes en infecciones humanas tanto en ámbitos hospitalarios como en la comunidad. Los factores de virulencia de estos microorganismos no funcionan independientemente entre sí, ya que el fenotipo de biopelícula expresado por aislamientos clínicos de *S.aureus* está influenciado por la adquisición del gen *mecA* que confiere resistencia a la meticilina. Además, las cepas de *S.aureus* sensibles a la meticilina por sus siglas en inglés: (MSSA *S. aureus* Sensitive to Methicillin) producen comúnmente biopelícula dependiente de la adhesina polisacárido extracelular, denominada polisacárido de adhesión intercelular (PIA) codificada por los genes que componen el operón

IcaADBC. Aunque múltiples factores bacterianos y externos influyen en la fijación y formación de biopelícula en la especie *Staphylococcus* spp, la producción de una adhesina polisacárido extracelular, denominada polisacárido de adhesina intercelular (PIA) o N-acetilglucosamina polimérica (PNAG) codificada por el operón *Ica* (Figura 3), participa de forma activa en la producción de biopelículas y facilita la adhesión bacteriana a superficies (42).

PIA es un glicano de (β -1,6 2- acetamido - 2 - desoxi-D-glucopiranosil) con una carga neta positiva que promueve la agregación y unión de células a superficies inertes (43). El operón *Ica* consta de cuatro genes, *IcaA*, *IcaD*, *IcaB*, y *IcaC* y un gen regulador represor, *IcaR* (44). La mayoría de investigaciones sobre la actividad del locus *Ica* se ha realizado en *S. epidermidis* pero hay una alta homología de secuencia de nucleótidos entre los loci *Ica* entre *S. epidermidis* y *S.aureus* aproximadamente un 78% de identidad a nivel de aminoácidos (45). Estudios han demostrado la importancia de este operón en la formación de biopelículas en *Staphylococcus* spp (46,47).

Figura 3: Exopolisacárido -N-acetilglucosamina (PIA)



Como se observa en la (Figura 3 parte a), el exopolisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG, también conocido como PIA), un homopolímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unido a β 1-6 es parcialmente desacetilado, y está implicado en la formación de biopelícula, es sintetizado por la GlcNAc transferasa IcaA, que necesita la proteína accesoria de membrana IcaD para ser activa (paso 1). La cadena creciente de PNAG es exportada por la proteína de membrana IcaC (paso 2). Después de la exportación, la desacetilasa IcaB, situada en la superficie celular, elimina algunos de los grupos N-acetilo, dando al polímero un carácter catiónico que es esencial para la fijación a la superficie (paso 3). Las proteínas Ica están codificadas por el locus del gen *Ica* que contiene el operón *IcaADBC* y el gen *IcaR*, que codifica una proteína reguladora. La expresión del operón *IcaADBC* está regulada directamente mediante la expresión de IcaR, controlado por una serie de proteínas reguladoras globales (SigB, SarA y LuxS). (Figura 3 parte b) (42).

2.4 Resistencia a los antibióticos por biopelículas bacterianas

Las bacterias que se adhieren a una superficie y crecen en forma de biopelícula, están protegidas de la muerte celular por los antibióticos. La reducción de la susceptibilidad a los antibióticos contribuye a la persistencia de infecciones asociadas con esta característica microbiana, por ejemplo sobre dispositivos médicos (tubos endotraqueales, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, y dispositivos intrauterinos). En casos extremos, las células bacterianas que conforman una biopelícula incrementan la resistencia a los antibióticos hasta en 1000 veces (48). Muchas explicaciones se han dado para la alta resistencia a los antibióticos que muestran las bacterias asociadas a biopelículas, el cual constituye un claro ejemplo de resistencia adaptativa, un fenómeno que está atrayendo la atención de microbiólogos clínicos (49).

La adaptación natural de la resistencia en las biopelícula se evidencia por el hecho que las células tomadas de una biopelícula y llevadas de nuevo al estado planctónico generalmente incrementan su grado de susceptibilidad ya que por

procesos de transferencia horizontal de genes de resistencia adquieren nuevos mecanismos de resistencia (50,51).

Sólo en los EE.UU, infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos son responsables de más de 23.000 muertes y 2.000.000 infecciones asociadas, con un costo directo de \$ 20 millones al año, según el Centro Estadounidense para el Control y la Prevención de Enfermedades por sus siglas en inglés CDC (Center for Disease Control and Prevention) (52). En Europa, el número es de alrededor de 25.000 muertes. En todo el mundo, desde Mozambique, la India, hasta América Central, hay cada vez más casos de infecciones resistentes a los medicamentos que están costando vidas y dinero (53). Los mecanismos protectores en las biopelículas parecen ser distintos de los que son responsables de la resistencia antibiótica convencional. En las biopelículas, la pobre penetración de los antibióticos, la limitación de nutrientes, el crecimiento lento, las respuestas de estrés adaptativo y la formación de células persistentes constituyen una defensa de múltiples niveles. Los detalles genéticos y bioquímicos de estas características de defensa en la biopelícula, sólo están empezando a ser dilucidados. Cada gen y producto génico que contribuye a esta resistencia puede ser una diana para el desarrollo de nuevos agentes y compuestos terapéuticos. La desactivación de la resistencia en la biopelícula puede aumentar la capacidad de los antibióticos existentes para eliminar las infecciones que involucran biopelículas que son refractarias a los tratamientos actuales.

2.5 Péptidos antimicrobianos (AMPs)

2.6 Historia Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) han sido reconocidos en células procariontas desde 1939, cuando se aislaron sustancias antimicrobianas, denominadas gramicidinas, de *Bacillus brevis*, y se observó que presentaban actividad tanto *in vitro* como *in vivo* contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas (54). Más tarde se demostró que las gramicidinas trataban con éxito heridas infectadas en la piel de cobayos, indicando su potencial terapéutico para su uso clínico (55), y

fueron los primeros AMPs que se comercializaron como antibióticos (56). En el caso de los seres humanos y otros seres vivos, que están constantemente expuestos a la amenaza de infección microbiana, se sabe desde hace mucho tiempo que la protección contra estas infecciones fue proporcionada por el sistema inmune adaptativo. Sin embargo, esto plantea la pregunta de ¿por qué las plantas y los insectos, que carecen de un sistema inmune adaptativo, también permanecen libres de infecciones durante la mayor parte del tiempo? La respuesta a esta pregunta ahora se sabe que, de manera similar a procariontes, las células eucariotas también producen AMPs e históricamente, algunas fuentes atribuyen el descubrimiento de AMPs eucariotas a los primeros trabajos sobre plantas (57), cuando en 1896 se mostró que una sustancia letal para la levadura de pan estaba presente en la harina de trigo (58).

A finales de la década de 1920, la lisozima fue identificada por Alexander Fleming y es considerada por algunos autores como el primer caso reportado de un péptido con actividad antimicrobiana (59). En 1928, Fleming descubrió la penicilina (60). Con el advenimiento de la penicilina y la estreptomycinina en 1943, comenzó la "Edad de oro de los antibióticos", que condujo a una rápida pérdida de interés en el potencial terapéutico de los antibióticos naturales como la lisozima y su importancia como defensa inmune (61). Sin embargo, en 1942, se aisló una sustancia antimicrobiana que se había detectado previamente en el trigo (58) a partir del endospermo de trigo (*Triticum aestivum*) y se encontró que era un péptido que inhibía el crecimiento de una variedad de fitopatógenos, como *Pseudomonas solanacearum* y *Xanthomonas campestris* (62). Más tarde llamado *purothionin* a mediados de los años setenta (63), este péptido es ahora conocido como un miembro de la familia de las thioninas, que son AMPs hallados en el reino vegetal (62). Mientras el mundo conocía estas nuevas moléculas, también la "Edad de oro de los antibióticos" llegaba a su final con el surgimiento de patógenos microbianos resistentes a múltiples fármacos, a principios de los años sesenta, se despertó un interés por las moléculas de defensa del huésped. Es este punto en el tiempo que algunas fuentes consideran ser el verdadero origen de la investigación en AMPs (64), comenzando con los estudios que se llevaron a cabo en los años 1950 y 1960,

cuando se demostró que las proteínas catiónicas eran responsables de la capacidad de los neutrófilos humanos para eliminar bacterias a través de mecanismos independientes del oxígeno (65). Para esa misma época, década de 1960, la proteína antimicrobiana, lactoferrina, fue aislada de la leche (66). A finales de la década de los setenta y ochenta, varios grupos informaron de una serie de AMPs a partir de leucocitos lo que actualmente se conoce como α -defensinas (67). Estas defensinas estaban entre los primeros AMPs estabilizados con cisteína. En 1981, Boman y colaboradores, aislaron las proteínas antimicrobianas catiónicas inducibles, P9A y P9B, a partir de la hemolinfa de pupas de *Hyalophora cecropia* (68). Poco después, estos péptidos se secuenciaron, se caracterizaron y se denominaron con el nombre de "cecropinas", constituyendo de este modo los primeros AMPs α -helicoidales. En 1987, otro estudio histórico se produjo cuando Zasloff y colaboradores aislaron y caracterizaron AMPs catiónicos de la rana *Xenopus laevis* y, refiriéndose a su papel defensivo, llamaron a estos péptidos magaininas después de la palabra hebrea "escudo" (69).

Pocos años después, las β -defensinas y θ -defensinas, que difieren de las α -defensinas por el número de pares de cisteínas (70), se caracterizaron después del aislamiento en granulocitos bovinos y leucocitos del mono rhesus. Sobre la base de estos resultados, un número de investigadores consideró la posibilidad de que los AMPs puedan desempeñar un papel en los sistemas de defensa de organismos que carecen de un sistema inmune adaptativo (71). Desde estos estudios iniciales, los AMPs han sido ampliamente estudiados no sólo en plantas (72) e insectos (73), sino también otros organismos invertebrados que carecen de un sistema inmune adaptativo (74), la mayor parte de la comprensión actual de los AMPs se ha obtenido de estudios realizados sobre aislados de secreciones de la piel de anfibios, que es una fuente rica de estos péptidos. Estos estudios han establecido que AMPs existen en prácticamente todos los organismos multicelulares y cada vez más se reconoce que estos péptidos juegan un papel importante en el sistema inmunológico de los mamíferos, incluidos los seres humanos (75–77). Además, muchos AMPs han sido identificados en la mayoría de los sitios del cuerpo humano

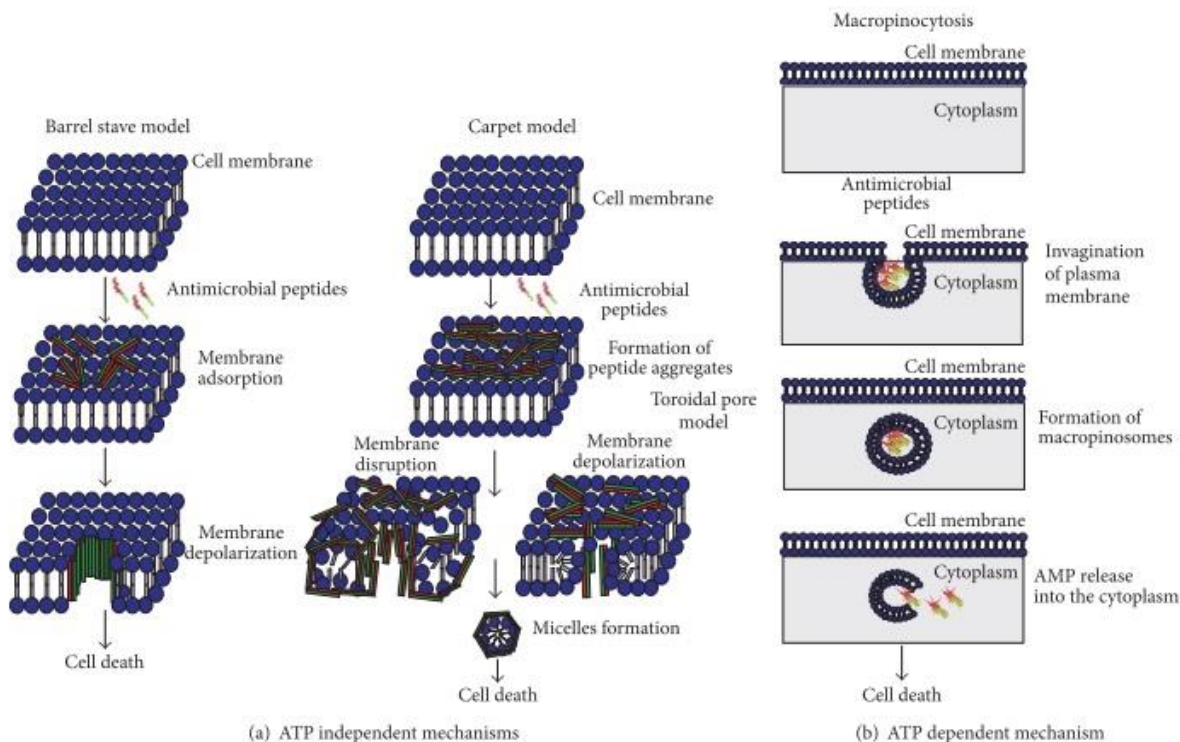
que normalmente están expuestos a microbios como la piel y mucosas (76), y son producidos por una serie de células incluyendo neutrófilos, eosinófilos y plaquetas.

2.7 Mecanismos de acción

Se han propuesto varios modelos para describir el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. Pueden promover el daño de la membrana en células diana por adelgazamiento de la membrana celular o por formación de poros o disrupción de la bicapa lipídica. Los mecanismos de absorción celular de los AMPs se clasifican en independientes y en dependientes de energía (Figura 4). Los mecanismos independientes de energía incluyen el modelo de barril, el modelo de alfombra y el modelo toroidal, y el mecanismo de absorción dependiente de energía incluye la macropinocitosis (64). En el mecanismo barril, los monómeros peptídicos se agregan en la superficie de la membrana. Los péptidos agregados se insertan en la membrana y se orientan de tal manera que sus cadenas laterales no polares se dirigen hacia el núcleo lipídico hidrófobo de la membrana y las superficies hidrófilas de los péptidos apuntan hacia dentro, formando así un poro transmembrana relleno de agua que causa la liberación de contenido intracelular y consigo la muerte celular. Un ejemplo de los péptidos antimicrobianos que sigue mecanismos barril incluye la Gramicidina S (78). En el modelo de alfombra, los péptidos se asocian inicialmente en la superficie de la membrana y forman una alfombra local. Una vez que se alcanzó la concentración umbral particular, el péptido penetra en la membrana, lo que conduce a la disrupción de la membrana celular y provoca la lisis de las células microbianas.

En el modelo de poro toroidal, los péptidos agregados ya sea antes o después de su unión con la superficie de la membrana celular inducen la despolarización de la membrana y forma un toroidal en forma de poros transmembrana con formación micelar que conduce a la muerte celular (79). Por otro lado, la macropinocitosis es la vía de absorción independiente de energía de AMPs, la membrana de las células diana se pliega hacia adentro junto con el péptido y forma vesículas llamadas macropinosomas. Posteriormente, los AMPs dentro de las vesículas se liberan en el citoplasma y ejercen su acción antimicrobiana (11).

Figura 4: Mecanismos de acción de AMPs, tomado de (11)



Como se observa en la Figura 4: parte a) Mecanismo independiente de energía: incluye el modelo de barril, modelo de alfombra, y modelo toroidal del poro. Parte b) Mecanismo dependiente de energía: incluye la macropinocitosis.

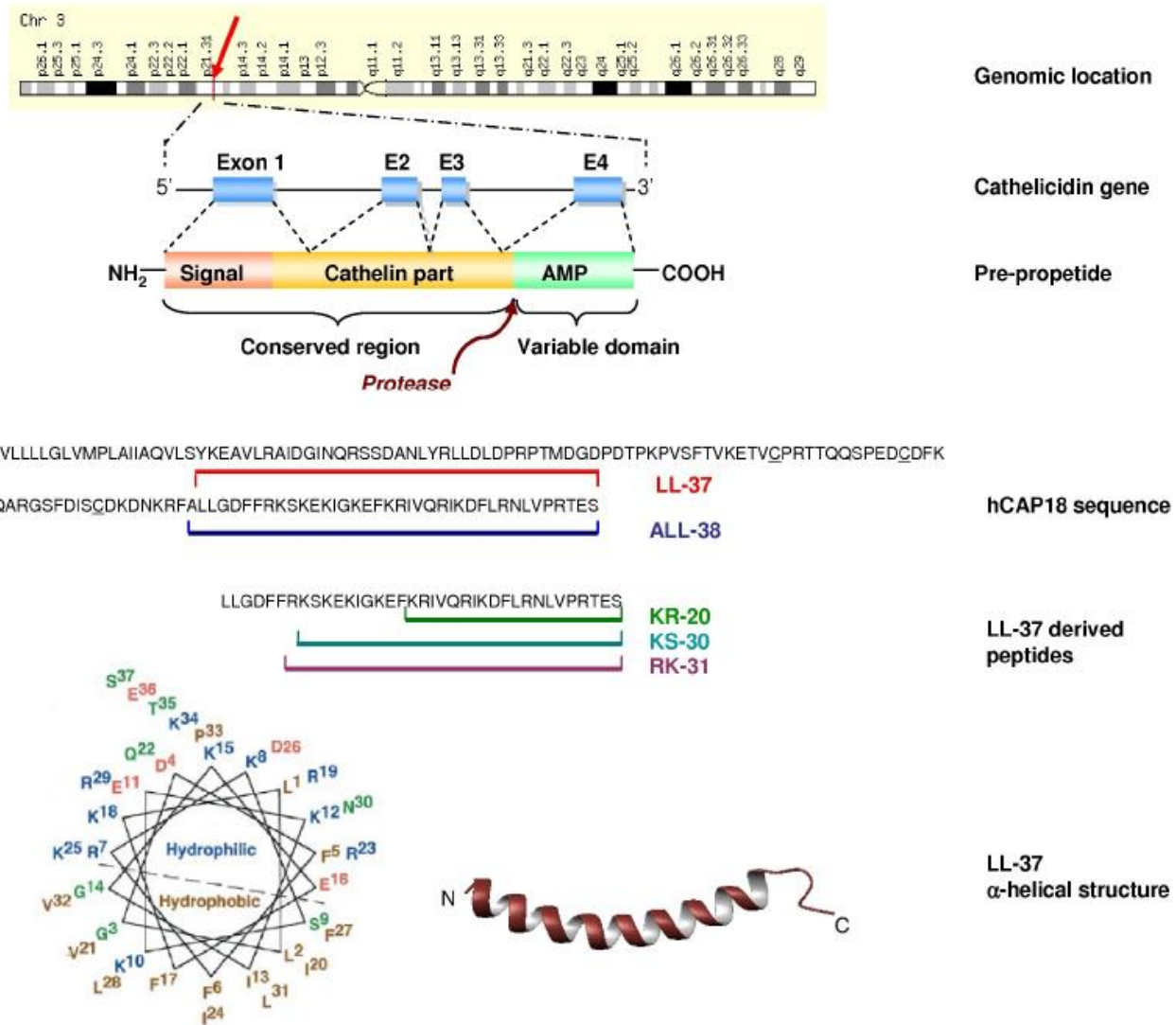
2.8 Catelicidinas

El primer péptido antimicrobiano de este grupo se aisló en el cerdo (80). El término catelicidinas fue introducido en 1995 por Zanetti y colaboradores (81) para describir las moléculas que contienen tanto un dominio "Cathelin" y un dominio antimicrobiano C-terminal. Cathelin se refiere a un acrónimo del inhibidor L catepsina. Las proteínas pertenecientes al grupo de las catelicidinas han sido ampliamente estudiadas en mamíferos, se han encontrado recientemente en otros seres vivos como especies domesticas de pollos (82), especies de peces (83), patos (84), conejos (85) entre otros. La catelicidina humana tiene un peso de 18 kDa (hCAP-18) y es una proteína que se encuentra en los gránulos secundarios azurófilos de los neutrófilos (86). También se encuentra presente en

subpoblaciones de linfocitos, monocitos, en epitelios escamosos, en el epidídimo (86) y en el pulmón (87). Varias células de la piel como queratinocitos, mastocitos o sebocitos también expresan hCAP-18 (88). La pre-prorregión de las catelicidinas tiene 128-145 residuos: el cual es una péptido señal de 29-30 residuos y una pro-rregión con 99-114 residuos (Figura 5).

Figura 5: Estructura de la catelicidina humana LL-37

De arriba a abajo: Ubicación del gen de la catelicidina en el genoma humano y su estructura global del pre-propéptido y estructura primaria de hCAP-18. Secuencia de varios fragmentos de LL-37 y modelo que representa la estructura alfa-helicoidal secundaria de LL-37 imagen tomada de (10).



En los seres humanos, los exones 1-4 de la catelicidina están localizados en el cromosoma 3p21. Éstos se transcriben como un único gen que codifica CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide), una pre-pro-proteína catiónica, de 18-kDa, que también se conoce como hCAP18 (89). Como se muestra en la Figura 5, hCAP18 se caracteriza por un péptido señal N-terminal de (30 residuos), una pro-secuencia altamente conservada (103 aminoácidos) denominada dominio de tipo cathelin, y un péptido antimicrobiano maduro referido como LL-37 (37 aminoácidos con Leu-Leu en el extremo N-terminal). LL-37 se expresa en casi todos los tejidos y órganos, tales como neutrófilos (90), mielocitos (86), testículos (91) entre otros. LL-37 es el nombre de familia aceptado para AMPs maduros de la región C-terminal en lugar de la proteína de longitud completa.

LL-37 tiene una carga positiva neta de +6 a un pH fisiológico, un dominio N-terminal hidrófobo y una conformación α -helicoidal que es más pronunciada en presencia de lípidos negativos (92). LL-37 se produce a partir del dominio C-terminal de la proteína precursora hCAP18/LL-37 por escisión proteolítica. La proteinasa 3 escinde hCAP18 / LL-37 entre los residuos de alanilo y leucilo (93). Sin embargo, la proteinasa 3 sólo se expresa en células mieloides y no en células epiteliales. Las serin-proteasas, la enzima trípica del estrato córneo (SCTE, kallikrein 5) y la proteasa del estrato córneo (SCCE, kallikrein 7) controlan la activación de la proteína precursora hCAP18 / LL-37 sobre la superficie de la piel e influyen en el procesamiento posterior a péptidos más pequeños con actividad biológica alternativa (94). Por lo tanto, la actividad de la catelicidina se controla mediante el procesamiento enzimático de la forma inactiva a un péptido maduro (LL-37) y / o varias formas cortas, tales como KR20 en seres humanos (95).

2.9 Actividad antimicrobiana y antibiopelícula de LL-37

Hasta ahora, más de 50 diferentes péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido descritos en diferentes compartimentos del cuerpo humano (96), incluyendo el péptido de la catelicidina, LL-37.

(NH₂-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) con un alto contenido de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. La estructura del péptido LL-37 en disolución acuosa está relativamente desordenada, pero puede cambiar a una hélice al contacto con la pared bacteriana (97). LL-37 ha mostrado un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, varios

virus y hongos. En individuos sanos, la función antimicrobiana de LL-37 es eficaz a una concentración fisiológica de aproximadamente 2 µg/mL (98).

En humanos, la LL-37, en cooperación con otros péptidos antimicrobianos catiónicos (CAP), previenen la infección en los sistemas pulmonar (99) y digestivo (100). LL-37 exhibe una potente actividad contra diferentes cepas bacterianas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (101), *Staphylococcus aureus* (102), *Neisseria gonorrhoeae* (103) entre otras. La actividad bactericida de LL-37 involucra la disrupción de la membrana (formación de poros, cambios en el empaque y organización de lípidos) después de la interacción con moléculas bacterianas cargadas negativamente y la inserción en la membrana.

Además, LL-37 inhibe la formación de biopelículas bacterianas de diversas especies como *P. aeruginosa*, esto ocurre a una concentración de (0,5 µg/mL), muy por debajo de la concentración requerida para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* (MIC= 64 µg/mL). LL-37 afecta la formación de biopelícula al disminuir la fijación de las células bacterianas.

2.10 Péptidos antimicrobianos como alternativa a los antibióticos convencionales

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido descritos como armas evolutivamente antiguas contra infecciones microbianas. Producidos por todos los organismos, desde procariotas a seres humanos, los AMPs juegan un papel fundamental en la inmunidad innata (71); proporcionan una defensa efectiva contra las infecciones. Los péptidos antimicrobianos son candidatos para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos para aplicaciones específicas debido a sus propiedades antimicrobianas naturales y baja propensión al desarrollo de resistencia bacteriana

A diferencia de los antibióticos convencionales, los AMPs actúan desestabilizando y/o destruyendo las membranas celulares e, incluso, afectando blancos intracelulares. Aunque si bien se conocen algunos reportes sobre resistencia bacteriana a péptidos *in vitro*, la probabilidad de aparición de resistencia en condiciones naturales es muy baja, debido a que actúan de forma simultánea sobre

diversas estructuras bacterianas fundamentales, como la membrana y la pared celular (104). Por lo tanto, para hacer frente a los péptidos antimicrobianos, las bacterias tendrían que reorganizar las propiedades bioquímicas de su membrana prácticamente de forma total, cambiando su composición, organización y potencial transmembrana, lo que sería una solución altamente improbable y energéticamente costosa, en comparación con una mutación específica que altere un único blanco celular. Por sus diversas actividades, como su papel en la inmunidad del hospedero, su alta ubicuidad y su particular mecanismo de acción, se sugiere la posibilidad de usarlos como agentes antimicrobianos para una multitud de aplicaciones (58). A lo anterior, se adiciona el esfuerzo considerable que se ha hecho para determinar su mecanismo de acción, comprender las bases estructurales de la selectividad celular y descubrir nuevos péptidos optimizados a partir de estrategias de mejoramiento para aplicaciones específicas (105).

2.11 Diseño racional de péptidos antimicrobianos (AMPs)

Para desarrollar AMPs que sean terapéuticamente más efectivos, varios objetivos deben ser alcanzados. Debe ser activo contra el patógeno de interés y tener baja toxicidad a la dosis terapéutica (es decir, debe tener un índice terapéutico elevado). Investigaciones recientes sobre AMPs se han centrado en métodos para buscar nuevos AMPs a través de las bases de datos de secuencias de péptidos conocidos. Se conocen tres enfoques de investigación para la optimización de los AMPs: modificación de secuencias de AMPs conocidos; Modelado biofísico riguroso para entender la actividad del péptido; y el cribado virtual (106).

Al emplear péptidos conocidos como plantillas y realizar modificaciones estratégicas en la secuencia de aminoácidos, con el fin de optimizar las propiedades como carga neta, hidrofobicidad y anfipaticidad, se desea potenciar la actividad antibacteriana, incrementar la inhibición de la biopelícula, mejorar la selectividad celular, incrementar la estabilidad a proteasas y finalmente ampliar la estabilidad estructural (107). Una ventaja de este tipo de aproximación es la identificación de los aminoácidos y las posiciones que son importantes para la actividad del péptido; cecropina, magainina, protegrina, lactoferrina incluso LL-37

se han utilizado como plantillas de AMPs (108). En la mayoría de los casos, la fuente de su actividad ha sido investigada examinando variantes de péptidos que fueron diseñados sobre la base del concepto general, de que la carga, hidrofobicidad y anfipaticidad como características cruciales para la actividad peptídica, tales estudios han arrojado aportes sobre la importancia de los aminoácidos específicos y las posiciones de los residuos en la actividad del péptido.

2.12 Características de optimización

En general, los péptidos antimicrobianos en la naturaleza poseen una carga neta entre (+2 y +9) (12), lo que facilita la afinidad del péptido a la superficie de la membrana celular bacteriana a través de interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los aminoácidos catiónicos y las cabezas aniónicas de los fosfolípidos cardiolipina (CL) y fosfatidilglicerol (PG) (109), entre otros. Esta afinidad explica la correlación existente entre la carga y la actividad antimicrobiana, de tal forma que al incrementar la carga se potencia la actividad y la selectividad hacia células bacterianas. Sin embargo, el aumento de la carga en exceso más allá de incrementar la selectividad y afinidad puede disminuir la actividad antimicrobiana incluso favorecer la actividad hemolítica (110). Tal disminución de la actividad antibacteriana puede ser consecuencia de fuertes interacciones electrostáticas entre el péptido y las cabezas de los fosfolípidos aniónicos, impidiendo la inserción del péptido en la bicapa (97). Además, el exceso de aminoácidos catiónicos puede disminuir la estructura helicoidal del péptido debido a interacciones electrostáticas repulsivas e impedimento estérico entre las cadenas laterales de los residuos básicos (111).

Así mismo, la hidrofobicidad es crucial para las interacciones de los péptidos con las membranas, ya que determina el nivel en el que un péptido se une e inserta en la membrana bacteriana (112). Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos α -helicoidales deben tener un mínimo de hidrofobicidad para lograr insertarse en la membrana de las células bacterianas. Existe un rango de hidrofobicidad óptima,

donde disminuirla o aumentarla provocará una reducción significativa de la actividad antibacteriana. Esta relación no se observa con la actividad hemolítica, donde el incremento progresivo de la hidrofobicidad se correlaciona con una actividad hemolítica cada vez más fuerte (113).

Otra característica importante a tener en cuenta es la anfipaticidad, es decir contienen regiones apolares (con aminoácidos hidrofóbicos) y regiones con cargas positivas (aminoácidos catiónicos, arginina, lisina o histidina), lo que facilita que posterior a la interacción de las regiones catiónicas con los fosfolípidos aniónicos bacterianos, las regiones polares del péptido interaccionen con las cadenas polares de los fosfolípidos, lográndose la inserción del péptido en la membrana microbiana (114). Esta conformación contribuye un factor importante para la interacción del péptido con las membranas bacterianas, su posterior inserción y disrupción (114). El grado de anfipaticidad de un péptido puede medirse a través del momento hidrofóbico (115), el cual se define como la magnitud de la suma vectorial de la hidrofobicidad de cada aminoácido. En muchos casos, la optimización de la anfipaticidad, se describe como un valor alto del momento hidrofóbico y se correlaciona con una actividad antibacteriana potenciada (116).

2.13 Bases de datos de AMPs

Como los AMPs naturales se derivan en gran medida de secuencias codificadas por genes, se han aplicado métodos bioinformáticos para crear bases de datos de AMPs conocidos, así como herramientas para predecir específicamente AMPs a partir de genomas que aún no han sido anotados. Por ejemplo, el recurso AMPer se desarrolló con el objetivo de clasificar los AMPs naturales, así como predecir nuevos AMPs en el genoma bovino usando modelos ocultos de Markov (117). Otro ejemplo es la colección ANTIMIC, que contiene aproximadamente 1.700 secuencias de AMP conocidas y putativas (118). La Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (APD) (119), y más tarde el APD2 actualizado (120), es un valioso recurso de secuencias de AMPs. Esta base de datos, ofrece varias opciones de búsquedas en diferentes reinos filogenéticos. En los últimos años, el descubrimiento de AMPs de plantas y organismos marinos ha aumentado aún más

la variedad de péptidos anti-infecciosos con potencial biotecnológico y farmacéutico (121).

Los enfoques computacionales basados en este conocimiento han llevado al diseño de AMPs sintéticos, tales como las adelpantinas (antibióticos peptídicos diseñados sintéticamente) (122).

2.14 Síntesis química de péptidos

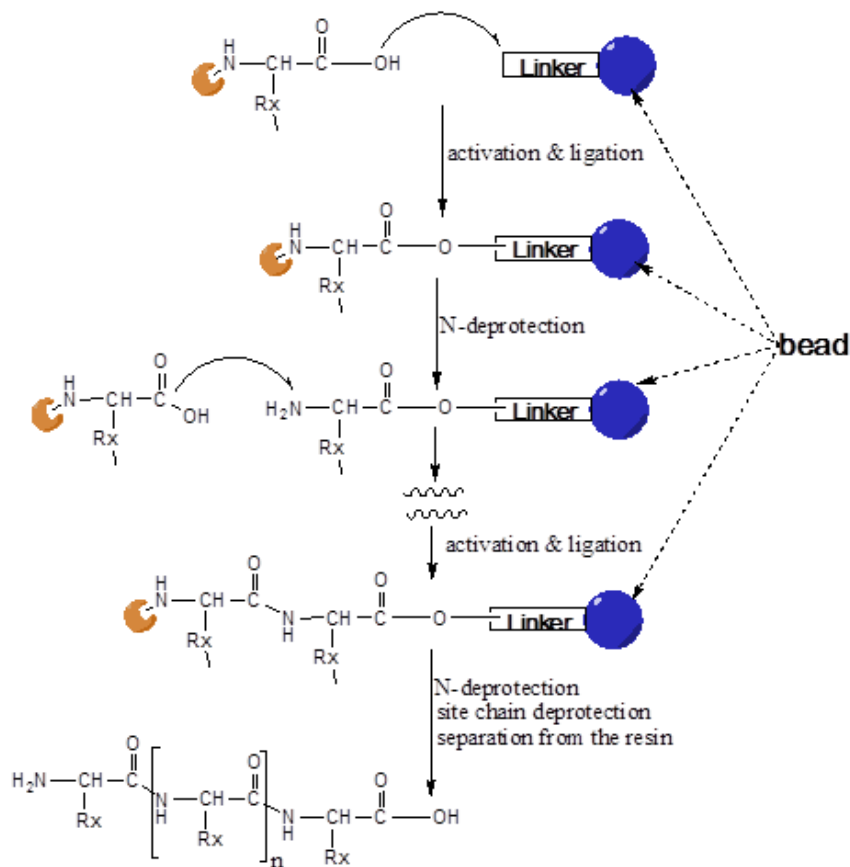
La síntesis de péptidos es la producción de péptidos, son compuestos orgánicos en los que múltiples aminoácidos están unidos mediante enlaces amida, también conocidos como enlaces peptídicos. El proceso biológico de producir péptidos largos (proteínas) se conoce como biosíntesis de proteínas. Los péptidos se sintetizan acoplado el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo amino del siguiente aminoácido. Debido a la posibilidad de reacciones no deseadas, por ejemplo, la unión errónea entre 2 aminoácidos por los extremos laterales, los grupos protectores son usualmente necesarios. La síntesis de péptidos comienza en el extremo carboxilo del péptido, y procede hacia el extremo amino. Esta es la dirección opuesta de biosíntesis de proteínas. El hallazgo realizado por Robert Bruce Merrifield en 1963 al sintetizar el tetra péptido LEU-ALA-GLY-ALA en fase sólida, fue el inicio del desarrollo de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPSS por sus siglas en inglés) (123).

2.15 Síntesis química de péptidos en fase sólida

La síntesis de péptidos en fase sólida, se basa en la unión del aminoácido desde su extremo carboxi terminal (C-terminal) a un soporte insoluble y la posterior elongación secuencial, aminoácido por aminoácido de la cadena peptídica. El crecimiento de la cadena peptídica tiene lugar siempre por el extremo carboxilo de los aminoácidos, los cuales tienen el extremo α -amino y las cadenas laterales protegidas. Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/tBu (123). La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los de los grupos α -

amino y grupos del tipo Benzil como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos. La estrategia Fmoc/tBu emplea el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo tert-butil (tBu) como protector de las cadenas laterales (124); esto se realiza para evitar, polimerizaciones o reacciones no deseadas entre las cadenas laterales. La estrategia de Fmoc/tBu, es usualmente la más empleada debido a las condiciones químicas menos nocivas que utiliza. Los péptidos se sintetizan sobre un soporte polimérico insoluble (denominado resina), que está funcionalizado con un conector al que se une el primer aminoácido. Este conector variará dependiendo del tipo de funcionalización que se desee obtener en el péptido final (carboxilo, amida, aldehído, etc), posteriormente se realiza el acople del primer aminoácido.

Figura 6: Los principales pasos de SPPS por Fmoc



Como se observa en la Figura 6, se describen gráficamente los pasos esenciales de la síntesis de péptidos en fase sólida SPPS (como se ha descrito anteriormente). En una etapa final, el péptido se libera del soporte o resina y se eliminan los grupos protectores de la cadena lateral. Generalmente, los grupos protectores de cadena lateral y el enlace de resina se eligen de una manera que los grupos protectores pueden ser eliminados y los péptidos ensamblados liberados en las mismas condiciones, tomado y adaptado de (125).

3. Materiales y métodos

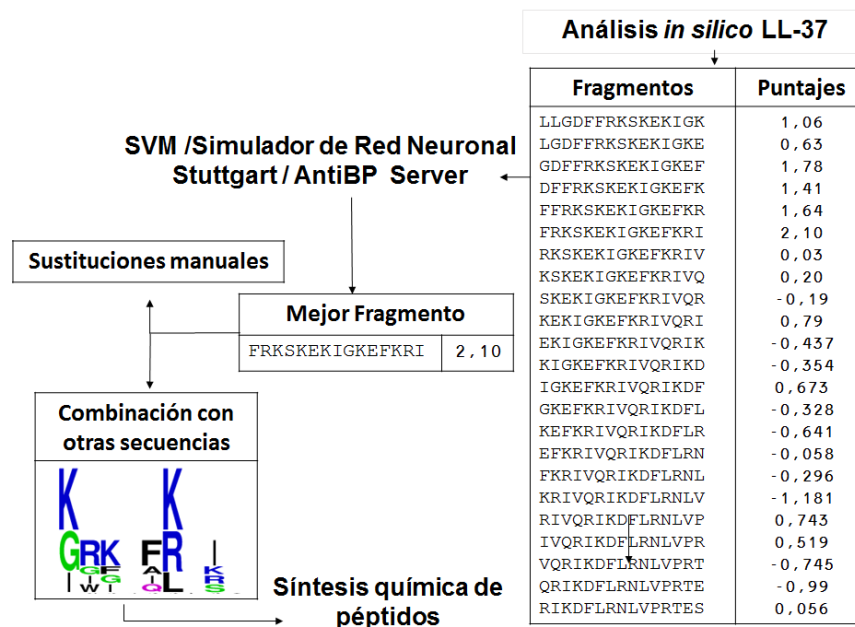
3.1 Diseño computacional y síntesis de péptidos

Se diseñaron cuatro péptidos análogos de LL-37, haciendo uso de la base de datos de péptidos antimicrobianos “APD”, (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) se obtuvo la secuencia completa de 37 residuos de la catelicidina humana LL-37, tomando la secuencia completa se realizó la exploración del carácter antimicrobiano, evaluando la secuencia desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal en el servidor “AntiBP Server” (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/index.html>) con el fin de analizar *in silico* fragmentos de 15 aminoácidos que presentaran la mejor puntuación antimicrobiana dentro de la secuencia completa de 37 aminoácidos (126). El algoritmo utiliza una Máquina de Vector de Soporte (SVM), la cual fue entrenada por un Sistema Simulador de Red Neuronal SNNS, con una sola capa de ocultamiento con 20 nodos, 300 unidades de entrada (20X15) y una unidad de salida de 15 aminoácidos, esto genera fragmentos de (15 residuos de longitud), a cada fragmento, se le asigna un “score” antimicrobiano el cual está directamente implicado con su actividad antimicrobiana predicha bioinformáticamente.

Se tomó el fragmento que presentó el puntaje antimicrobiano más alto y basándonos en análisis estadísticos de predicción de motivos altamente frecuentes en péptidos antimicrobianos hallados en la naturaleza se sabe que residuos como Gly, Lys, Leu se encuentran en una alta proporción en el N-terminal, mientras que residuos como Ile y Arg aparecen en el C-terminal (120), siguiendo esta

aproximación, realizamos sustituciones racionales empleando estos residuos en los extremos N y C terminal del fragmento con el mayor puntaje predicho por AntiBP server, con el fin de incrementar aún más el puntaje antimicrobiano. Es importante mencionar que para cada sustitución, se verifico el puntaje antimicrobiano de la secuencia, con el fin de saber si dicha sustitución interviene en el incremento o no del puntaje antimicrobiano como se muestra en la Figura XX. Luego con el fin de optimizar aún más las secuencias, se fusionó el mejor fragmento predicho-modificado manualmente con secuencias reportadas que presentaron por ensayos *in vitro* ya sea una mejor selectividad hacia células bacterianas (Fragmento KR-12) (127) ó una elevada actividad anti-biopelícula como la región consenso del péptido 1037 (128), fragmentos de magainina II y cecropina A (129). Los fragmentos de estos péptidos fueron seleccionados también con base a reportes sobre su estructura central α -hélicoidal responsables de la actividad antimicrobiana. Aquellas combinaciones que no aportaron en el incremento del puntaje antimicrobiano no se tuvieron en cuenta para la síntesis de las secuencias peptídicas. La tabla 2 describe las secuencias empleadas en el diseño de los péptidos con sus respectivos puntajes antimicrobianos.

Figura 7: Algoritmo para el diseño de los péptidos análogos a catelicidina humana LL-37



Para determinar el grado de anfipaticidad se empleó el modelo de rueda de Schiffer-Edmundson (130) para cada péptido diseñado (LL37-1, LL37-2, LL37-3, LL37-4). Adicionalmente se calculó la carga neta a pH 7.0 utilizando el programa “Peptide property calculator” (<http://www.innovagen.se/custom-peptidesynthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>) y se hizo la predicción del porcentaje de estructura α -helicoidal en la secuencia de aminoácidos, utilizando el portal ExPASy-SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/>) y el servidor “PSSpred Protein Secondary Structure Prediction:” (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSpred/>) el cual usa un algoritmo de entrenamiento de red neuronal para la predicción exacta de la estructura secundaria de proteínas. El resultado final de la predicción de estructura secundaria es un consenso de 10 predictores diferentes (131), comparando estos resultados de predicción de estructura con los experimentos de dicroísmo circular y la relación entre la estructura secundaria y la carga del péptido. Finalmente se predijo para cada péptido la posible actividad anti-biopelícula *in silico*, empleando el modelo basado en SVM/Weka de la base de datos “dPABBs” (<http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibiofilm/index.php>) (132).

Tabla 2: Nombre y secuencias de péptidos empleados para la generación de secuencias péptidos híbridos con sus respectivos puntajes antimicrobianos

Nombre	Nombre alternativo	Secuencia	Puntaje Antimicrobiano*
LL-37	LL-37 Nativo	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLLVPRTES	
Mejor fragmento predicho	LL-37(6-20)	FRKSKEKIGKEFKRI	2.108
KR-12	LL-37(18-29)	KRIVQRIKDFLR	N/A
LL37-1		GRKS <u>AK</u> KIGK RA KRIVQRIKDFLR	3,120
LL37-2	LL-37(6-29)	FRKSKE KIGKEFKRIVQRIKDFLR	2.108
LL37-3	1037(1-6) y LL-37(7-20)	<u>KRFRI</u> RRKS AK KIGK RA KRI	3.557
LL37-4	LL-37(1-20)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRI	2.108
péptido 1037	Región consenso	<u>KRFRI</u> R	3.557
MALL	Magainina(1-12) y LL-37(13-25)	GIGKFLHSAKKFFKRIVQRIKDFLR	2.638
CaLL	Cecropina(1-12) y LL-37(13-25)	KWKLFKKIFKRIVQRIKDFLR	1.603

En negrilla se muestran los residuos de la secuencia nativa de LL-37, los residuos subrayados corresponden a aquellos residuos que manualmente fueron sustituidos que mostraron un incremento en el score antimicrobiano

3.2 Síntesis de los péptidos en fase sólida:

Los péptidos híbridos (*LL37-1*, *LL37-2*, *LL37-3*, *LL37-4*) fueron manualmente generados empleando la metodología inicialmente desarrollada por Merrifield para síntesis múltiples de péptidos en fase sólida (SPPS) (133), posteriormente modificada por Houghten para la síntesis de péptidos basados en Fmoc (134). Brevemente, se empleó como soporte resina sólida Rink amida, con una matriz de sustitución de 0,52 mmol/g, como activadores de la reacción de acople se recurrieron principalmente dos estrategias: 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y/o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Sin embargo, en los casos en los cuales no finalizaba la reacción de acople, se empleó una tercera estrategia mediante activación del aminoácido con TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato) y DIEA (N,N-Diisopropiletilamina) con un tiempo de reacción de 2 horas (135). Los disolventes que se utilizaron fueron diclorometano (DCM), isopropanol (IPA), N,N'-dimetilformamida (DMF). Se emplearon L- α - aminoácidos con grupo protector 9-fluorenilmetoxicarboxilo (Fmoc) de la función α -amino terminal y como agente de desprotección se utilizó piperidina en DMF al 20%. El grupo protector de la cadena lateral para la Lisina (K) es tertbutoxicarbonilo (Boc), para otros aminoácidos es el grupo tertbutilo (tBu), y algunos aminoácidos no poseen protección en su cadena lateral cuando su reactividad es nula como el caso de la alanina. Para iniciar la síntesis la resina Rink amida tiene el grupo Fmoc como protector, por lo tanto, debe ser desprotegida con Piperidina al 20% en DMF durante 15 minutos (2 veces), luego la resina se lavó con DMF (5 x 1 min), IPA (2 x 1 min) y DCM (2 x 1 min); se adiciono el primer aminoácido previamente activado con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF, con agitación constante durante 15 min. La mezcla de reacción permanece en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante, se hicieron lavados por ciclos de la siguiente manera: DMF 2 veces durante 1 min, luego IPA 2 veces durante 1 min y finalmente DCM 2 veces durante 1 min.

Para verificar que el acople se halla efectuado correctamente se empleó la prueba de Ninhidrinás o test de Kaiser que permite identificar específicamente los grupos amino primarios libres en el extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento desprotegidos (en acople o en desprotección) mediante una reacción colorimétrica azul en la solución y en la resina. Se debe utilizar un control negativo que se realiza sin resina. A través de este test se controla que la cadena peptídica este elongándose correctamente, hasta no obtener un resultado negativo, (Color amarillo) no se puede adicionar el siguiente aminoácido. Al finalizar la síntesis se usó una solución de ácido trifluoroacético (TFA) (TFA, Honeywell- Burdick & Jackson) al 95%, triisopropilsilano (TIS, Sigma-Aldrich) al 2,5% y agua al 2,5% en la proporción 95:2.5:2.5 (v/v) respectivamente, para liberar el péptido de la resina procedimiento conocido como clivaje y se realizó la extracción de cada péptido con éter etílico (Honeywell-Burdick & Jackson) frío. La solución se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a una temperatura de 5°C y el sobrenadante se desechó. A continuación, se realizaron 5 lavados con éter etílico centrifugando (4000 rpm) en cada lavado. Finalmente, se obtuvieron los péptidos crudos, se secaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en un desecador.

3.3 Purificación y caracterización de los péptidos

La pureza y la identidad de los péptidos fueron analizadas, mediante cromatografía analítica líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Para esto se preparó una solución stock de péptido (1 mg/mL) disuelto en TFA al 0.05% disuelto en H₂O. Empleando una columna (Discovery C18 15 cm x 4.6 mm 5 µm) en un gradiente A/B de 0 a 70% de B (A: Agua desionizada 0,05% TFA, B: acetonitrilo 0,05% TFA, flujo 1,0 mL/min) durante 45 minutos en el equipo (Akta explorer 10, GE life sciences) con un detector UV, a 210 nm de longitud de onda. El sistema se programó para generar un gradiente lineal de 0% al 70% de solvente en 45 min, (solvente: Acetonitrilo (ACN, Honeywell- Burdick & Jackson) con TFA al 0.05%) con un flujo 1 mL/min. Luego los péptidos fueron eluidos según el porcentaje de acetonitrilo determinado en la columna RP-HPLC analítica, se determinó un estimativo de los porcentajes y el gradiente de elución manualmente.

Posteriormente se purificaron los picos principales empleando columnas Sepak C-18 (Supelco, Sigma-Aldrich) por RP-HPLC semi-preparativa con las condiciones adecuadas de elusión en gradiente de acetonitrilo-H₂O, hasta obtener un solo pico del eluido. Brevemente, se pesó 10 mg de péptido y se resuspendió en 1 mL de agua ultrapura MiliQ, luego una columna Sepak se activó con 3 mL de Metanol 3 veces, se pasó por la columna 100% de solución A: (50 mL de acetonitrilo + 1 mL TFA + 949 mL de agua) para eliminar las trazas de metanol, luego se empezó el gradiente de concentración de la solución B: (700 mL Acetonitrilo + 1 mL TFA + 299 mL de agua) empezando en el porcentaje de acetonitrilo cercano al porcentaje de elusión observado en la cromatografía analítica; se amplió el gradiente de esta zona para obtener picos individuales de cada péptido; es importante mencionar que cada fracción fue recogida en tubos Eppendorf, se evaporó el componente de acetonitrilo mediante centrifugación por medio de SppedVac durante 4 horas, luego cada fracción fue resuspendida en 1 mL de agua MiliQ y finalmente se verificó la obtención de un único pico por cromatografía semi-preparativa RP-HPLC. Lo anterior se repitió hasta obtener los cuatro péptidos hasta una pureza de 95%, suficiente para realizar los ensayos biológicos correspondientes.

Además, a los péptidos se les determinó el peso molecular por espectrometría de masas de ionización por láser-desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) empleando el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Alemania). Posteriormente fueron liofilizados, identificando la tendencia de estructura secundaria mediante experimentos de dicroísmo circular (136).

Los péptidos una vez sintetizados, caracterizados y liofilizados, fueron resuspendidos en agua ultra pura a una concentración de 1 mM (solución stock) almacenándose a -20°C hasta su uso.

3.4 Dicroísmo circular

Para el ensayo de dicroísmo circular (DC), los péptidos se analizaron en un espectropolarímetro JALISCO-J-810, calibrado con ácido d-10- camforsulfónico,

con corrección de la línea base. El equipo está provisto de un porta-cubetas con termostato conectado a un baño refrigerante a 22 °C; se emplearon celdas de cuarzo cilíndricas de 0,01 cm de paso de luz. Las condiciones para la captura del espectro fueron: velocidad de 0.7 nm/segundo, ancho de banda 1 nm, sensibilidad estándar, rango de 190-260 nm, el barrido de 20 nm/min, se realizaron tres acumulaciones del espectro. Se preparó una solución stock de la muestra a 5×10^6 mM y una concentración de trabajo de 200 μ M, las muestras se prepararon en Trifluoroetanol (TFE) al 30% y se registró el espectro para cada péptido. Se realizó además una corrección de la línea base por sustracción del espectro del solvente y suavización del mismo.

3.5 Selección de aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp

Para la selección de los aislamientos de *Staphylococcus* spp se realizó un muestreo aleatorio por conveniencia partiendo de una población de 44 aislamientos *Staphylococcus* spp recuperados a partir de infecciones intra-hospitalarias provenientes de instituciones de 2do y 3er nivel de la ciudad de Bogotá. Es importante mencionar que los aislamientos de *Staphylococcus* spp se encuentran en el cepario de la Universidad El Bosque, específicamente en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana. Como cepas control, se utilizó *S.epidermidis* ATCC 35984 (Cepa formadora de biopelícula) y *S.epidermidis* ATCC 12228 (Cepa no formadora de biopelícula). Los aislamientos fueron caracterizados genotípicamente y fenotípicamente con el fin de corroborar su capacidad de formación de biopelícula, aquellos aislamientos que resultaron tener las características propias de la formación de biopelícula tanto genotípicas (presencia de genes operón *IcaRADBC*) como fenotípicas (formación *in vitro* de biopelícula) fueron seleccionadas para realizar los ensayos de actividad de los péptidos análogos catelicidina humana LL-37 previamente sintetizados. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer) para todos los antibióticos ensayados (AMP: ampicilina, ERY: Eritromicina, GEN: Gentamicina, CTX: cefotaxime, CIP: Ciprofloxacina, TET: Tetraciclina, SXT: Trimethoprim – Sulfametoxazol, TMP:

Trimetropim, GEN: Gentamicina. SMX: Sulfametoxazol, CLIN: Clindamicina, OXA: Oxacilina) siguiendo las recomendaciones y el criterio de interpretación establecida por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico –CLSI. Aislamientos sensibles: $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, aislamientos con sensibilidad intermedia: $8 \mu\text{g/mL}$ y aislamientos resistentes: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$.

Criterio de Inclusión en pruebas de inhibición de biopelícula

Aquellos aislamientos clínicos que resultaron tener las características propias de la formación de biopelícula tanto genotípicas (presencia de genes operón *icaRADBC*) como fenotípicas (buena formación *in vitro* de biopelícula ($\text{OD } 1 \pm 0.5$), resistencia a más de 3 antibióticos), fueron seleccionados para probar la actividad antibiopelícula de los péptidos análogos de LL-37 diseñados y sintetizados.

3.6 Caracterización aislamientos clínicos

Como se mencionó anteriormente, los aislamientos de *Staphylococcus* sp fueron caracterizados genotípica y fenotípicamente con el fin de corroborar su capacidad de formación de biopelícula. En primera instancia se realizó la detección de los genes que codifican para el operón *IcaRADBC*, considerado uno de los elementos genéticos más estudiados en la formación de biopelícula de *Staphylococcus* (137) (138) mediante la técnica de PCR múltiple. En la Tabla 2 se describe la secuencia de los iniciadores y el tamaño del amplímero esperado.

Tabla 3: Iniciadores operón *IcaRADBC*

	Nombre Gen	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño Fragmento (Pb)
Operón <i>ica</i>	icaR	<i>icaR</i> -F	TAATCCCGAATTTTTGTGAA	469
		<i>icaR</i> -R	AACGCAATAACCTTATTTTCC	
	icaA	<i>icaA</i> -F	ACAGTCGCTACGAAAAGAAA	103
		<i>icaA</i> -R	GGAAATGCCATAATGACAAC	
	icaC	<i>icaC</i> -F	CTTATCACCGCTTCTTCTTTT	403
		<i>icaC</i> -R	CGGAAACAGCGATAAATAAA	
icaD	<i>icaD</i> -F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	
	<i>icaD</i> -R	CGGAAACAGCGATAAATAAA		
ureD	ureD	ureD-F	TGCCTAATGACCATGTAGTCCTAA	550
		ureD-R	TGTCGATGATAAATCGTTTGATTG	

La extracción de ADN de los aislamientos de *Staphylococcus* se realizó usando el kit (Easy-DNA kit Invitrogen), adicionando 2 µg/mL de lisozima para facilitar su extracción.

Además se verificó su perfil de resistencia y la capacidad de formar biopelícula fenotípicamente.

3.7 Relación clonal de los aislamientos clínicos

La relación genética de los aislamientos se determinó por medio de restricción genómica con la enzima SmaI y posterior separación por electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE). Esta técnica tiene como objetivo la obtención de patrones legibles de bandas (denominados PFPs, pulsed-field profiles) característicos de cada aislado obtenidos mediante la utilización de una determinada enzima de restricción. Es un sistema de genotipado que se caracteriza por el análisis del ADN cromosómico. Básicamente consiste en la fragmentación del genoma bacteriano mediante enzimas de restricción. Posteriormente se realiza una electroforesis multidireccional con pulsos eléctricos de diferente duración, que permite la separación de fragmentos de hasta 15 Mb. Consta de los siguientes pasos: 1. Extracción y purificación del ADN en condiciones que permitan resultados reproducibles. 2. Digestión del ADN mediante endonucleasas que reconocen unas pocas secuencias diana. 3. Electroforesis del producto de digestión en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico. Se prepararon discos de agarosa con el ADN cromosómico y se realizó la restricción con la enzima SmaI. Los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa al 1 % usando un aparato CHEF- DR III (Biorad Laboratorios, Richmond, CA, EE. UU). Con las siguientes condiciones de corrida: 6 V/cm y pulsos de 2 a 20 segundos durante 20 horas, a 11,3 °C

De acuerdo con las condiciones descritas por Chung y colaboradores (139). Los resultados de PFGE se analizaron utilizando el software GelCompar II™ (Biorad), con el coeficiente Dice y una tolerancia de 1,5 %. La interpretación de la relación genética de los pulsotipos encontrados se realizó de acuerdo con los criterios sugeridos por Tenover y colaboradores (139).

3.8 Ensayo de placa en 96 pozos para biopelículas

Luego de haber corroborado la presencia o ausencia de los genes del operón *IcaRADBC*. La formación de biopelícula se analizó inicialmente utilizando una superficie sólida, abiótica (140). Se realizaron diluciones de cultivos bacterianos de 18 h de (1/100) en diferentes condiciones: Medio BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), TSB (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) con 0,5, 1 y 1,5 % (peso/volumen) de glucosa en placas de microtitulación de polipropileno (Falcon, USA) y poliestireno (Costar, USA) con la presencia y/o ausencia de los diferentes péptidos análogos de LL-37 durante 22 horas a 37 °C. Se eliminaron las células planctónicas, mediante lavados con agua destilada estéril. Las células formadoras de biopelícula adheridas en el fondo de los pozos, fueron teñidas con cristal violeta (141), se midió la densidad óptica a 595 nm (OD₅₉₅; 600 nm) usando un lector de placas de microtitulación (Bio-Tek Instruments Inc., Estados Unidos). Los péptidos de LL-37 fueron añadidos al tiempo cero, a concentraciones decrecientes entre 100-6.25 µM y la disminución de la formación de biopelículas se registró a las 24 horas. Como punto de corte para la formación de biopelícula de los aislamientos para ser considerados como aislamientos formadores positivos fue considerado una densidad óptica OD 1 ± 0.5 y como no formadores un OD 0.3 ± 0.5 .

3.9 Cultivo de biopelícula en la cámara de flujo celular y microscopía confocal

Las biopelículas se cultivaron en cámaras de flujo con las dimensiones de canales de 164 x 640 mm durante 72 h a 37°C, como se describe previamente (142). En presencia o ausencia de la concentración deseada de los péptidos LL37-1 y LL37-2, por haber presentado menor grado de toxicidad. Las cámaras de la celda de flujo se inocularon mediante la inyección de 400 µL de cultivo 18 h. Después de la inoculación, las cámaras se quedaron sin flujo durante 2 h para permitir la adherencia inicial; posteriormente se procedió al flujo de medio basal BM2 (0.07 M (NH₄)₂SO₄, 0.4 M K₂HPO₄ y 0.22 M KH₂PO₄) con o sin concentraciones del péptido LL37-1. Se bombeó a través del sistema a una velocidad constante de 2,4 mL/h.

En todos los casos, después de 3 días de crecimiento la velocidad de flujo (90 rpm) se incrementó con el fin de reducir la cantidad de células planctónicas y poco adheridas dentro de la cámara de flujo.

Todos los medios utilizados en ensayos de células de flujo apoyaron el crecimiento en estado planctónico de las especies bacterianas que se ensayaron, tal como se determina por curvas de crecimiento. Las concentraciones del péptido LL37-1 utilizados fueron entre 5 μM y 1,25 μM . Las diferentes concentraciones utilizadas corresponden a concentraciones inferiores a aquellas que demostraron citotoxicidad en células humanas. Para el tratamiento de biopelículas existentes, se permitió que las bacterias formen biopelícula estructurada durante 3 días antes de la adición del tratamiento con los péptidos en el flujo, la actividad del tratamiento se verificó por las siguientes 24 h. Finalmente, se tiñeron las células de la biopelícula utilizando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, OR). Se empleó una relación de Syto-9 (fluorescencia verde, células vivas) y Yoduro de Propidio (PI) (fluorescencia roja, células muertas) de 1:5. La microscopía se realizó utilizando un microscopio de escaneo láser confocal (Olympus, Fluoview FV1000) y las reconstrucciones tridimensionales fueron generados usando el paquete de software Zen (ZEISS Confocal Microscopy). La cuantificación del bio-volumen general biopelícula (mm^3) y el porcentaje de volumen de las células vivas y muertas se realizaron utilizando software Imaris (143). Se realizaron tres replicas biológicas de para cada aislamiento.

3.10 Experimentos de crecimiento microbiano

Con el fin de verificar el posible efecto inhibitorio de los péptidos sintetizados en el crecimiento microbiano de células en estado planctónico, se realizaron curvas de crecimiento. Se prepararon diluciones en serie en triplicado del inóculo utilizando LB fresco para obtener un intervalo de diluciones que representan aproximadamente $0-10^5$ UFC mL^{-1} .

A partir de cada una de las dos diluciones, se transfirieron 350 μL a pozo (40 pozos por dilución) de una placa Bioscreen (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Las placas laminadas se colocaron en el equipo Bioscreen para su análisis. Las mediciones

se tomaron usando un filtro de banda ancha, con agitación constante para impedir la adherencia de las células en el fondo de la placa a intensidad media, a una temperatura de incubación de 37 °C. Las mediciones se realizaron cada 4 min durante 48 h. Los péptidos fueron agregados en el tiempo 0 en un gradiente de concentración entre 5 a 0,62 μM . Los resultados se reportaron como la reducción en el crecimiento bacteriano en presencia de péptido en comparación con crecimiento basal bacteriano en ausencia de péptido.

3.11 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados en células humanas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica recogidas a partir de sangre de voluntarios adultos sanos en tubos con anticoagulante heparina de sodio (BD Biosciences). La sangre se diluyó 1:1 con buffer tampón de PBS pH 7.0. Las células fueron separadas empleando Ficoll-Paque (GE Healthcare) por centrifugación (Beckman Coulter Allegra 6R) durante 20 minutos a 1450 rpm. Las células polimorfonucleares (PBMC) se recogieron y se lavaron dos veces con buffer PBS. Luego se resuspendieron en medio completo RPMI 1640 (Hyclone) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA) y se cuantificó la viabilidad celular por medio de azul de Trypan (Sigma Aldrich, USA) empleando microscopio óptico (Olympus, FV1000).

Las células PBMC se diluyeron a 1×10^6 células/mL en RPMI 1640 suplementado y se sembraron en una placa de 48 pozos (Falcon, USA) a un volumen final de 500 μL en cada pozo. Después las células se dejaron en la incubadora durante 2 horas a 37°C en 5% de CO₂. A continuación, se trataron con los péptidos LL37-1, LL37-2. A concentraciones decrecientes entre 100 - 6.25 μM . Como control positivo, se utilizó 2% de Tritón X-100. Después de 24 horas de exposición a 37°C en 5% de CO₂, el contenido de cada pozo se transfirió a un tubo Eppendorf, y después por centrifugación, se sedimentaron las células (Thermo Electron) a 2000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C antes de determinar la liberación de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH). Todos los tratamientos se llevaron a cabo 3 veces.

- **Ensayo de LDH:**

La toxicidad de los péptidos LL37-1 y LL37-2 en PBMCs se evaluó mediante la determinación de la liberación de la enzima LDH en sobrenadantes después de haberse realizado el tratamiento (144). El ensayo se llevó a cabo tres veces, empleando tres donantes diferentes.

Es un método colorimétrico de la medición de la citotoxicidad/citólisis basado en la medición de la actividad de la enzima LHD liberada del citosol de las células dañadas en el sobrenadante. Este ensayo se puede usar para medir la liberación de LDH mediada.

Se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada dilución mediante la fórmula (Detección de Citotoxicidad Kit (LDH) Manual de Instrucción, Roche):

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{(\text{ABS promedio Células expuestas a cada Péptido} - \text{ABS RPMI}) * 100}{(\text{ABS Triton} - \text{ABS RPMI})}$$

3.12 Efecto Hemolítico de los péptidos sintetizados

La actividad hemolítica de los péptidos sintetizados se evaluó sobre células eritroides de origen humano, esta prueba permitió identificar el nivel de toxicidad de los péptidos sobre los hematíes y evidenciar su actividad sobre la bicapa lipídica de las membranas de estas células. Se incubaron 90 μL de glóbulos rojos provenientes de donantes sanos grupo O Rh+ al 3% en solución salina al 0.9% (Baxter, Colombia). Se estudiaron 5 diluciones seriadas por triplicado de cada uno de los péptidos en gradiente de concentración desde en 100 μM hasta 6.25 μM a un volumen final de 100 μL por pozo (90 μL glóbulos rojos + 10 μL de péptido), los eritrocitos no expuestos a las diferentes concentraciones de péptido en solución salina corresponden al 0% de hemólisis, y eritrocitos expuestos a Tritón al 100% corresponde al control positivo de hemólisis. Se incubaron en placas (Greiner Bio-one fondo U, USA) durante 2 horas a 37°C. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron las suspensiones de eritrocitos expuestos a los péptidos y controles

a 3500 rpm por 10 minutos, recolectando cuidadosamente los sobrenadantes y midiendo la absorbancia a 540 nm, para calcular posteriormente, el porcentaje de hemólisis. La ausencia de hemólisis (blanco) y el 100% de lisis (control) se determinó reemplazando respectivamente la solución del péptido antimicrobiano con un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS) o Tritón al 100 %. Se calculó el porcentaje de hemólisis para cada dilución mediante la fórmula (145):

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{(\text{ABS promedio eritrocitos expuestos a cada péptido} - \text{ABS RPMI}) * 100}{(\text{ABS Triton} - \text{ABS RPMI})}$$

Los datos fueron exportados a Microsoft Excel 2013 para su procesamiento y posteriormente analizados mediante el programa GraphPad Prism 6.0 ® (La Jolla, CA, USA) para la determinación de la concentración hemolítica media (CH50) la cual corresponde a la concentración del péptido que ocasionó la hemólisis del 50% de los eritrocitos en suspensión.

3.13 Análisis estadístico

Los valores normalizados fueron analizados y graficados; los resultados se expresaron como la media aritmética \pm error estándar de la media con un límite de confianza del 95%. Se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI50) en μM y la concentración efectiva 50 (CE50) en concentraciones molares (μM) por un método de regresión no lineal en la relación dosis-respuesta utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0 (San Diego, CA). Se consideró estadísticamente significativo un P valor $<0,05$. Se realizó un análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido de un post test de Tukey para comparaciones múltiples, el cual permitió comparar los valores medios obtenidos para los grupos problema y las diferentes concentraciones de péptidos empleados, teniendo en cuenta el error asociado. En el ANOVA se consideró que la diferencia entre los grupos tratados fue significativa cuando $P < 0.05$ (95% de confianza), (No asterisco $P > 0.05$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

Este análisis permitió conocer el efecto producido por los péptidos sobre la inhibición en la formación de biopelícula así como la concentración inhibitoria 50 (CI50) en μM , que corresponde a la concentración capaz de inducir reducción de la viabilidad del 50% de las células bacterianas.

4. Resultados y Discusión

4.1 Análisis computacional y síntesis de péptidos

Para el diseño bioinformático de los péptidos análogos a LL-37, se empleó en primera medida, el servidor (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/index.html>) y la base de datos (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) para realizar el análisis *in silico* de fragmentos de 15 aminoácidos que presentaron dentro de la secuencia completa de 37 aminoácidos la mejor puntuación antimicrobiana (126). Como se muestra en la Tabla 4, luego basándonos en análisis estadísticos de predicción de motivos altamente frecuentes en péptidos antimicrobianos hallados en la naturaleza, los residuos como Gly, Lys, Leu se encuentran en una alta proporción en el N-terminal, mientras que residuos como Ile y Arg aparecen en el C-terminal, siguiendo esta aproximación, realizamos sustituciones racionales empleando estos residuos en los extremos N y C terminal del fragmento predicho por AntiBP server, para cada sustitución, se verifico el score antimicrobiano de la secuencia, con el fin de saber si dicha sustitución interviene en el incremento o no del puntaje antimicrobiano. Por ejemplo, durante el diseño del péptido LL37-1, observamos que las siguientes sustituciones: Phe-1 por Gly, Glu-6 por Lys, Glu-11 por Arg y Phe-12 por Ala dentro del péptido nativo de LL-37, condujo a un secuencia análoga con un aumento de la puntuación antimicrobiana cuya puntuación antimicrobiana aumentó de 2.108 a 3.120 (Tabla 5).

A continuación, para mejorar aún más el índice terapéutico, se realizó la creación de péptidos híbridos fusionando el mejor fragmento predicho y modificado manualmente con secuencias reportadas que presentaron por ensayos *in vitro*, ya sea una mejor selectividad hacia células bacterianas (Fragmento KR-12) o una elevada actividad anti-biopelícula (región consenso del péptido 1037). Los híbridos

variantes LL37-1 y LL37-3 corresponden a la unión con el fragmento de los residuos 18–29 del péptido nativo LL-37 llamado KR-12 y con la unión de la región consenso anfipática (FRIRVRV) del péptido 1037 respectivamente, mientras que los péptidos LL37-2 y LL37-4 corresponden a secuencias control de cambios de los péptidos LL37-1 y LL37-3 respectivamente. Como se muestra claramente en la Tabla 2.

Así mismo, para el diseño de los péptidos, se tuvieron en cuenta otros parámetros, inicialmente, las construcciones de los péptidos híbridos se analizaron en base a su propensibilidad de formar estructuras α -helicoidales a partir de valores antimicrobianos predichos bioinformáticamente por el software AntiBP-Server. Aquellas secuencias peptídicas predichas con un elevado valor antimicrobiano, fueron seleccionadas con base a la distribución de los residuos hidrófobos a lo largo de la secuencia con una proporción substancial de ($\geq 30\%$) y la distribución de residuos cargados positivamente. Las proyecciones axiales de rueda helicoidal por el modelo Schiffer–Edmundson mostradas en la Figura 8 indican que los dominios antimicrobianos de los cuatro péptidos (LL37-1, LL37-2, LL37-3 y LL37-4) demuestran una segregación similar de los residuos no polares y residuos cargados positivamente en las cuatro secuencias, mostrando rasgos de anfipaticidad y una posible estructura helicoidal. La anfipaticidad es común en todos los péptidos antimicrobianos y les permite interactuar electrostáticamente con los fosfolípidos de membranas bacterianas cargados negativamente permitiendo que la cara no polar del péptido se inserte en la membrana microbiana induciendo permeabilidad y pérdida de la función de barrera con el exterior celular.

Dado que las biopelículas en general presentan una carga negativa consideramos que además de la estructura preferencial α -helicoidal e hidrofobicidad, para el diseño de los péptidos análogos a la LL-37 la carga neta positiva era una condición necesaria a tener en cuenta, razón por la cual no se tuvieron en cuenta aquellas construcciones peptídicas que mostraron una carga neta positiva inferior a (+3). Se observa en la (Tabla 5), fragmentos con carga neta positiva mayor o igual a (+4). Debido a que los AMPs que existen en la naturaleza muestran una carga neta positiva de (+6), se considera que un péptido con una carga más alta presenta una mayor probabilidad de especificidad antibacteriana directa.

Tabla 4: Análisis *in silico* de la secuencia completa del péptido nativo LL-37

	Fragmentos de 15 residuos del péptido LL-37	Score	Carga (+)
1	L L G D F F R K S K E K I G K E F K R I V Q R I K D F L R N L V P R T E S		
2	L L G D F F R K S K E K I G K	1,065	5
3	L G D F F R K S K E K I G K E	0,636	5
4	G D F F R K S K E K I G K E F	1,789	5
5	D F F R K S K E K I G K E F K	1,412	6
6	F F R K S K E K I G K E F K R	1,64	6
7	➔ F R K S K E K I G K E F K R I **	2,108	7
8	R K S K E K I G K E F K R I V	0,036	7
9	K S K E K I G K E F K R I V Q	0,207	5
10	S K E K I G K E F K R I V Q R	-0,197	4
11	K E K I G K E F K R I V Q R I	0,79	6
12	E K I G K E F K R I V Q R I K	-0,437	4
13	K I G K E F K R I V Q R I K D	-0,354	4
14	I G K E F K R I V Q R I K D F	0,673	5
15	G K E F K R I V Q R I K D F L	-0,328	3
16	K E F K R I V Q R I K D F L R	-0,641	4
17	E F K R I V Q R I K D F L R N	-0,058	3
18	F K R I V Q R I K D F L R N L	-0,296	4
18	K R I V Q R I K D F L R N L V	-1,181	4
20	R I V Q R I K D F L R N L V P	0,743	3
21	I V Q R I K D F L R N L V P R	0,519	3
22	V Q R I K D F L R N L V P R T	-0,745	3
23	Q R I K D F L R N L V P R T E	-0,99	2
24	R I K D F L R N L V P R T E S	0,056	2

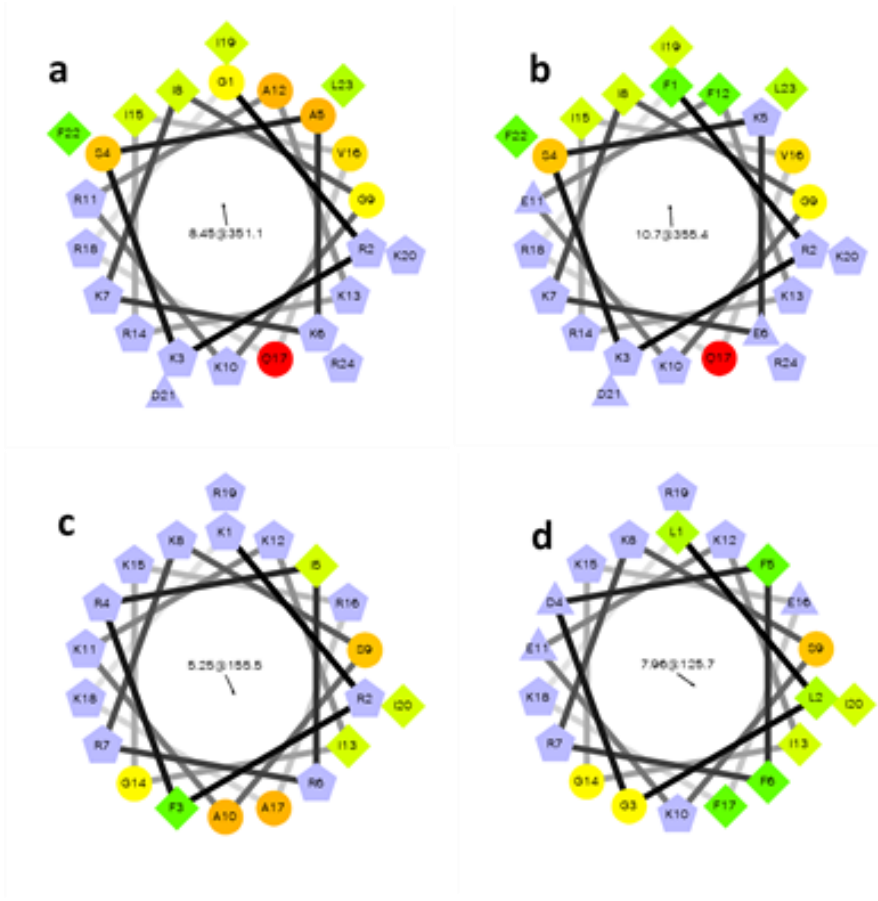
** Secuencia de 15 residuos con mejor puntaje antimicrobiano

Tabla 5: Nombre y secuencia de péptidos comparados y sintetizados

Péptidos Antimicrobianos	Secuencia	Carga neta a pH 7.0	PM	Propensión estructura secundaria	Puntaje antimicrobiano	Actividad anti-Biopelícula**	Referencia
KR-12	K R I V Q R I K D F L R	4	1571.9	Hélice- α	NA	Si	(146)
LL-37 (Modificado)	G R K S A K K I G K R A K R I	8	1697.1	Hélice- α	3.120	Si	(147)
KR-31	I G K E F K R I V Q R I K D F L R N L	4	2373.8	Helices'- α	0.673	Si	(148)
Región consenso péptido 1037	K R F R I R V R V	5	1229.5	Laminas- β	NA	Si	(128)
MALL -II (1-12 mer)	G I G K F L H S A K K F F K R I V Q R I K D F L R	7.1	3033.7	Hélice- α	2.638	Si	(129)
Péptido híbrido Cecropina - LL-37	K W K L F K K I F K R I V Q R I K D F L R	8	2791.5	Hélice- α	1.603	Si	(129)
LL37-1	G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D F L R	10	2853.5	Hélice- α	3.120	Si	Este estudio
LL37-2	F R K S K E K I G K E F K R I V Q R I K D F L R	7	3050.6	Hélice- α	2.108	Si	Este estudio
LL37-3	K R F R I R R K S A K K I G K R A K R I	13	2497.1	Espiral Alazar	3.557	Si	Este estudio
LL37-4	L L G D F F R K S K E K I G K E F K R I	4	2439.9	Hélice- α	2.108	Si	Este estudio

**Predicción para cada péptido la posible actividad anti-biopelícula *in silico*, empleando el modelo basado en SVM / Weka de la base de datos “dPABBs” <http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibiofilm/index.php>

Figura 8: Proyecciones axiales de rueda helicoidal por Modelos Schiffer–Edmundson para los péptidos diseñados. a) LL37-1, b) LL37-2, c) LL37-3, d) LL37-4.



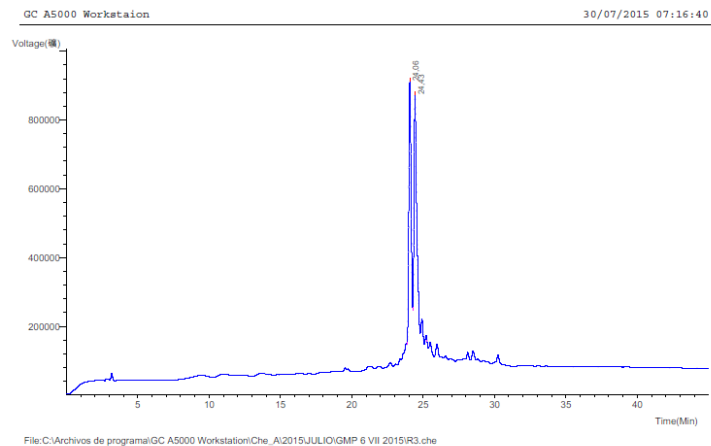
Los residuos hidrofílicos son representados por círculos, residuos hidrofóbicos por diamantes, residuos con carga negativa como triángulos, y residuos con carga positiva como pentágonos. La hidrofobicidad es un código de color donde el residuo más hidrofóbico es de color verde, y la cantidad de verde está disminuyendo proporcionalmente a la reducción en la hidrofobicidad. Cuando la hidrofobicidad es igual a cero, es representado por el color amarillo. Residuos hidrofílicos se codifican de color rojo. Los residuos potencialmente cargados son de color azul claro.

4.2 Caracterización de los péptidos sintetizados

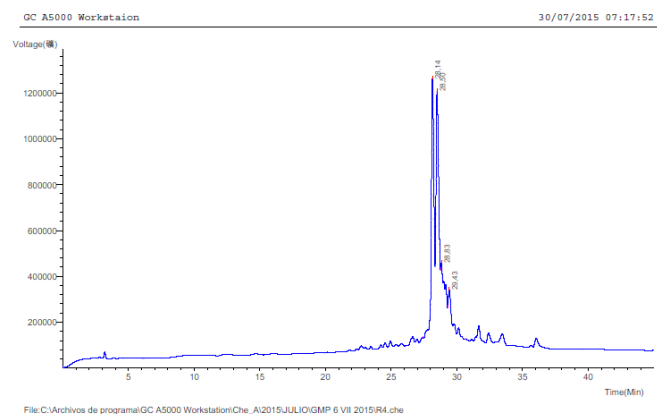
Para confirmar el grado de pureza de la síntesis química de los cuatro péptidos LL37-1, LL37-2, LL37-3, LL37-4, se realizó cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) analítica. En la Figura 9, se observa para cada uno de los péptidos, picos principales acompañados de otros picos que pueden corresponder a análogos del péptido relacionado con el proceso de síntesis o podrían ser grupos bloqueantes liberados en el último paso de la síntesis, al soltar el péptido de la resina, para eliminar estas sustancias contaminantes y obtener específicamente el péptido deseado se optó por la utilización de columnas Sepak C-18 (Supelco, Sigma-Aldrich) y se sometió a cromatografía semi-preparativa RP-HPLC. Todas las fracciones fueron verificadas descartando aquellas concentraciones que separaban picos no deseados como se evidencia en la Figura 10.

Figura 9: Cromatogramas analíticos de calidad de síntesis por HPLC antes de la purificación

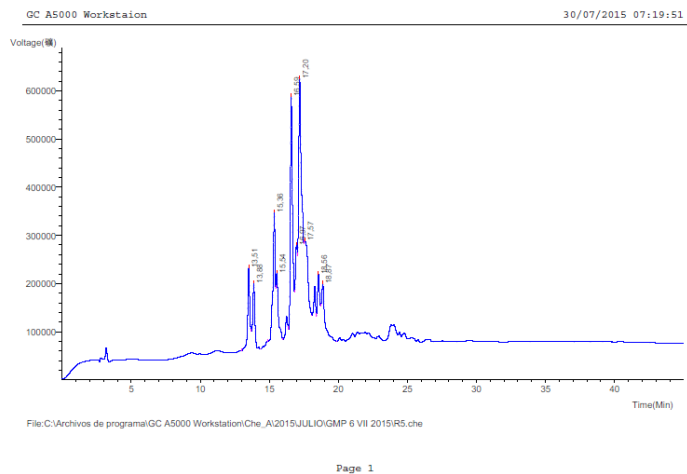
a) LL37-1



b) LL37-2

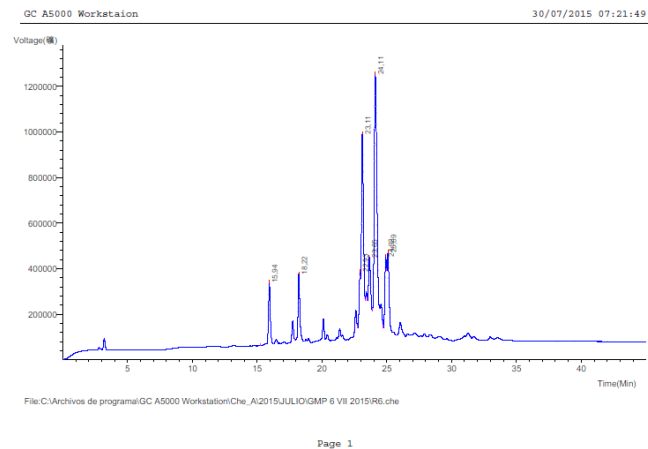


c) LL37-3



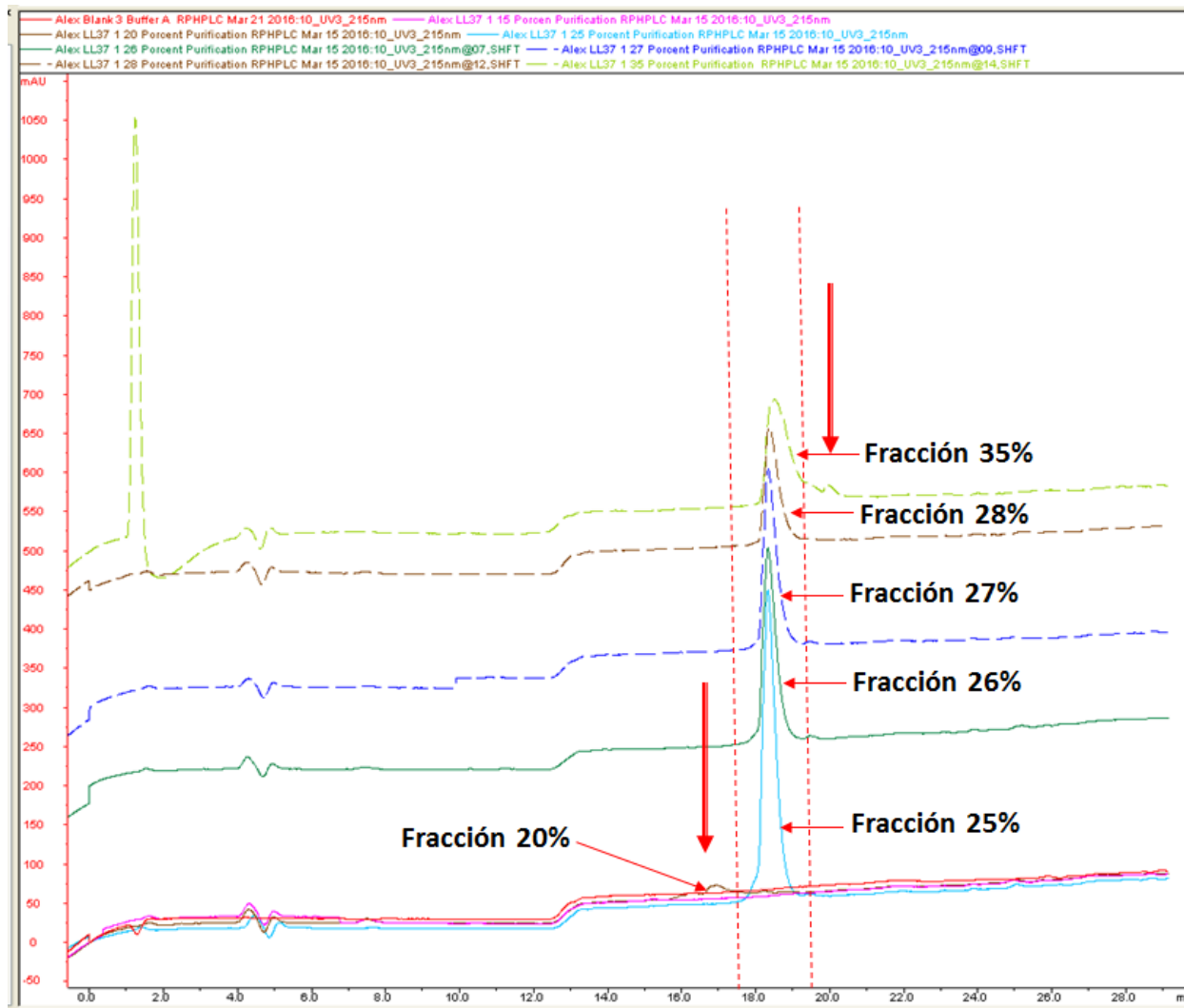
La

d) LL37-4



La Figura 9, muestra la cromatografía por RP-HPLC de los crudos de los cuatro péptidos a) LL37-1, b) LL37-2, c) LL37-3, d) LL37-4. Luego de la síntesis química, se evidencia la presencia de picos presentes en cada muestra lo cual requiere un proceso de purificación para la obtención de un único pico correspondiente a cada péptido deseado.

Figura 10: Purificación de los péptidos por cromatografía semi-preparativa por columnas Sepak C-18

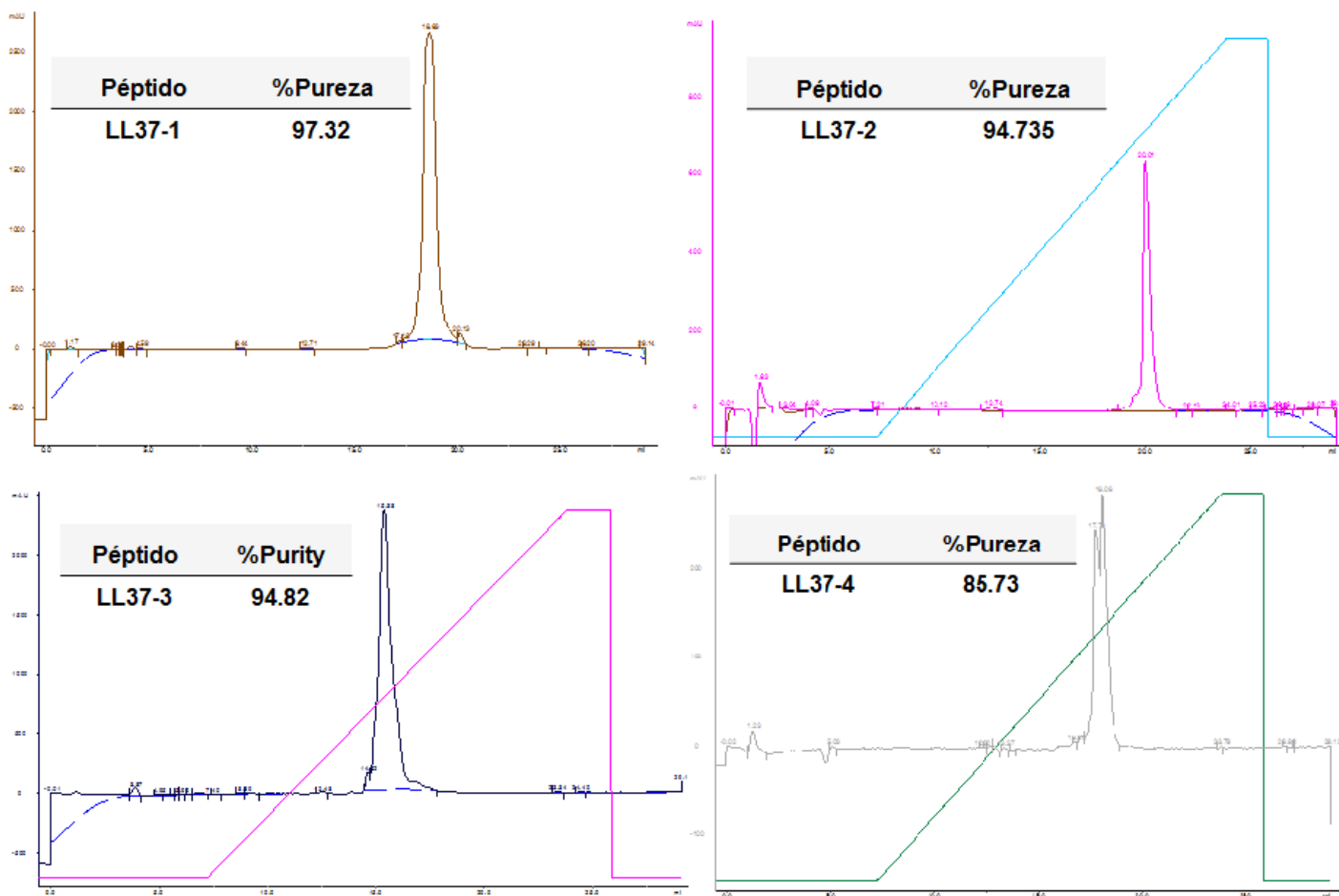


La Figura 10 muestra el proceso de purificación del péptido LL37-1 luego del empleo de las columnas Sepak C-18, se evidencian diferentes fracciones recogidas y analizadas por HPLC donde se observa la discriminación de picos no deseados y la obtención de un único pico en la fracción de 25%; es importante mencionar, que cada fracción es tomada en tubos independientes permitiendo la separación y la obtención de un único pico con la intensidad más alta.

Luego de haber pasado el total de los crudos de los 4 péptidos a través de las columnas Sepak C-18 se verificó nuevamente por RP-HPLC la presencia de un

único pico presente, como se muestra en la Figura 11, garantizando la eliminación de picos no deseados.

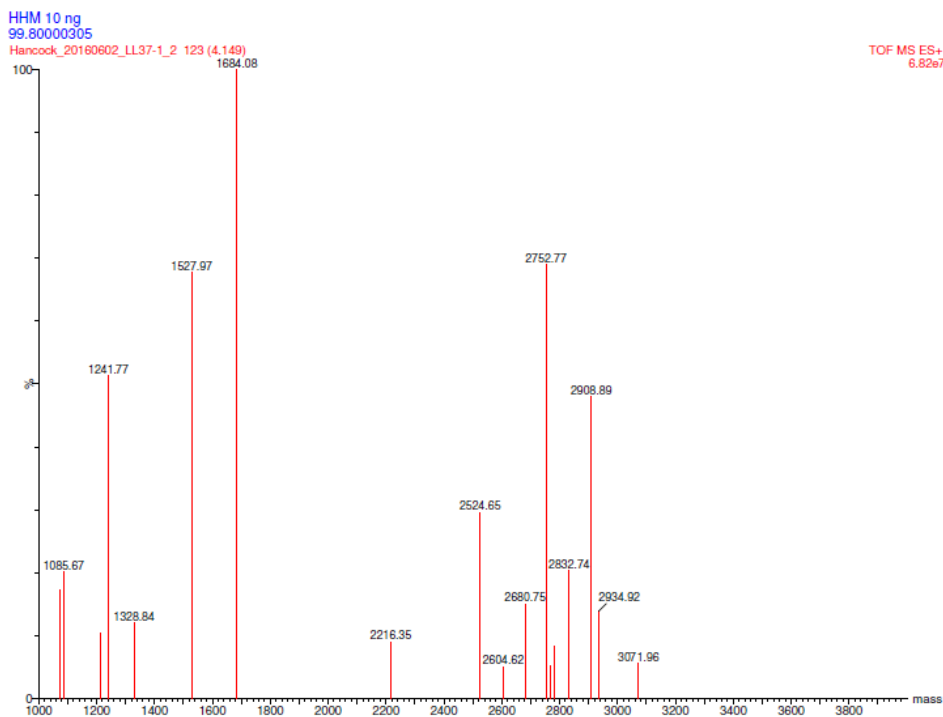
Figura 11: Cromatogramas de los cuatro péptidos después de la purificación por columnas Sepak-C18



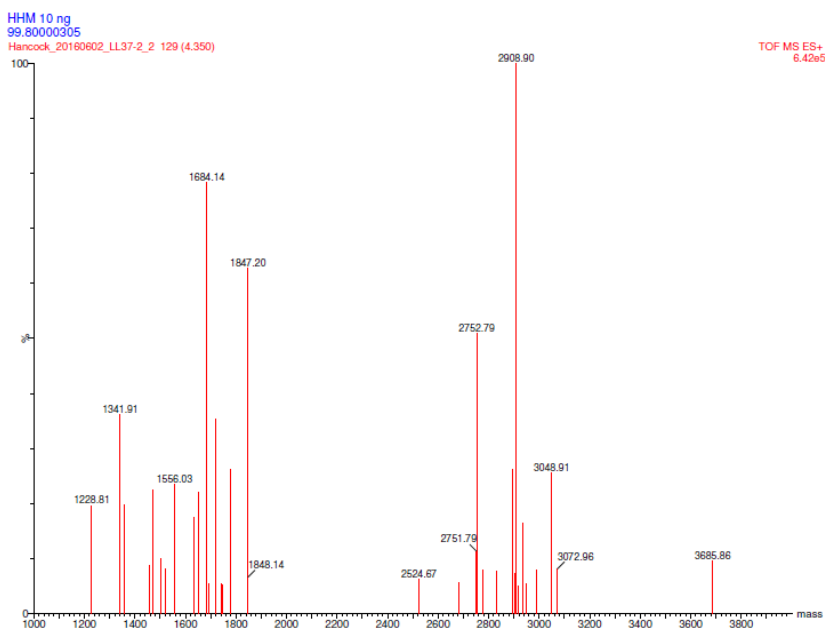
Además los cuatro péptidos se caracterizaron por espectrometría de masas de ionización por láser - desorción por láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI - TOF MS) con el fin de conocer el peso molecular de cada péptido.

Figura 12: Espectros de masas de los 4 péptidos crudos antes de la purificación por columnas Sepak-C18

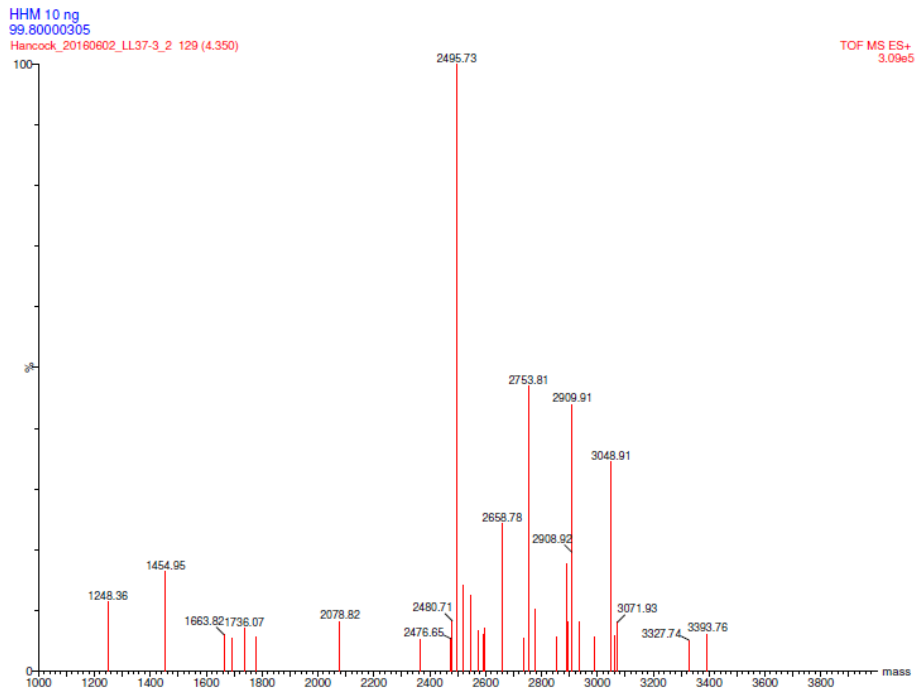
a) LL37-1



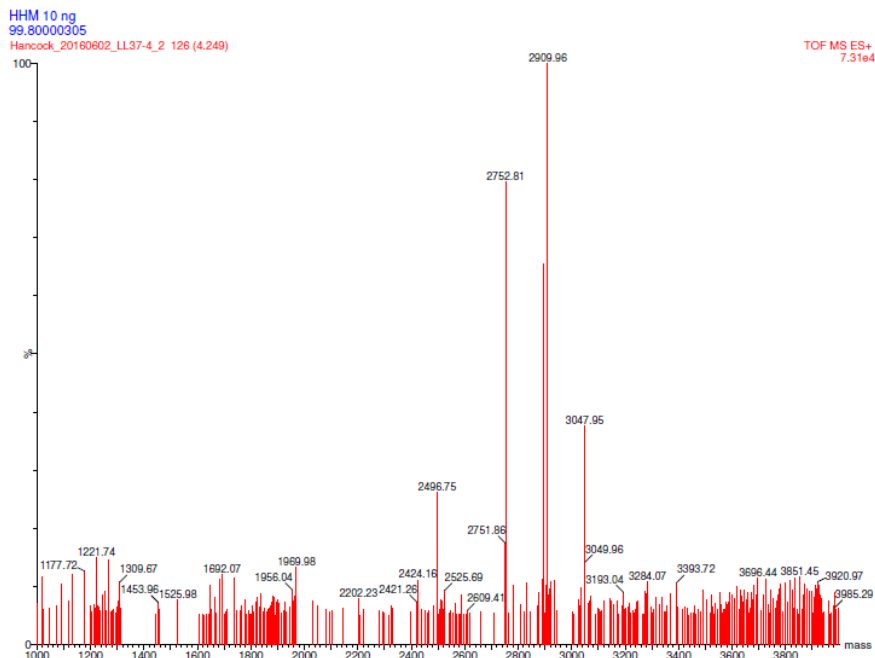
b) LL37-2



c) LL37-3



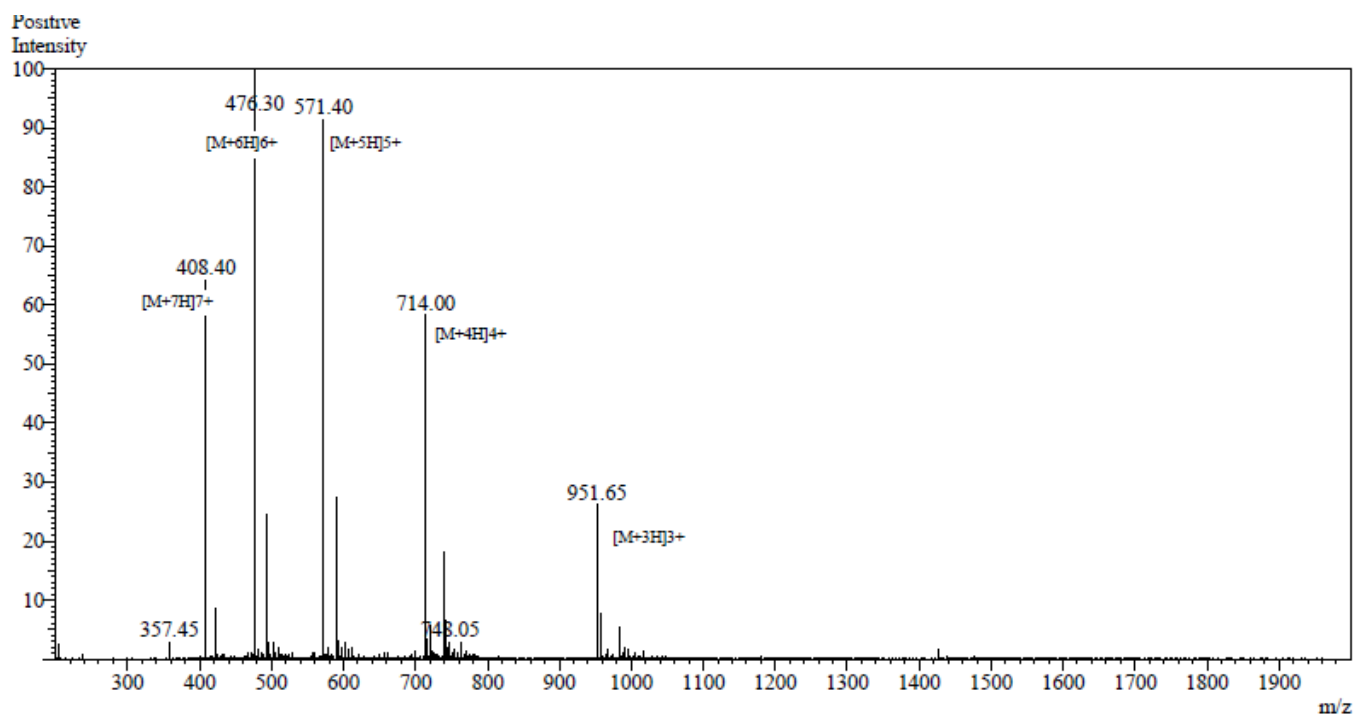
d) LL37-4



En la figura 12 se observa los espectros de masas de los péptidos crudos luego de finalizar la síntesis química, se observa el pico con el peso molecular esperado posiblemente unido a iones, además se observa otros picos que pueden corresponder a análogos del péptido relacionado con el proceso de síntesis o podrían ser grupos bloqueantes liberados en el último paso de la síntesis, al soltar el péptido de la resina, lo cual justificó la necesidad de realizar la purificación.

Figura 13: Análisis de la espectrometría de masas después de la purificación por columnas Sepak C-18 de los péptidos LL37-1 y LL37-2

a) LL37-1



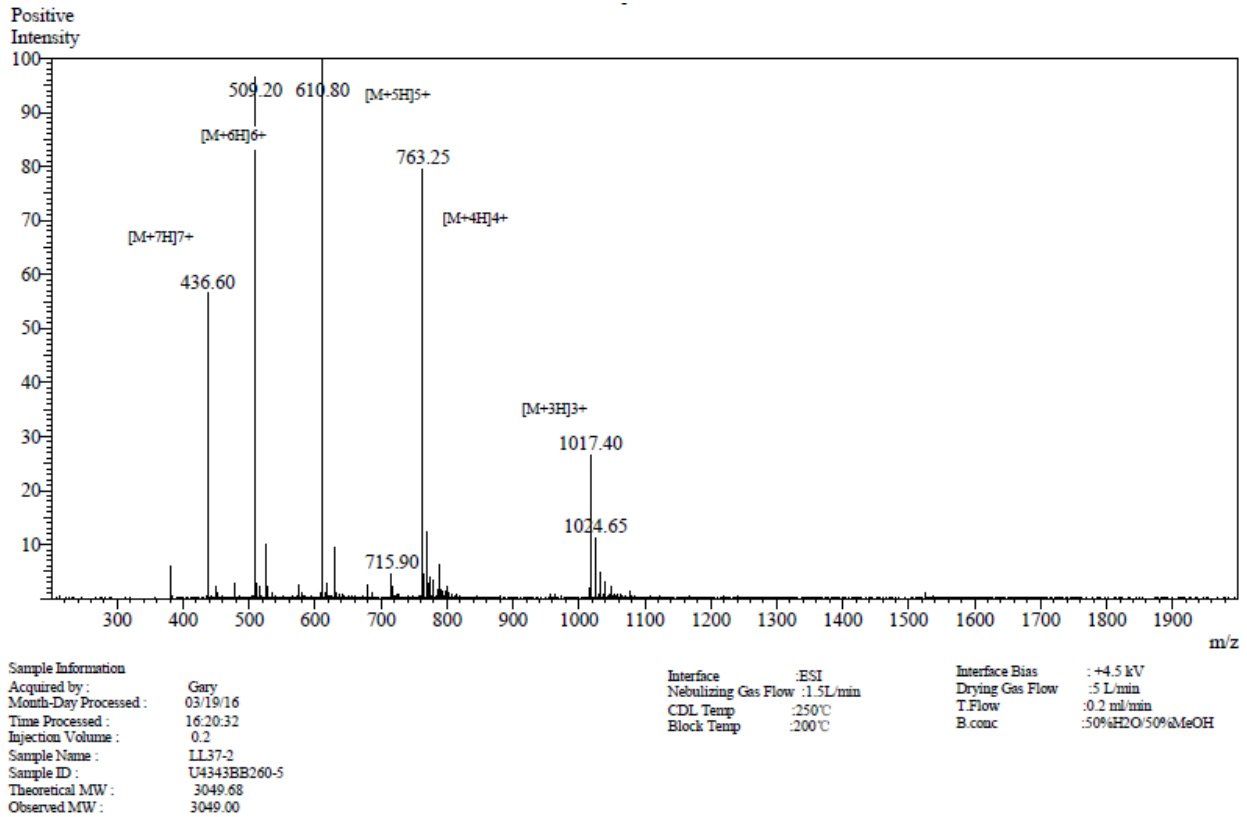
Sample Information

Acquired by : Gary
 Month-Day Processed : 03/11/16
 Time Processed : 14:07:15
 Injection Volume : 0.2
 Sample Name : LL37-1
 Sample ID : U4343BB260-3
 Theoretical MW : 2852.49
 Observed MW : 2851.80

Interface : ESI
 Nebulizing Gas Flow : 1.5L/min
 CDL Temp : 250°C
 Block Temp : 200°C

Interface Bias : +4.5 kV
 Drying Gas Flow : 5 L/min
 T.Flow : 0.2 ml/min
 B.conc : 50%H₂O/50%MeOH

b) LL37-2



La Figura 13 muestra el análisis de los péptidos LL37-1 y LL37-2 después de la purificación por columnas de Sepak C-18. El análisis de los espectros de masas se realizó en un Waters/Micromass LCT por ionización por electroespray (ESI-MS). Se observa los picos de la serie de Taylor para los 2 péptidos donde se aprecia que corresponden al peso molecular esperado.

En el péptido LL37-1 por ejemplo el pico de 571,4 corresponde al pico $[M+5H]^{5+}$ $571,4 \times 5 = 2857 - 5 = 2852$ el cual corresponde al peso molecular esperado. El pico 714,00 corresponde a $714,00 \times 4 - 4$, el resultado sigue siendo 2852 y así sucesivamente para toda la serie.

De igual forma, para el péptido LL37-2, se muestra la serie de Taylor, la cual confirma el análisis esperado, por ejemplo uno de los picos fue $(1017,4 \times 3) - 3 = 3049$ el cual corresponde al peso molecular esperado. El análisis de los otros 2 péptidos (LL37-3 y LL37-4) también dieron el resultado esperado (datos no mostrados).

4.3 Comparación estructura predicha con dicroísmo circular

La determinación de estructura por dicroísmo circular (DC), se utilizó como una técnica rápida para evaluar el perfil de estructura secundaria de los péptidos sintetizados. Los espectros de dicroísmo circular de los péptidos se obtienen generalmente en las regiones cercanas al ultravioleta (250 a 350 nm) y lejanas (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la molécula. Los péptidos sintetizados se disolvieron en TFE al 30% para simular un entorno parecido al fisiológico donde el péptido interactúa con la membrana fosfolípida, los resultados se observan en la Figura 14.

Al comparar los resultados de predicción de estructura secundaria que se empleó como criterio para la síntesis de las secuencias peptídicas por el servidor PSSpred, con los resultados arrojados por el dicroísmo circular, los resultados fueron concordantes debido a que como se observa en la Figura 13, los espectros para los péptidos LL37-1, LL37-2 y LL37-4 presentan características marcadas de estructura preferencial α -helicoidal. Por ejemplo, los espectros de los péptidos LL37-1, LL37-2 y LL37-4 se aprecia el máximo de 193 nm (transición π - π^* positiva, con Θ 190869) y los mínimos de 208 nm (transición π - π^* negativa con Θ -155805) y 222 nm (transición n - π^* con Θ -109927) características de una estructura con tendencia helicoidal. A diferencia del espectro obtenido para el péptido LL37-3 donde se aprecia un máximo con baja elipticidad y un mínimo en 222 nm, con una elipticidad cercana a cero, lo cual indica una estructura poco definida, en este espectro no se podría asegurar que este péptido (LL37-3) tenga una estructura definida α -helicoidal, sino más bien se asemeja a una estructura de láminas- β . Según los resultados de predicción *in silico* de estructura secundaria arrojados por

el servidor PSSpred, 3 de los péptidos presentaron estructura secundaria tipo α -helicoidal con un porcentaje superior al 80% esto es para los péptidos (LL37-1, LL37-2, y LL37-4), mientras que el péptido LL37-3 mostró un porcentaje de α -helicidad inferior, del 65% con una tendencia elevada de presentar una estructura de espiral al azar (Tabla 5).

Varios estudios han demostrado que la estructura α -helicoidal no sólo favorece la actividad antimicrobiana sino también la reducción en la formación de biopelícula (108,149), como en el estudio realizado por Yibing Huang y colaboradores (111) quienes muestran una excelente correlación de la estructura helicoidal de péptidos sintetizados de *novo* con características como la hidrofobicidad resaltando su papel crítico en la actividad antimicrobiana. En este sentido, los péptidos aquí mostrados, se diseñaron en función del grado helicoidal/ hidrofobicidad de las 4 secuencias peptídicas para presentar un desempeño óptimo en la inhibición de biopelículas bacterianas.

Figura 14: Espectros de dicroísmo circular para los péptidos en estudio

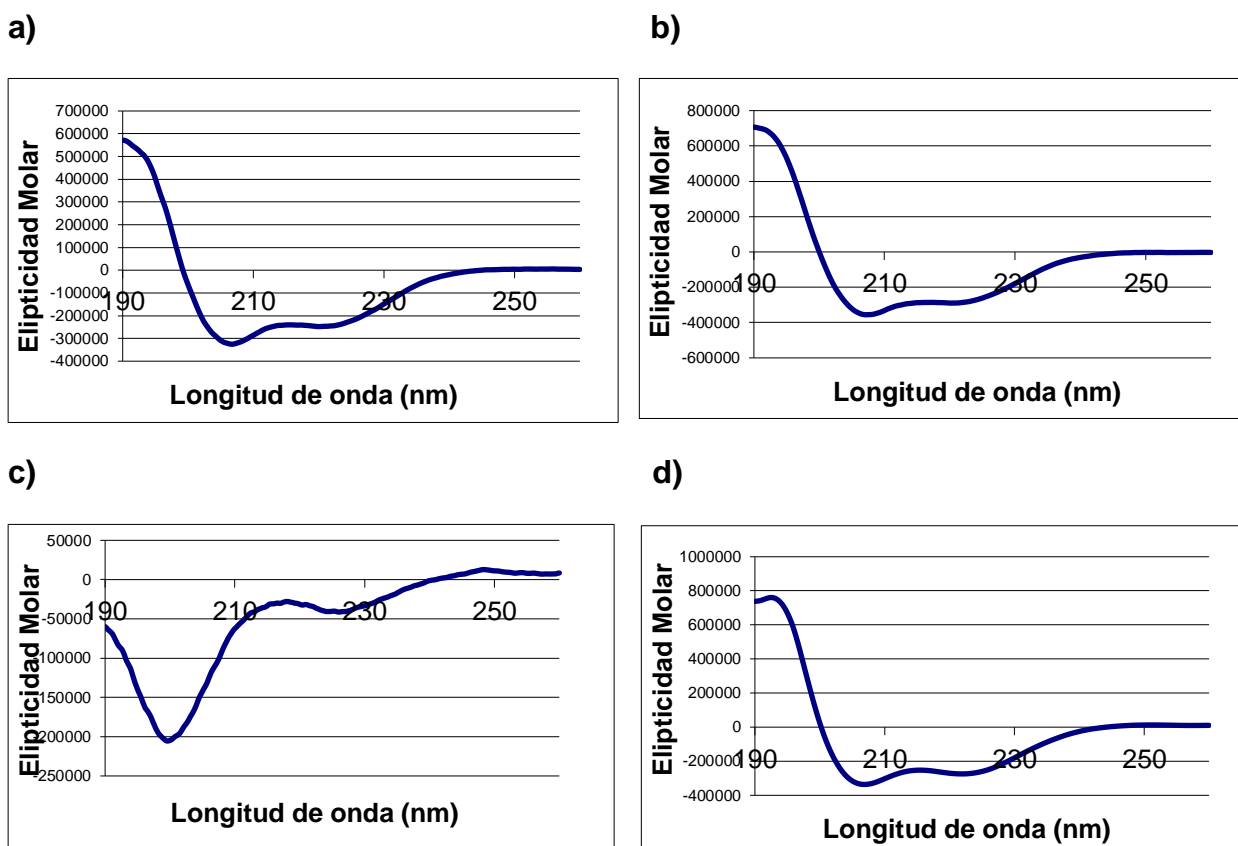


Figura 14: Perfiles de estructura secundaria para todos los péptidos híbridos de LL-37 por dicroísmo circular (CD). a) LL37-1, b) LL37-2, c) LL37-3, d) LL37-4.

4.4 Caracterización de aislamientos clínicos

Se analizaron 44 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp recuperados de hospitales de segundo y tercer nivel de la ciudad de Bogotá, Colombia los cuales fueron caracterizados genotípica y fenotípicamente con el fin de corroborar su capacidad de formación de biopelícula, aquellos aislamientos que resultaron tener las características propias de la formación de biopelícula tanto genotípicas (presencia de genes operón *IcaRADBC*) como fenotípicas (formación *in vitro* de biopelícula) fueron seleccionados para realizar los ensayos de actividad de los

péptidos análogos a la catelicidina humana LL-37 previamente sintetizados. La Tabla 6, muestra el total de aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp evaluados, presencia y/o ausencia de los genes operón *IcaRADBC*, su procedencia y su perfil de resistencia para cada aislamiento.

4.5 Confirmación de especie y presencia de operón *IcaRADBC* de *Staphylococcus* spp

Se emplearon iniciadores específicos para la amplificación de parte del gen *UreD*, el cual codifica para una proteína accesoria con actividad ureasa proteína específica de *S.epidermidis* con el fin de confirmar molecularmente la especie *S.epidermidis*, por medio de PCR convencional. Se tuvo un interés particular en esta especie dada su alta implicación en formación de biopelícula en dispositivos médicos (29) De igual forma, por medio de PCR multiplex se realizó la identificación de los genes que componen el operón *IcaRADBC* Figuras 15 y 16 respectivamente.

Figura 15: Detección del gen *UreD* en los aislamientos clínicos de *Staphylococcus*

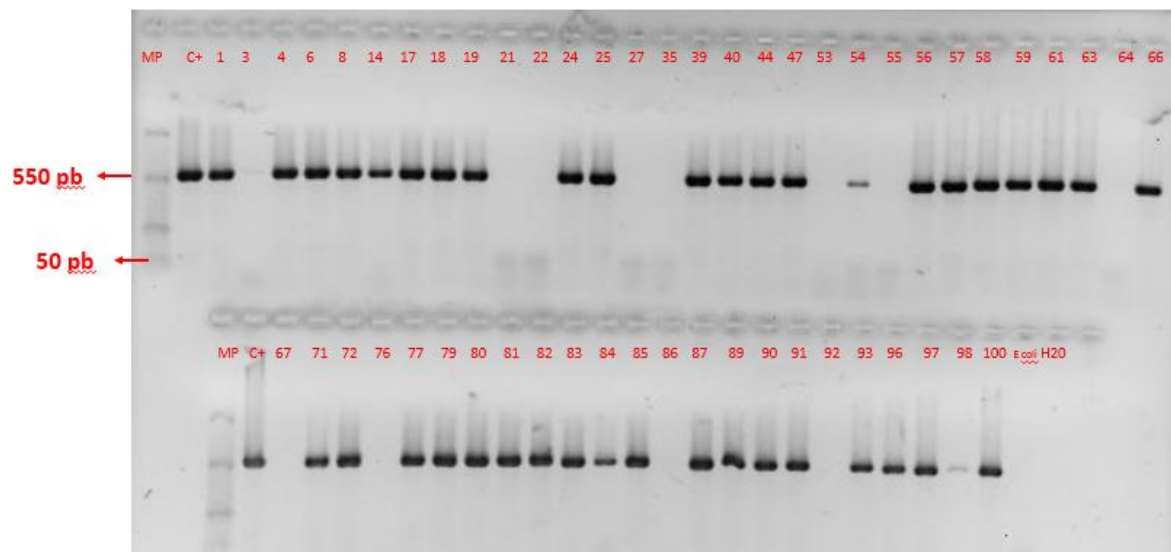


Figura 15: Detección del gen *UreD* por PCR convencional. Carriles: 1, Marcador de peso molecular de 100 pb, 2 control positivo (*S.epidermidis* ATCC 35984), Ultimo carril control negativo (Agua), 3-32 aislamientos de *Staphylococcus spp* (parte superior de gel), 3-25 aislamientos de *Staphylococcus spp* (parte inferior), el fragmento de amplificación esperado tiene un tamaño de 550 pb.

Figura 16: Detección de la presencia del operón *IcaRADBC* en los aislamientos clínicos de *Staphylococcus sp*

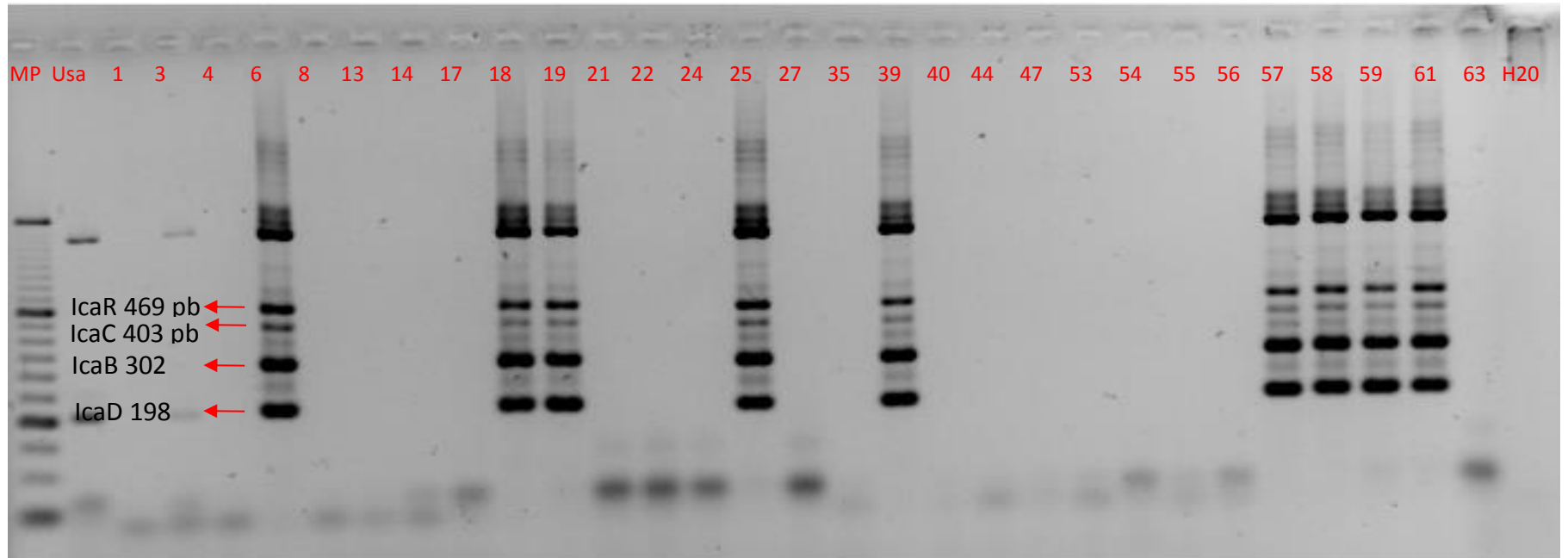


Figura 16: Detección del operón *IcaRADBC* por PCR convencional tipo multiplex. Carriles: 1, Marcador de peso molecular de 100 pb, 2 control positivo (*S.aureus* USA300), Ultimo carril control negativo (Agua), 3-31 aislamientos de *Staphylococcus spp*

Continuación Figura 16: Detección de la presencia del operón *IcaRADBC* en los aislamientos clínicos de *Staphylococcus spp*

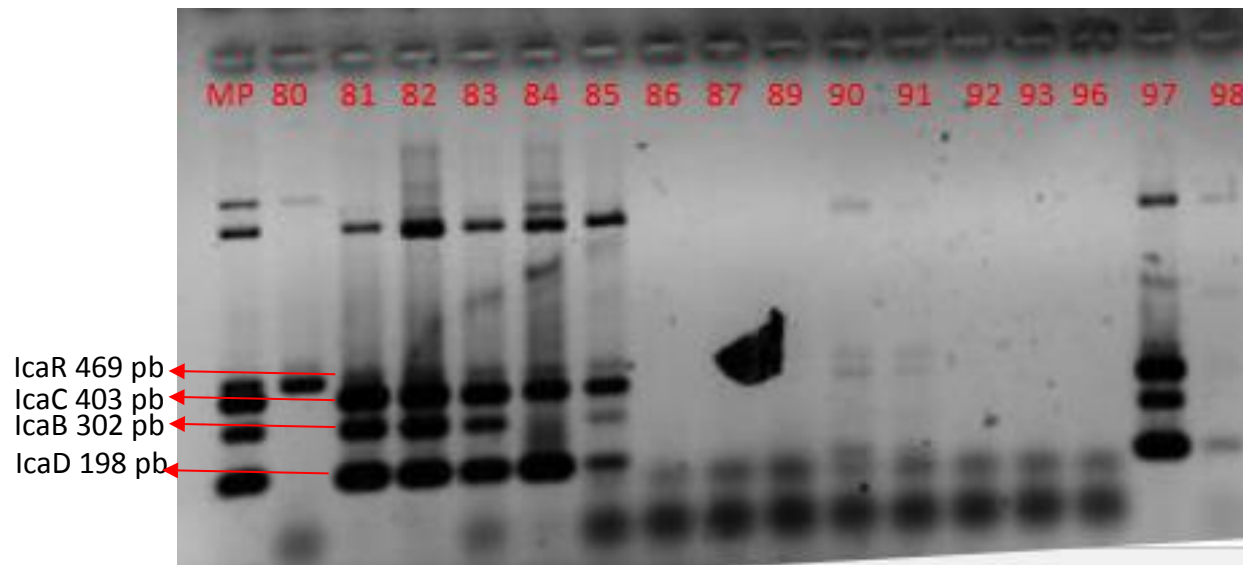


Figura 16: Detección del operón *icaRADBC* por PCR convencional tipo multiplex. Carriles: 1, Marcador de peso molecular (control positivo *S.aureus* USA300), 80-98 aislamientos de *Staphylococcus*.

Tabla 6: Aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp, presencia operón *lcaRADBC* y su perfil de resistencia

Aislamientos clínicos <i>Staphylococcus</i> spp	Presencia Operón <i>lcaRADBC</i>	Procedencia	Perfil de Resistencia**
35984	Positivo	N/A	N/A
12228	Negativo	N/A	N/A
1	Negativo	Hemocultivo	AMP, CIP
4	Negativo	Hemocultivo	N/A
6	Positivo	Hemocultivo	AMP, CLIN, ERY, GEN
8	Negativo	Hemocultivo	N/A
14	Negativo	Catéter venoso central	Sensible a todo
17	Negativo	Hemocultivo	AMO, CTX, CLIN, ERY, GEN
18	Positivo	Hemocultivo	TET
19	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT, CLIN
24	Negativo	Hemocultivo	AMP, ERY
25	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, ERY, CLIN
39	Positivo	Catéter	OXA, CIP, ERY, SXT, CLIN,
40	Negativo	Hemocultivo	N/A
42	Negativo	Hemocultivo	AMO, CLIN, ERY, GEN
43	Negativo	N/A	N/A
45	Negativo	Hemocultivo	OXA, ERY, CLIN
47	Negativo	Hemocultivo	N/A
54	Negativo	Catéter	CLIN, ERY, GEN
56	Negativo	Secreción Oro traqueal	N/A
57	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT CLIN,
58	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY SXT, CLIN,
59	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT, CLIN
60	Negativo	Hemocultivo	OXA, ERY, CLIN
61	Positivo	Hemocultivo	OXA, ERY, CLIN
62	Negativo	Hemocultivo	OXA, ERY, CLIN
63	Negativo	Catéter	CLIN, ERY, GEN
66	Negativo	Hemocultivo	ERY, GEN
69	N/A	Hemocultivo	CTX, CLIN, ERY, GEN
71	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, TET, CLIN
72	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, ERY, CLIN
77	Negativo	Hemocultivo	ERY, GEN
79	Negativo	Hemocultivo	CLIN, ERY, GEN
81	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, CLIN,
82	Positivo	Hemocultivo	ERY
83	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, ERY, RIF, SXT, CLIN
84	Negativo	Hemocultivo	OXA, GEN, ERY, RIF, SXT, CLIN
85	Positivo	Hemocultivo	ERY
87	Negativo	Hemocultivo	CIP, CLIN

Tabla 6: Aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp y su perfil de resistencia (Continuación)

88	N/A	Hemocultivo	CLIN, ERY, GEN
89	Negativo	Hemocultivo	CLIN, ERY, GEN
90	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT, CLIN
91	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT, CLIN
97	Positivo	Hemocultivo	OXA, GEN, ERY, RIF, CLIN
99	N/A	Hemocultivo	ERY, TET, CLIN
175	Negativo	Hemocultivo	N/A

**AMP: ampicilina, ERY: Eritromicina, GEN: Gentamicina, CTX: cefotaxime, CIP: Ciprofloxacina, TET: Tetraciclina, SXT: Trimethoprim – Sulfametoxazol, TMP: Trimetropim, GEN: Gentamicina. SMX: Sulfametoxazol, CLIN: Clindamicina, OXA: Oxacilina

Como se observa en la Tabla 6, de los 44 aislamientos de *Staphylococcus* spp ensayados 18/44 (40,9%) presentaron los genes operón *IcaRADBC*, 38/44 (86%) provienen de hemocultivos, 1/44 (2,2%) de catéter venoso central, 3/44 (6,8%) provienen de catéter sin especificar y 1/44 (2,2%) de secreción oro-traqueal. Con respecto al perfil de resistencia, la resistencia a OXA, GEN, CIP, ERY, SXT, CLIN se presentó en 6/44 (13,6%) siendo el perfil de mayor frecuencia.

El operón *IcaRADBC* es el elemento genético más estudiado en el género *Staphylococcus* implicado en la formación de biopelícula, ya que facilita la formación de (PIA), sintetizada por enzimas codificadas por el operón *IcaRADBC*. Varios estudios han mostrado el papel que cumple este operón y su correlación con la formación de biopelícula como en el estudio desarrollado por Maria Angelas Arduin y colaboradores (44) donde investigaron la prevalencia de factores relacionados con la biopelícula como (PIA, Bhp, Aap, Embp) en *Staphylococcus epidermidis* de animales. En este estudio, 263 aislamientos de *S. epidermidis* de origen diverso (animal, agricultores, pacientes y personal de laboratorio) fueron estudiados para la presencia del operón *IcaRADBC*. De todos los aislamientos, el 28,5% (n = 75) fueron positivos para *IcaRADBC*, incluyendo 16,5% de origen animal, 29,1% aislados de agricultores y 44,6% de aislamientos asociados a hospitales (incluidos pacientes y aislamientos de personal de laboratorio). Según sus resultados no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la

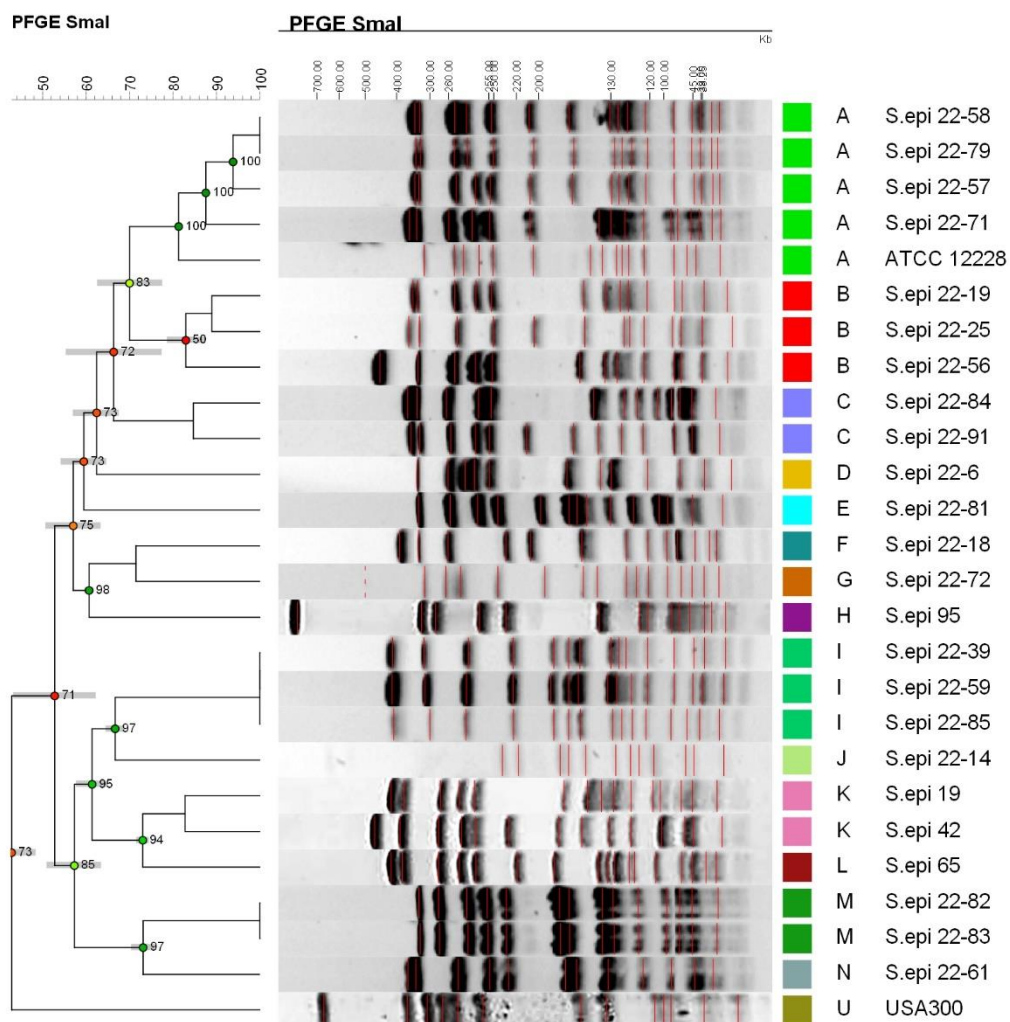
presencia de uno o más genes del operón *IcaRADBC* y el nivel de formación de biopelícula. Lo anterior significa que existen aislamientos clínicos que podrían formar biopelícula de forma (*PIA-independiente*) este es un hallazgo que ha sido reportado por otros investigadores como Renato Silva Filho y colaboradores (47), resultados similares fueron obtenidos por Bethany Dice y colaboradores (150). La proteína asociada a la acumulación (AAP) (151), la proteína homóloga Bap (Bhp) (152) y la proteína de unión a la matriz extracelular (Embp) (153) han sido descritas en la formación de estas biopelículas independientes de PIA.

Si bien es cierto existen otros factores genéticos que favorecen la adherencia microbiana como por ejemplo MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), factor A-cumpling de *S. aureus* o el gen *fbe*, que codifica una proteína que une fibrinógeno, el gen *ebp*, que codifica una proteína de unión a fibronectina en *S.epidermidis*. En el presente estudio, únicamente se seleccionaron aquellos aislamientos que fueron positivos para el operón *IcaRADBC* como mecanismo de discriminación genotípico de formación de biopelícula para realizar las pruebas de inhibición con los péptidos diseñados y sintetizados.

4.6 Relación clonal de los aislamientos clínicos

Se observaron las relaciones genéticas de 25 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp; se encontraron 14 pulsotipos diferentes (Figura 15). El 68% de los aislamientos (n=17) se clasificaron en grupos genómicos aislamientos con pulsotipos estrechamente relacionados (<3 bandas de diferencia): A, B, C, I, K y M con 5 (20%), 3 (12%), 2 (8%), 3 (12%), 2 (8%), y 2 (8%) aislamientos, respectivamente. El resto de los aislamientos mostraron perfiles de bandeo aislados 8 (32%) (Figura 16). El perfil de PFGE tipo A fue el más prevalente 20% de los cuales 3/5 (60%) aislamientos fueron operón *IcaRADBC* positivo, los otros 2/5 (40%) aislamientos fueron (*PIA-independientes*). Estos resultados muestran una alta variabilidad genética de los aislamientos de *Staphylococcus* aquí ensayados

Figura 17: Relación clonal de los aislamientos de *Staphylococcus* sp



La Figura 17, muestra el dendograma de la relación genética de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp con respecto al clon USA300.

4.7 Capacidad de formación de biopelícula de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus*

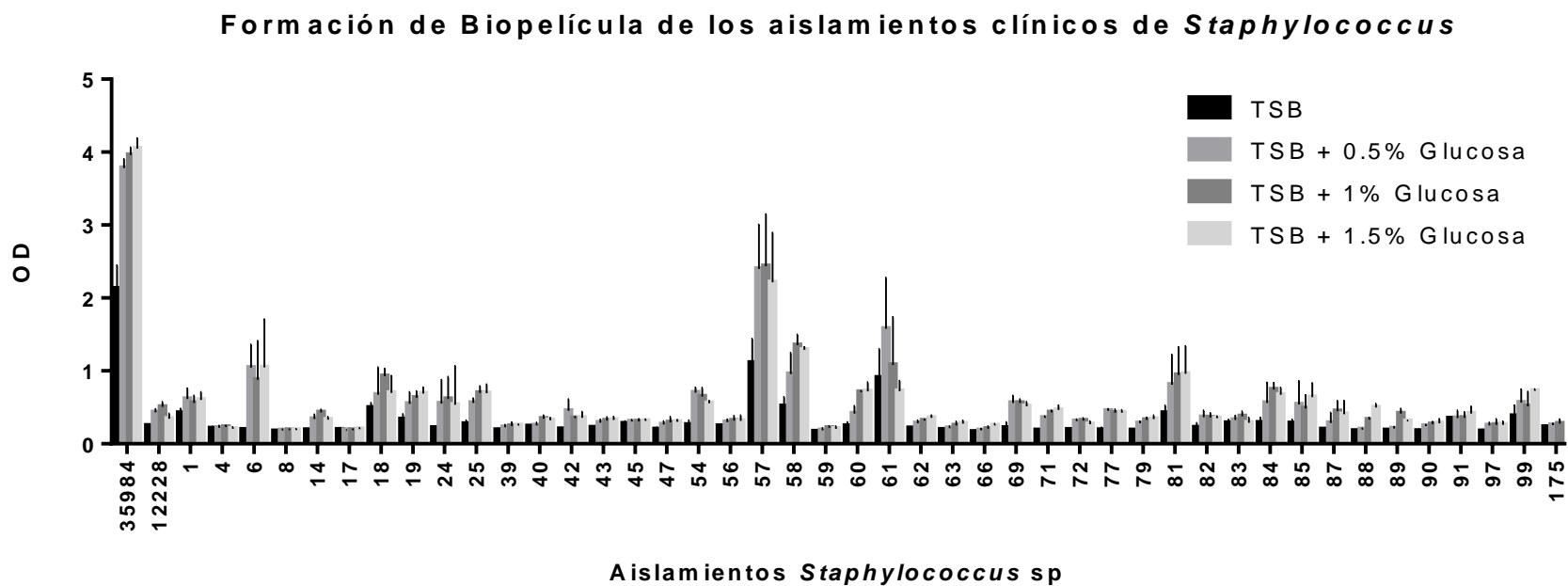
Luego de conocer las características genotípicas (presencia/ausencia del operón *lcaRADBC*) para la formación de biopelícula y perfil de resistencia de cada aislamiento, se confirmó la formación de biopelícula fenotípicamente de todos los

aislamientos mediante ensayos de superficie sólida, abiótica Cristal Violeta (CV). En este ensayo se probaron diferentes condiciones de crecimiento con el fin de determinar la mejor estrategia para favorecer la formación de biopelícula como por ejemplo variaciones en las concentraciones de glucosa, ya que existen estudios que soportan que el incremento de este elemento beneficia la formación de biopelícula (154). Según los resultados de la Figura 18, 16/44 (36,3%) aislamientos, presentaron una formación de biopelícula con una densidad óptica (OD) $>1.0 \pm 0.5$, la cual fue tomada como punto de corte de formación positiva de biopelícula. Aislamientos con valores inferiores de $0,3 \pm 0.5$ OD fueron tomados como no formadores esto es 28/44 (63,6%). Con respecto a las 3 concentraciones de glucosa ensayadas (0,5%, 1% y 1,5%), se observó un ligero incremento en la OD a la concentración de 1%, pero en términos generales no se observó diferencia estadísticamente significativa. Dado que más del 50% de los aislamientos presentaron una baja formación de biopelícula Figura 18, se ensayaron otras condiciones con el fin de verificar si esto se debía a condiciones desfavorables de crecimiento que impedían el buen desarrollo de la biopelícula. Sin embargo es importante mencionar que la mayoría de los aislamientos no presentaron los genes asociados al operón *IcaRADBC*, y dada las características intrínsecas de operón *IcaRADBC*-negativo de los aislamientos, podría explicar la baja densidad óptica en la formación de biopelícula.

Por lo tanto se tomaron ocho aislamientos que presentaron característicamente un ($>0,3$ OD): (*S.epidermidis*: 4, 8, 17, 39, 59, 66, 422 y 90) empleando las siguientes variaciones como se muestra en la Figura 19:

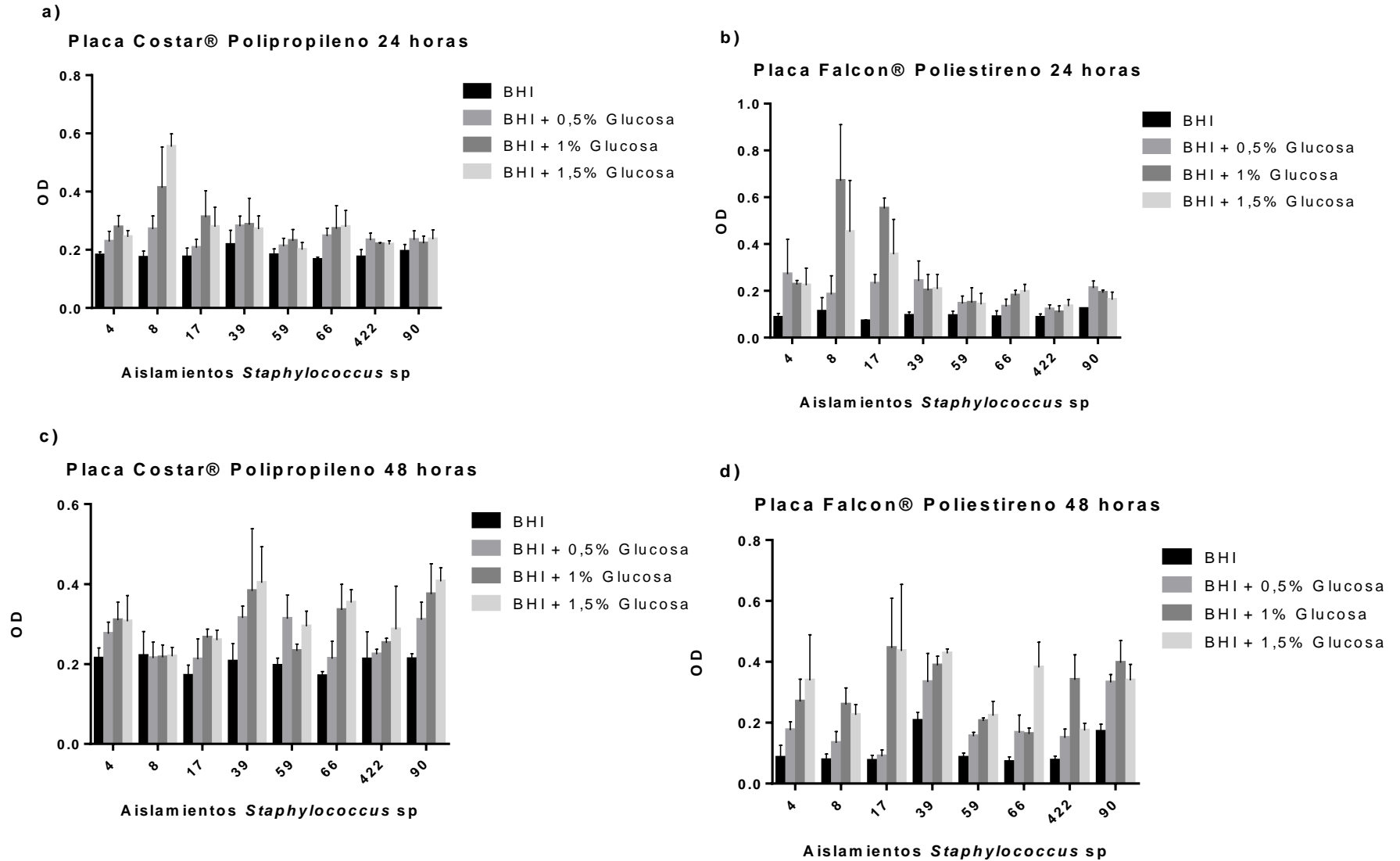
- Utilización de un medio de cultivo más nutritivo (BHI) (Brain Heart Infusion)
- Aumento en el tiempo de formación de biopelícula a 48 horas
- Utilización de diferentes placas (Material de adherencia) polipropileno y poliestireno marcas Costar® y Falcon Eagle® respectivamente.

Figura 18: Caracterización fenotípica de la formación de biopelícula de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp



Los experimentos fueron realizados por triplicado, para el que se muestran las desviaciones estándar de la formación de biopelícula de todos aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. La formación de biopelícula se evaluó midiendo el OD595 de los pozos después de la tinción con cristal violeta.

Figura 19: Modificaciones en las condiciones de formación de biopelícula en los aislamientos de *Staphylococcus* spp



Los experimentos fueron realizados por triplicado, para el que se muestran las desviaciones estándar \pm SEM de la formación de biopelícula de ocho aislamientos clínicos de *S.epidermidis* (4, 8, 17, 39, 59, 66, 422 y 90) La formación de biopelícula se evaluó midiendo el OD595 de los pozos después de la tinción con cristal violeta.

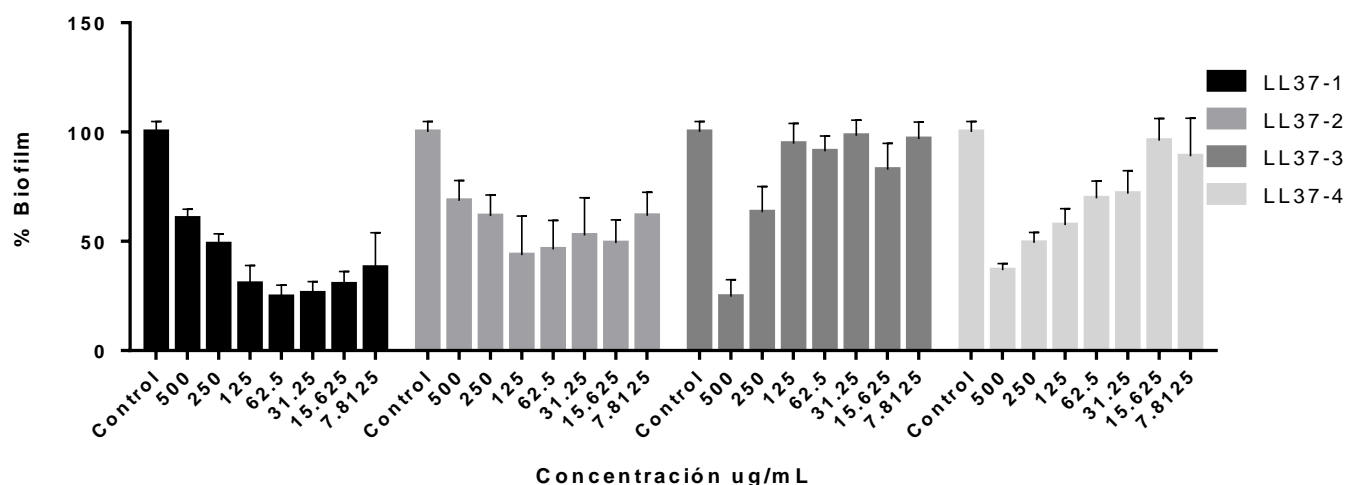
La fijación bacteriana a diferentes superficies abióticas depende de muchos factores, como el tipo de superficie, condiciones ambientales y la composición de los medios de cultivo. Razón por la cual la Figura 19 muestra diferentes condiciones de crecimiento microbiano para 8 aislamientos que presentaron inicialmente una baja formación de biopelícula ($>0,3$ OD) según los resultados, se evidencia un mejor desempeño de las placas de polipropileno en comparación con las placas de poliestireno, ya que se observa un incremento del OD de los 8 aislamientos ensayados tanto a 24 horas como a 48 horas, resultado que es concordante al estudio realizado por Jung-Su Lee y colaboradores (155). Sin embargo, el incremento de la densidad óptica no fue estadísticamente significativa ($p<0.05$) a la densidad óptica obtenida en el ensayo inicial con TSB en la Figura 18, razón por la cual se eligieron las placas de polipropileno Costar®, el medio TSB a 1% de glucosa en un tiempo de 24 horas para los ensayos de inhibición de biopelícula de los péptidos sintetizados.

4.8 Actividad de los péptidos análogos de LL-37 sobre la formación de biopelícula

Se evaluó la actividad anti-biopelícula de los 4 péptidos híbridos mediante un ensayo de tamizaje con el fin de conocer cual presenta la mejor actividad, para ello se empleó un gradiente de concentración entre 500–7.8 µg/mL, según los resultados los péptidos LL37-1 y LL37-2 presentaron inhibición en la formación de biopelícula de ~70% a concentraciones entre 62.5 y 15.625 µg/mL para el péptido LL37-1 y ~50% a concentraciones entre 125 y 15.6 µg/mL para el LL37-2 (Figura 18). Por otro lado, los péptidos LL37-3 y LL37-4 presentaron actividad de inhibición únicamente a 500 µg/mL ya que a concentraciones inferiores no se evidenciaron resultados favorables. Con estos hallazgos, se decidió no continuar ensayando con los péptidos LL37-3 y LL37-4.

Para determinar si el efecto inhibitorio sobre la biopelícula se relacionó con la inhibición general del crecimiento o con un cambio en el crecimiento bacteriano, se midió el crecimiento en medio TSB tratado con un aumento en la concentración de LL-37 bajo condiciones de agitación a 37°C. Estos experimentos subrayaron el efecto inhibitorio específico del péptido LL-37 en biopelículas, dado que no afectó el crecimiento planctónico de *Staphylococcus* spp.

Figura 20: Tamizaje de actividad de los péptidos análogos a LL-37



Los experimentos fueron realizados por triplicado, para el que se muestran las desviaciones estándar \pm SEM del efecto de los péptidos LL37-1, LL37-2, LL37-3, LL37-4 en la inhibición de la formación de biopelícula de ATCC *S.epidermidis* 35984 a concentraciones decrecientes (500 μ g/mL – 7,8125 ug/mL), se evaluó mediante Ensayos Superficiales Solido Estático-Abióticos (ESSA) en placas de 96 pozos y posterior tinción de CV.

A pesar que los cuatro péptidos aquí diseñados presentaron características de anfipaticidad y cargas netas positivas considerablemente altas, exhibieron diferentes niveles de actividad anti-biopelícula; los péptidos LL37-1 y LL37-2, presentaron en términos generales mejor desempeño en comparación con los péptidos LL37-3 y LL37-4, ya que como se observa en la (Figura 20), a una concentración de 125 μ g/mL el péptido LL37-1 inhibió aproximadamente 80% la formación de biopelícula de *Staphylococcus* (ATCC 35984), el péptido LL37-2 mostro un porcentaje de reducción de biopelícula similar. Por otro lado, los péptidos LL37-3 y LL37-4 mostraron un efecto menor en la reducción de la formación de biopelícula, dado que se necesitó una concentración mayor para tener un porcentaje de inhibición de al menos 50%, 250 μ g/mL para el péptido LL37-3 mientras que el péptido LL37-4 a partir de 500 μ g/ mL perdió actividad. Estas variaciones de la actividad pueden deberse a diferencias en el orden en los residuos de las 4 secuencias peptídicas. Los péptidos LL37-1 y 2 presentan en la

posición 17 una Q-Gln, mientras que los péptidos LL37-3 y 4 en la misma posición presentan una A-ALa y una F-Phe respectivamente. Varios estudios han demostrado que el orden específico de los residuos en una secuencia peptídica es crucial para su actividad, como en el estudio realizado por Scott N Dean y colaboradores donde realizaron péptidos sintéticos modificados de la catelicidina de cobra china *Naja atra* (NA-CATH), según sus resultados, sustituciones puntuales en la secuencia parental del péptido (NA-CATH) favorece al mejoramiento de la actividad antimicrobiana pero afecta el desempeño en la actividad anti-biopelícula (156). Resultados similares muestra el trabajo realizado por Cesar de la Fuente y colaboradores donde péptidos sintéticos modificados del péptido nativo 1018 mostraban una actividad anti-biopelícula similar o disminuida frente a las biopelículas de *P.aeruginosa*, pero aumentaban la actividad contra las biopelículas formadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (8). Aun cuando el péptido LL37-3 presenta el mayor grado de carga neta positiva de (+13), lo cual indicaría que la carga del péptido en combinación con el grado de anfipaticidad son características esenciales para el funcionamiento de dichas moléculas peptídicas. Péptidos híbridos con mayor actividad antimicrobiana en comparación con secuencias de péptidos parentales han sido producidos por otros investigadores (157), para conseguir el mejoramiento de la estructura secundaria (26, 27).

4.9 Inhibición de biopelículas en los aislamientos clínicos

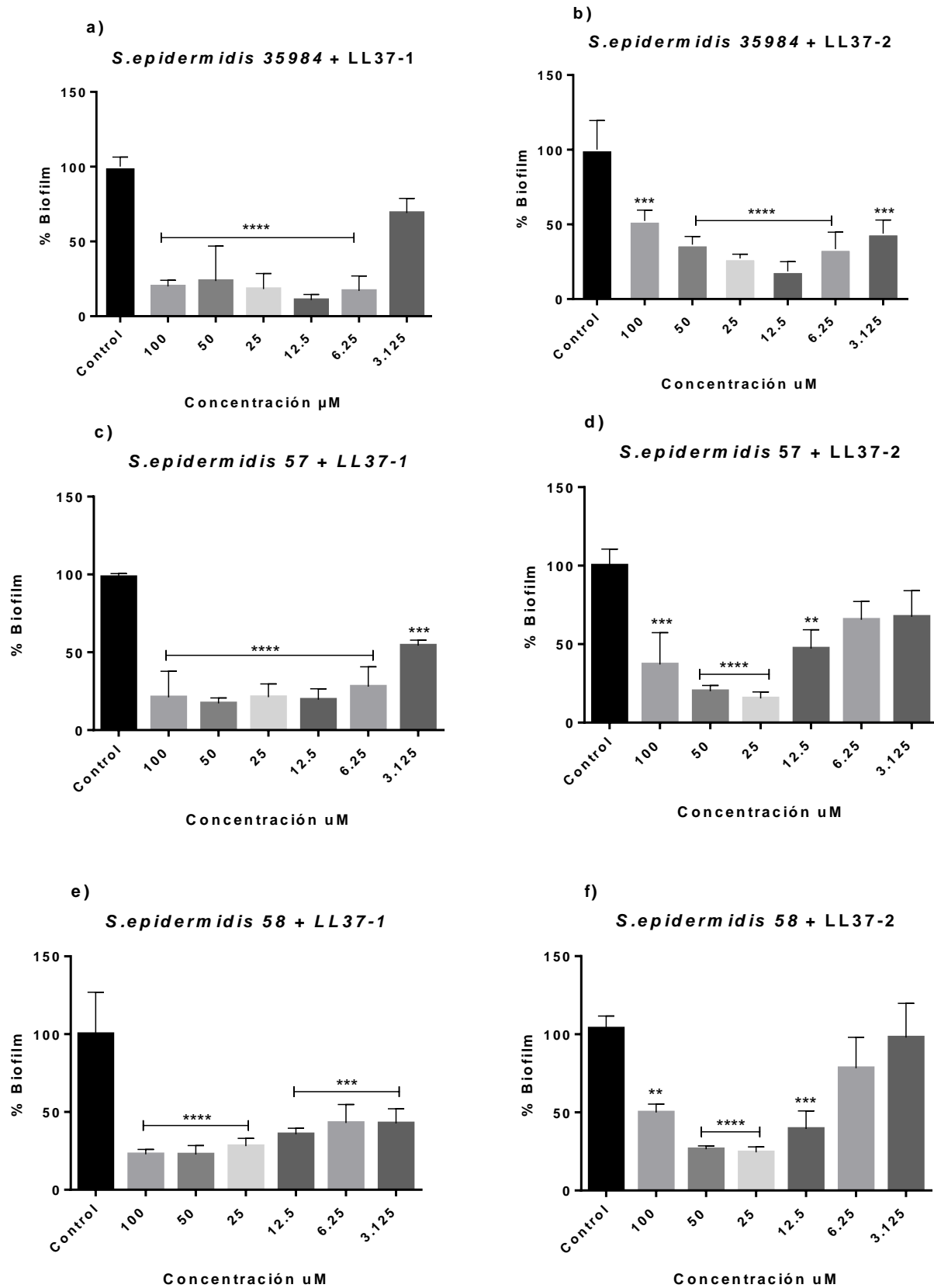
Habiendo seleccionado los péptidos LL37-1 y LL37-2 como los más promisorios en su actividad antibiopelícula, fueron utilizados en los siguientes ensayos empleando los siguientes aislamientos clínicos:

Tabla 7: Aislamientos utilizados para verificar actividad anti-biopelícula de los péptidos LL37-1 y LL37-2

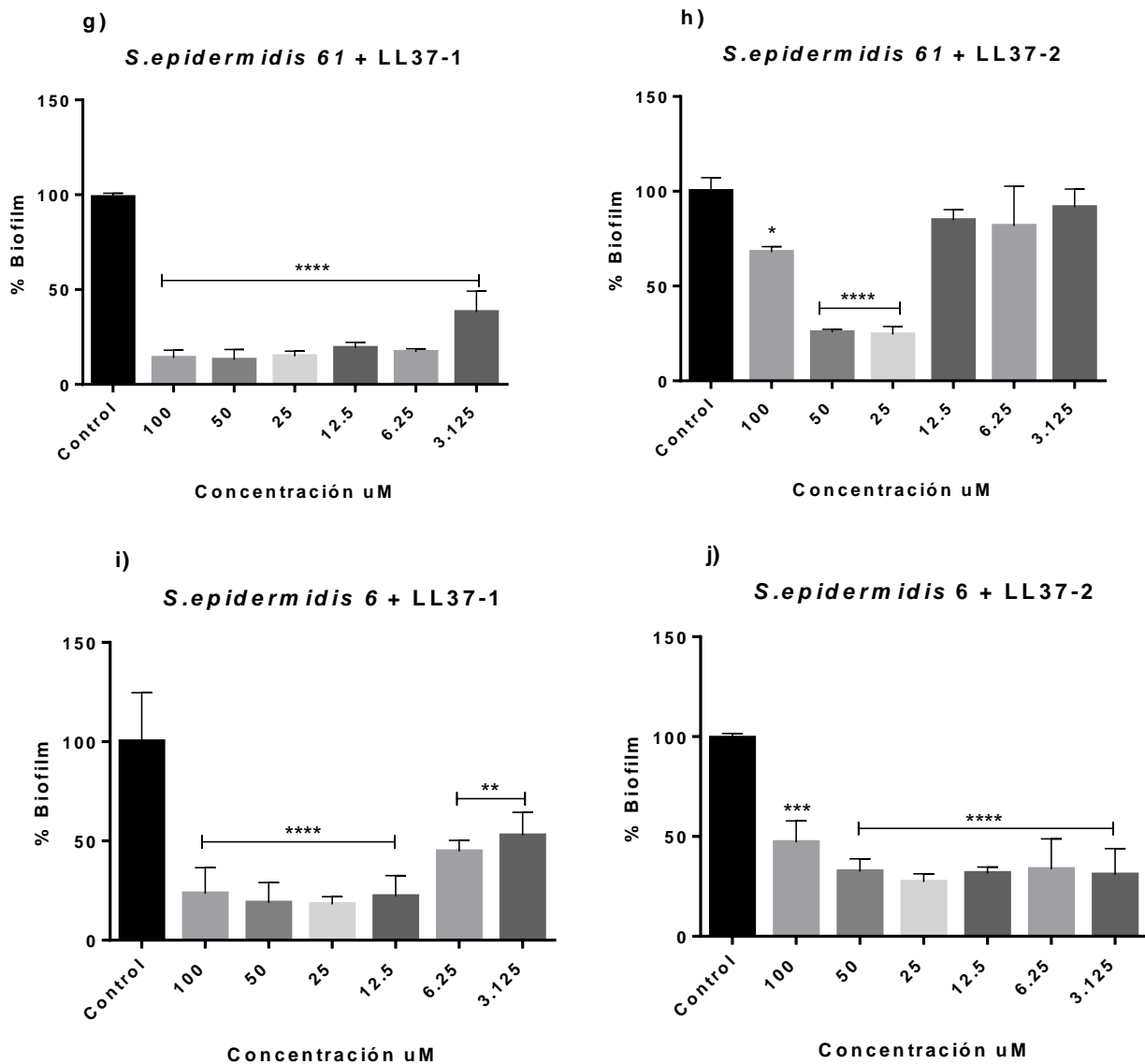
Aislamiento <i>Staphylococcus</i>	Presencia operón <i>IcaRADBC</i>	Perfil de resistencia	Formación de Biopelícula
35984	Positivo	N/A	Si
57	Positivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT CLIN,	Si
58	Positivo	OXA, GEN, CIP, ERY, SXT CLIN	Si
61	Positivo	OXA, ERY, CLIN	Si
6	Positivo	AMP, CLIN, ERY, GEN	Si

Los aislamientos mostrados en la tabla 7, fueron seleccionados para probar la actividad de los péptidos (LL37-1 y LL37-2) porque cumplían con las características de presentar resistencia a múltiples antibióticos, ser positivos para los genes que conforman el operón *IcaRADBC*, y mostrar fenotípicamente rasgos distintivos de formación de biopelícula ($OD \geq 1.0$).

En ellos se ensayó la actividad antibiopelícula de los péptidos LL37-1 y LL37-2 según los resultados, concentraciones inferiores de 10 μM redujeron 80% la formación de biopelícula con un valor de significancia $P < 0.00001$ para el péptido LL37-1. El péptido LL37-2 presentó el mismo porcentaje de inhibición pero a concentraciones superiores (entre 50 y 25 μM) Figura 21.

Figura 21: Actividad de los péptidos sobre la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus*

Continuación Figura 21: Actividad de los péptidos sobre la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus*



Los experimentos fueron realizados por triplicado, para el que se muestran las desviaciones estándar \pm SEM de la inhibición de la formación de biopelícula del péptido LL37-1 (izquierda) y LL37-2 (derecha) en aislamientos clínicos de *S. epidermidis* formadores de biopelícula a concentraciones entre (100 - 3-125 uM). La inhibición de la formación de biopelícula se evaluó midiendo el OD595 de los pozos después de la tinción con cristal violeta. La significancia estadística se evaluó mediante el test ANOVA en un solo sentido (No asterisco $P > 0.05$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

El comportamiento del péptido LL37-1 fue más homogéneo en comparación del péptido LL37-2, puesto que a nivel general todas las concentraciones empleadas (excepto la concentración de 3,125 μM) 100 μM - 6,25 μM redujeron más del 80% ($p < 0.005$) la biopelícula formada por los cinco aislamientos clínicos de *Staphylococcus* ensayados.

El péptido LL37-2 tuvo un porcentaje de reducción de biopelícula similar al péptido LL37-1 pero a concentraciones más elevadas comportamiento que se presentó en cuatro de los cinco aislamientos ensayados, ya que el aislamiento *Staphylococcus* 6 (Figura 21 parte j), a diferencia de los demás aislamientos mostró un porcentaje de inhibición estadísticamente significativo ($p < 0.05$) incluso a la concentración más baja de 3,125 μM . Estos resultados son concordantes a los hallazgos de É. Hell y colaboradores, donde investigaron el posible efecto del péptido LL-37 de antimicrobiano de catelicidina humana sobre la formación de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* según sus resultados bajas concentraciones de LL-37 (1 μg) disminuyó significativamente tanto la unión de bacterias a una superficie inerte como la formación de biopelícula (160), pero no se observó inhibición del crecimiento incluso a 16 mg/mL de LL-37, lo cual indica un efecto directo del péptido sobre la producción de biopelículas pero sin ningún efecto evidente sobre el crecimiento microbiano.

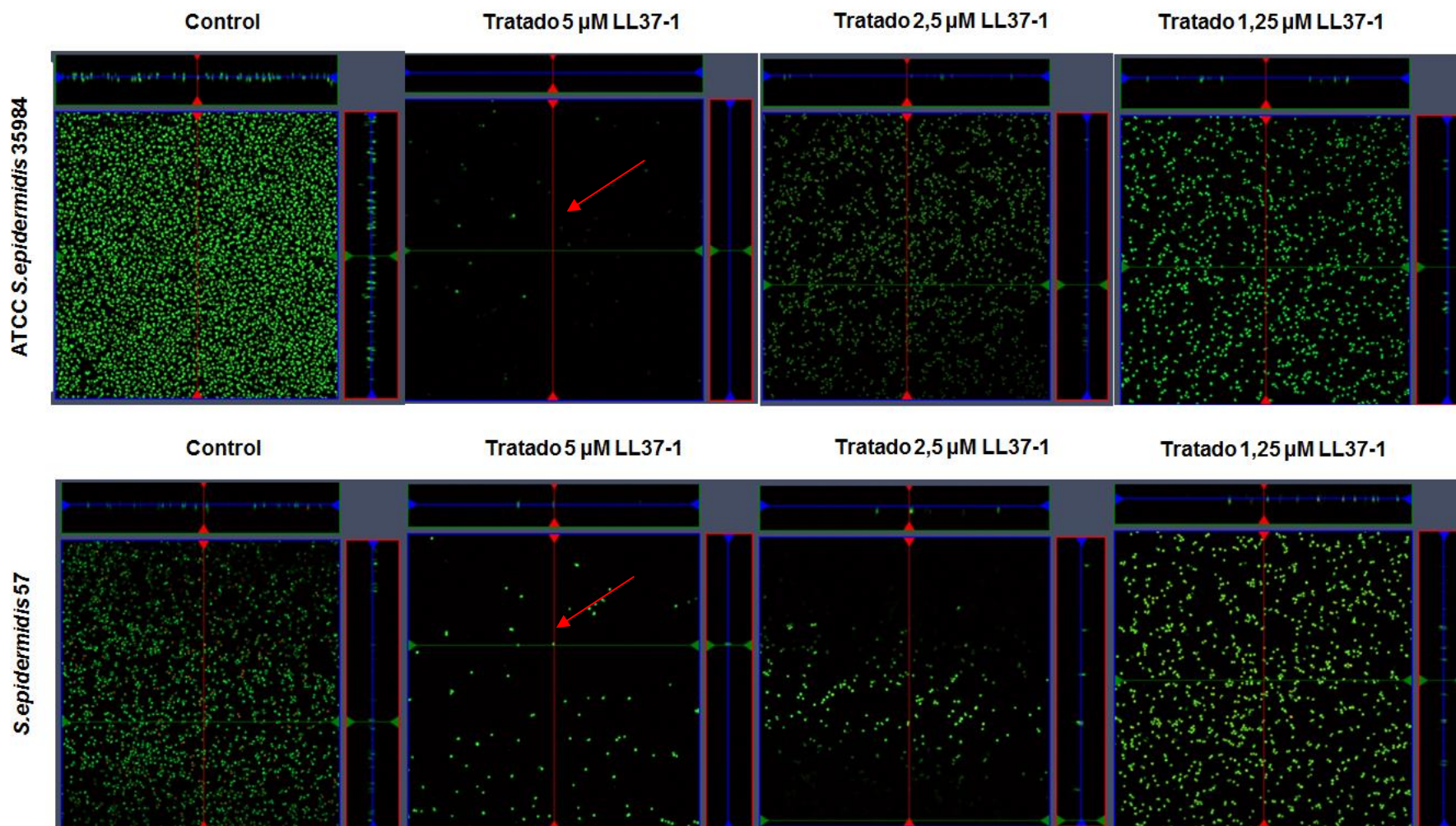
4.10 LL37-1 como potente péptido antibiopelícula

Se verificó el papel del péptido LL37-1 en la dispersión de células de biopelícula en la cepa ATCC *S.epidermidis* 35984 y el aislamiento clínico *S.epidermidis* 57, los cuales se caracterizan por ser fuertes formadores de biopelícula. Se empleó un gradiente de concentración entre (5 μM y 1,25 μM) mediante la metodología cabina de flujo continuo celular, según los resultados el péptido LL37-1 erradicó en un 100% la agregación de células vivas bacterianas a partir de biopelícula existente, 24 horas después del tratamiento a una concentración de 5 μM (Figura 22) de la cepa control ATCC 35984 parte superior de la Figura 22; resultado similar fue obtenido para el aislamiento 57 (parte inferior) pero a diferencia de la cepa 35984, la inhibición no es tan clara puesto que la imagen correspondiente al control

(ausencia de tratamiento) no presenta un número elevado de células microbianas en comparación al control de la cepa ATCC 35984, en ambas cepas se observó que las concentraciones más bajas de péptido (2,5 y 1,25 μM) no desencadenaron la dispersión de células de biopelícula.

La técnica de visualización de biopelícula cabina de flujo continuo celular presenta una serie de ventajas en comparación de la técnica de cuantificación de biopelícula por cristal violeta (CV). Si bien es cierto el CV es considerado la técnica “gold estándar” para la evaluación de biopelículas, la cabina continuo celular presenta una mayor sensibilidad y tiene la ventaja de medir la cantidad de células vivas y muertas pero con el agravante de una mayor dificultad para su ejecución y un mayor riesgo de contaminación. Al comparar los resultados obtenidos por CV se evidencia que los péptidos, esencialmente el péptido LL37-1 presenta un rango de actividad entre 25 y 6,25 μM , y que a una concentración de 3,125 μM parece perder actividad; bajo esta premisa se diseñó el ensayo por cabina de flujo continuo celular con el fin de tomar ventaja de su mayor sensibilidad, se optó por realizar un gradiente tomando como concentración alta, una en la cual el péptido mantenía su actividad (6,25 μM) y como concentración baja, una concentración inferior que por la metodología de CV, el péptido presentó pérdida de actividad (3,125 μM), por lo anterior, el gradiente de concentración que se estableció en la cabina de flujo continuo celular fue entre 5 μM a 2,5 μM Figura 22.

Figura 22: Inhibición de biopelículas del péptido LL37-1 por cabina de flujo continuo celular



Se recogieron células dispersas de biopelículas de células en flujo continuo celular de *S.epidermidis* ATCC 35984 (parte superior) y *S.epidermidis* aislamiento 57 (parte inferior) maduras y se realizaron recuentos de células viables después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones del péptido LL37-1 (5, 2,5 y 1,25 μ M/mL). Las biopelículas se tiñeron usando SYTO-9 para colorear las células vivas verdes y el yoduro de propidio (PI) para colorear células muertas de color rojo. A continuación, las muestras se examinaron utilizando microscopía confocal de barrido láser (CLSM). Cada panel muestra reconstrucciones desde la parte superior en el panel grande y lados en los paneles derecho e inferior (dimensiones xy, yz y xz). Se muestran imágenes confocales representativas de las células presentes en las cámaras de flujo después del tratamiento con el péptido para cada condición.

Como se observa en la figura 22, a una concentración de 5 μM se presenta una erradicación de más del 95% de la formación de biopelícula tanto de la cepa control ATCC 35984 (Parte superior Figura 22) y un resultado similar de erradicación se observa en el aislamiento clínico *S.epidermidis* 57 (Parte inferior Figura 22); a concentraciones menores se observa una reducción en la actividad del péptido LL37-1 puesto que observa que tanto la cepa control como el aislamiento clínico 57 recuperan la capacidad de formación de biopelícula. Según este resultado, a una concentración de 5 μM el péptido LL37-1 presenta actividad antibiopelícula el cual es una concentración excepcionalmente baja en comparación con los hallazgos de otros estudios realizados. Estudios sobre la actividad antibiopelícula de péptidos de origen humano como el desarrollado por Joerg Overhage y colaboradores en el año 2008, muestran la potente capacidad inhibitoria de la secuencia nativa del péptido LL-37 sobre la formación de biopelículas bacterianas *in vitro*, en concordancia con el estudio de E' Hell usando concentraciones muy bajas del mismo, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, muy por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC 64 $\mu\text{g/mL}$) se logra la disrupción completa de la biopelícula de *P.aeruginosa*. Lo que demuestra la prometedora actividad del péptido LL-37 para ser empleado como alternativa de inhibición en la formación de las biopelículas (161). Con base en los promisorios resultados de la actividad de este péptido, se han realizado estudios con el fin de establecer qué segmentos de la secuencia completa de LL-37, presenta la mayor actividad de bloqueo en la formación de biopelículas. Por ejemplo Xiaorong Feng y colaboradores en el año 2013, realizaron la fragmentación del péptido LL-37 generando segmentos cortos entre 10 a 15 residuos, con el fin de identificar si presentan mayor actividad antimicrobiana en comparación al péptido completo; y verificar qué segmento presenta la mejor actividad, para ello, investigaron la secuencia de LL-37 completa y sus fragmentos (KS-30, KR-20 y KR-12) en aislamientos clínicos Multi-Drogo-Resistentes (MDR) de *A. baumannii*. Según sus resultados la concentración mínima inhibitoria (MIC) de LL-37 osciló entre 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los fragmentos KR-20 y KR-12 eliminaron todos los aislamientos de *A. baumannii* con concentraciones entre 8 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (95). Además, estudiaron la concentración mínima de

erradicación de biopelículas (MBEC), según sus resultados, la secuencia nativa de LL-37 inhibió y dispersó aproximadamente 60% de biopelículas de *A. baumannii* a una concentración de 32 µg/mL. Los fragmentos truncados de LL-37 inhibieron la formación de biopelículas a concentraciones entre 64-128 µg/mL. Así, al comparar los resultados aquí obtenidos, con los hallazgos de Feng y colaboradores, se requirió una concentración menor (5 µM = <2 µg/mL) para erradicar una proporción similar de biopelícula, lo que valida la aproximación relacionada al diseño y generación de péptidos optimizados a partir de la secuencia nativa de LL-37.

Siguiendo este tipo de estrategias para estudiar las características reductoras de la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula del péptido LL-37, se han realizado estudios empleando la síntesis química de fragmentos específicos evaluando su actividad, como en el estudio realizado por Guang Shun Wang en el 2008 donde se identificó el péptido KR-12 correspondiente a los residuos 18-29 de LL-37, el cual presentó un efecto tóxico selectivo en bacterias pero, no en células humanas. Según sus hallazgos por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) reveló un giro corto de tres hélices-anfipáticas cargadas positivamente, permitiendo una afinidad efectiva con fosfatidilglicerol aniónicos de las membranas bacterianas (146).

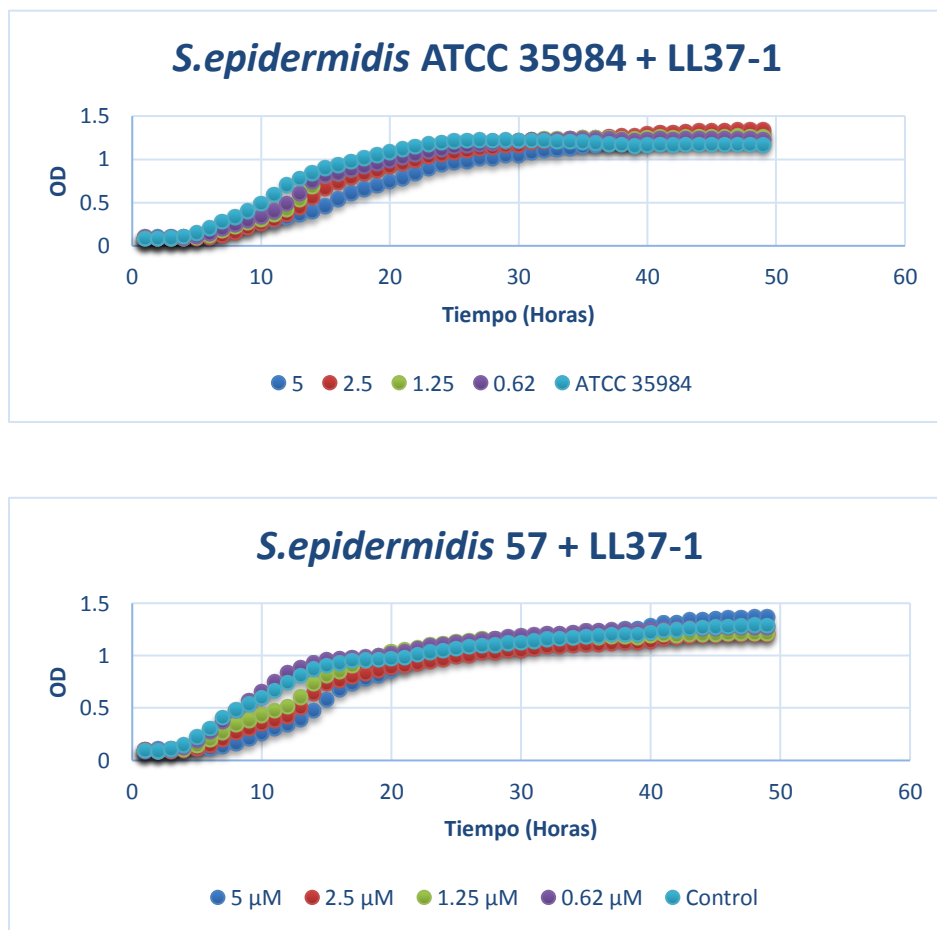
En contraste a pesar de los múltiples ensayos realizados, sólo uno de la nueva generación de péptidos antimicrobianos, aquellos (diseñados) han demostrado eficacia en estudios clínicos de fase 3, y dada su excepcional amplio espectro de actividad, un único péptido puede tener actividad contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos incluso virus y parásitos, aumentando el interés por investigar estas dinámicas moléculas (14).

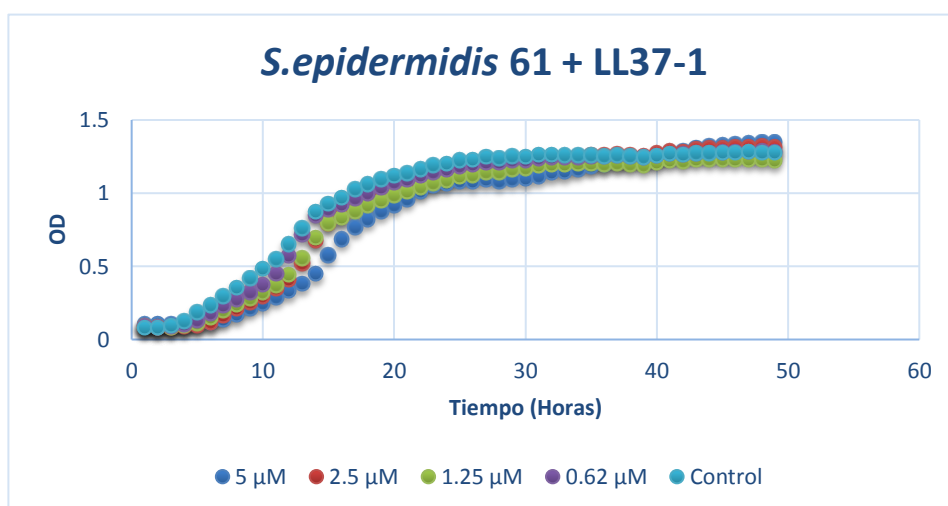
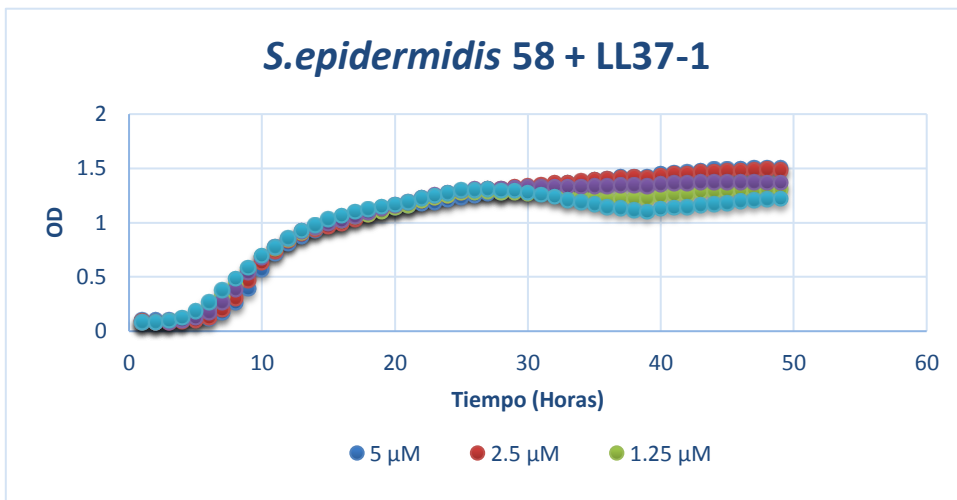
5. Evaluación crecimiento microbiano

Con el fin de verificar el posible efecto inhibitorio de los péptidos sintetizados en el crecimiento microbiano de células en estado planctónico, se realizaron curvas de crecimiento. Los resultados se reportaron como la reducción en el crecimiento bacteriano en presencia de péptido en comparación con crecimiento basal bacteriano en ausencia de péptido.

Como se observa en la figura 23, el péptido LL37-1 no afectó el crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones ensayadas, lo cual corrobora que el péptido LL37-1 presenta una actividad selectiva en contra de la formación de biopelícula y no interviene en el crecimiento microbiano, se realizaron curvas de crecimiento en presencia de concentraciones decrecientes (5-0,62 μM) empleando los aislamientos clínicos *S.epidermidis* 57,58, 61 y la cepa control ATCC 35984.

Figura 23: Curvas de crecimiento de los aislamientos de *S.epidermidis* en presencia del péptido LL37-1



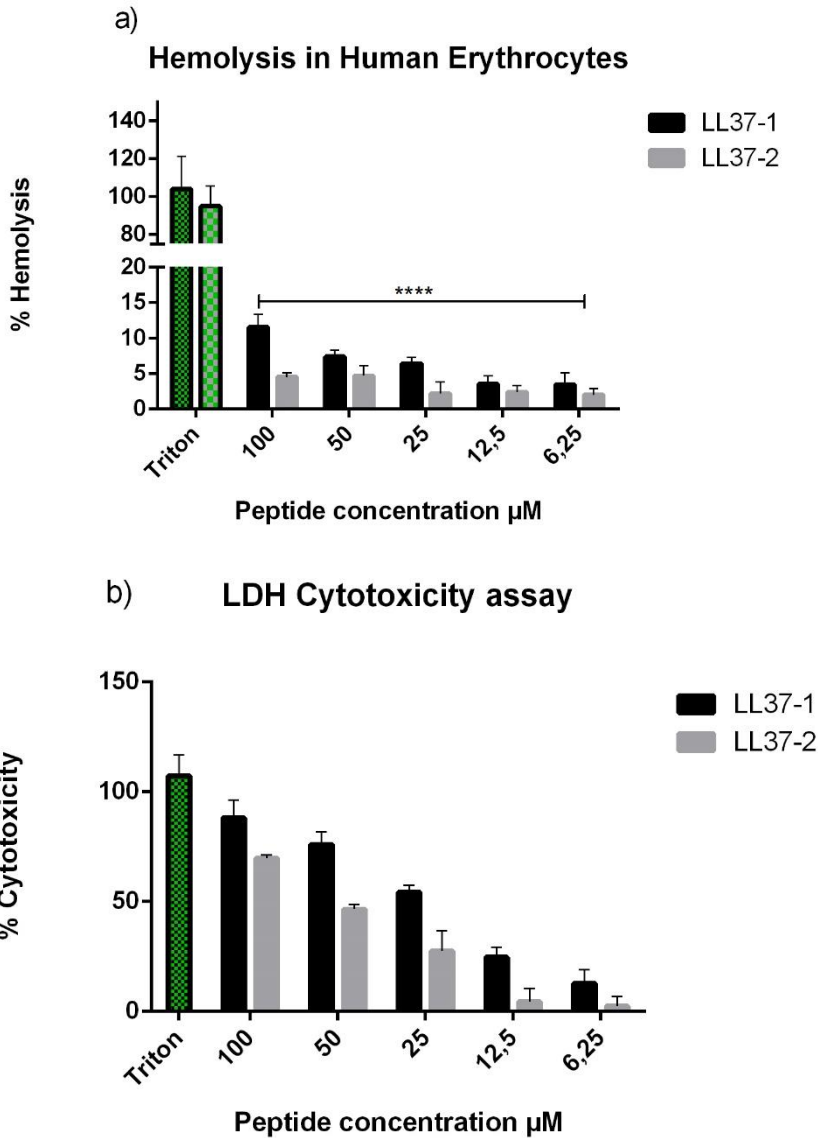


5.1 Actividad citotóxica de los péptidos LL37-1 y LL37-2

Con el fin de evaluar el posible efecto deletéreo de los péptidos en células humanas y que posean un posible potencial uso terapéutico, deben carecer de actividad citotóxica en contra de células humanas normales. Para ello se verificó el efecto hemolítico y citotóxico en hematíes y polimorfonucleares humanos respectivamente; mediante la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Según los resultados obtenidos, el péptido LL37-1 presentó un bajo porcentaje de citotoxicidad, ya que a una concentración de 6,25 µM se observó una

liberación de 10% de la enzima LDH; con respecto al péptido LL37-2, empleando la misma concentración de 6,25 μM el porcentaje de citotoxicidad fue de aproximadamente 2% resultados que pueden ser observados en la Figura 23. Con respecto al grado de hemólisis, se estudiaron 5 concentraciones diferentes de ambos péptidos desde 100 μM hasta 6.25 μM , comparado con un control normalizado de 100% hemólisis que corresponde a Tritón al 10% Figura 24, donde se muestra el nulo porcentaje de hemólisis incluso a altas concentraciones de 100 μM . La concentración hemolítica media (CH50) para los 2 péptidos ensayados fue inferior a 100 μM con un P valor de significancia de <0.05 .

Figura 24: Actividad Citotóxica de los péptidos LL37-1 y LL37-2



a) Efecto hemolítico de los péptidos LL37-1 y LL37-2, los valores experimentales se normalizaron con los resultados de 1X PBS (0% de hemólisis) y 10% de Tritón X-100 (100% de hemólisis).b) La citotoxicidad de los péptidos se evaluó frente a PBMC humanos utilizando el ensayo de liberación de LDH. Cada péptido fue ensayado a 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 μM . La significancia estadística se evaluó mediante el test de ANOVA en un solo sentido (No asterisco $P > 0.05$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

En resumen, aquí describimos una estrategia para estimular la actividad anti-biopelícula *in vitro* del péptido catelicidina humana LL-37 a partir de combinaciones híbridas con otros péptidos descritos. Los resultados demostraron que esta estrategia es efectiva y exitosamente aplicada en este estudio. El enfoque de síntesis química de péptidos sintéticos usando como plantilla la catelicidina humana LL-37 y la combinación con fragmentos cortos de otros péptidos antimicrobianos, es una estrategia alterna para generar cambios en la hidrofobicidad/hidrofilicidad, anfipaticidad y helicidad de la secuencia parental, e incrementar de esta forma su efecto microbicida y/o inhibitorio en la formación de biopelículas bacterianas, apoyando así, el avance en el diseño racional de nuevos antibióticos peptídicos. Los péptidos utilizados en este enfoque anti-biopelícula pueden proporcionar plantillas para un nuevo grupo de antimicrobianos y posibles futuras terapias terapéuticas para el tratamiento de infecciones.

Los péptidos así diseñados LL37-1 y LL37-2 surgen como alternativa del tratamiento de infecciones asociadas a la formación de biopelículas como mecanismo de virulencia bacteriana, por su menor probabilidad de generar resistencia y baja toxicidad en células del hospedero, constituyéndose en moléculas promisorias para ser incluidas en el recambio del arsenal de fármacos antimicrobianos actualmente empleados.

6.2 Recomendaciones

Se considera importante para la continuación de este trabajo, estudiar más de cerca el efecto citotóxico en altas concentraciones del péptido LL37-1, puesto que sería interesante verificar si tiene algún efecto en células tumorales humanas, ya que por los alcances y límites del presente trabajo no se evaluó. Por otro lado se

recomienda realizar estudios de co-localización para establecer el blanco de acción por los cuales ejercen su actividad anti-biopelícula. Además, realizar estudios a profundidad sobre la posible participación de los péptidos LL37-1 y LL37-2 en el crecimiento bacteriano. De igual forma sería interesante probarlos en otras especies bacterianas para determinar si presentan algún tipo de espectro extendido.

7. Productos académicos

-Pasantía en Investigación Center of Microbial and Immunology, Hancock Lab. Enero - Julio 2016. Universidad British Columbia, Vancouver-Canadá.

-Beca Curso Avanzado de Antibióticos Instituto Pasteur y Fundación Mérieux, Octubre 9-20, 2016. Les Pensieres, Francia.

-Presentación poster: "Evaluation of Anti-biofilm activity of synthetic peptides analogous to human cathelicidin LL-37 in clinical isolates of Staphylococcus spp" Curso Avanzado de Antibióticos Instituto Pasteur y Fundación Mérieux, Octubre 9-20, 2016. Les Pensieres, Francia.

-Presentación oral "Evaluation of Anti-biofilm activity of synthetic peptides analogous to human cathelicidin LL-37 in clinical isolates of Staphylococcus spp" Miércoles 23 de Noviembre 2016 en el Congreso Internacional de Bioinformática y Biología Computacional, Universidad Católica, Buenos Aires Argentina.

-Presentación oral: "Actividad anti-biopelícula de análogos sintéticos de catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de Staphylococcus spp". Viernes 18 de Noviembre 2016. Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas ACIN, Medellín, Colombia.

-Sometimientto a publicación el artículo titulado: "Rational design of α -helical hybrid peptides derived from human cathelicidin LL-37 with anti-biofilm activity against Staphylococcus spp" by Alexander Guevara Agudelo, Liliana Muñoz Molina, Jeannette Navarrette, Robert E.W. Hancock, Luz Mary Salazar Pulido, Gladys Pinilla.

Apoyo financiero

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias mediante la convocatoria 657-2014 Código COL0041221. Contrato RC651-2014 y por la División de Investigación de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Bibliografía

1. Barsoumian AE, Mende K, Sanchez CJ, Beckius ML, Wenke JC, Murray CK, et al. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. 2015;15(1):223. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/15/223>
2. Noah D, Fidas G. The global infectious disease and its implications for the United States. *Prot Sci*. 2000;79(4):1–63.
3. The White House Administration. National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Open Government National Action Plans*. 2015;1–63.
4. Wolcott R, Dowd S. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plastic and reconstructive surgery* [Internet]. 2011;127 Suppl:28S–35S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21200270>
5. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics For Emerging Pathogens. *Science*. 2010;325(5944):1089–93.
6. Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Mathema B, et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2008;105(4):1327–32. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0710217105%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.0710217105>
7. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(4):1–24.
8. de la Fuente-Núñez C, Mansour S, Wang Z, Jiang L, Breidenstein E, Elliott M, et al. Anti-Biofilm and Immunomodulatory Activities of Peptides That Inhibit Biofilms Formed by Pathogens Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Antibiotics* [Internet]. 2014;3(4):509–26. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-6382/3/4/509/>
9. Wan M, van der Does AM, Tang X, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *Journal of leukocyte biology* [Internet]. 2014;95(June):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550523>
10. Seil M, Nagant C, Dehaye JP, Vandenbranden M, Lensink MF. Spotlight on human LL-37, an immunomodulatory peptide with promising cell-penetrating properties. *Pharmaceuticals*. 2010;3(11):3435–60.

11. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial Peptides : Versatile Biological Properties. 2013;2013(Table 1).
12. Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2012;287(10):7738–45. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.303602>
13. He Y, Lazaridis T. Activity determinants of helical antimicrobial peptides: a large-scale computational study. *PloS one* [Internet]. 2013;8(6):e66440. Available from: <http://www.mendeley.com/research/activity-determinants-helical-antimicrobial-peptides-largescale-computational-study/%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3680375&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2006;24(12):1551–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt1267>
15. Chua SL, Liu Y, Yam JKH, Chen Y, Vejborg RM, Tan BGC, et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature communications* [Internet]. 2014;5:4462. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042103%5Cnhttp://www.nature.com/ncomms/2014/140721/ncomms5462/full/ncomms5462.html>
16. Simões LC, Simões M, Vieira MJ. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(19):6192–200.
17. Fleming A. On The Evolution of Bacterial Multicellularity Nicholas. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1922;33(4):395–401.
18. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplementum* [Internet]. 2013;121(136):1–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635385>
19. Feng G, Cheng Y, Wang S-Y, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI, et al. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *npj Biofilms and Microbiomes* [Internet]. 2015;1(August):15022. Available from: <http://www.nature.com/articles/npjbiofilms201522>
20. Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Høiby N, Molin S, et al. Combating biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2012;65(2):146–57.
21. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* [Internet]. 2015;5(January):1. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4309206&tool=pmcentre>

z&rendertype=abstract

22. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(2):114–22.
23. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2010;89(3):205–18.
24. DeLeon S, Clinton A, Fowler H, Everett J, Horswill AR, Rumbaugh KP. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an In vitro wound model. *Infection and Immunity*. 2014;82(11):4718–28.
25. Toba FA, Akashi H, Arrecubieta C, Lowy FD. Role of biofilm in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* ventricular assist device driveline infections. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2011;141(5):1259–64.
26. Elgharably H, Hussain ST, Shrestha NK, Blackstone EH, Pettersson GB. Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2016 Nov 13];28(1):56–9. Available from: <http://www.semthorcardiovascsurg.com/article/S1043067915002300/fulltext>
27. Baddour LM, Epstein AE, Erickson CC, Knight BP, Levison ME, Lockhart PB, et al. Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: A scientific statement from the american heart association. *Circulation*. 2010;121(3):458–77.
28. Percival SL, Suleman L, Donelli G. Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*. 2015;64(4):323–34.
29. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine* [Internet]. 2014;228(10):1083–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406229>
30. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56(12):1581–8.
31. Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology* [Internet]. 2014;2014:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ab/2014/543974/>
32. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7(2):277–81.
33. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, Lawrence JR, Korber DR, Hyde BD, et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY)* [Internet]. 1999;284(5418):1318–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980>

34. Kim J, Park HD, Chung S. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*. 2012;17(8):9818–34.
35. Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneu M, et al. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC microbiology* [Internet]. 2014;14(1):253. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4189659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Stewart EJ, Ganesan M, Younger JG, Solomon MJ. Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Scientific reports* [Internet]. 2015;5(August):13081. Available from: <http://www.nature.com/srep/2015/150814/srep13081/full/srep13081.html>
37. Wickham JR, Rice C V. Solid-state NMR studies of bacterial lipoteichoic acid adsorption on different surfaces. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2008;34(3):154–61.
38. Wilking JN, Zaburdaev V, De Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz D a. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2013;110(3):848–52. Available from: <http://www.pnas.org/content/early/2012/12/26/1216376110.short>
39. Ilyina TS, Romanova YM, Gintsburg AL. Biofilms as a mode of existence of bacteria in external environment and host body: The phenomenon, genetic control, and regulation systems of development. *Russian Journal of Genetics*. 2004;40(11):1189–98.
40. Heffernan B, Murphy CD, Casey E. Comparison of planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas fluorescens* dsm 8341 cells grown on Fluoroacetate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(9):2899–907.
41. Kragh KN, Hutchison JB, Melaugh G, Rodesney C, Roberts AEL, Irie Y, et al. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio*. 2016;7(2):1–11.
42. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(8):555–67.
43. Mack D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect*. 1999;43 Suppl(I 999):S113-25.
44. Angeles Argudín M, Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Vandecandelaere I, Denis O, Coenye T, et al. Biofilm formation of *ica* operon-positive *Staphylococcus epidermidis* from different sources. *Apmis*. 2015;123(12):1081–9.
45. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*. 1999;67(10):5427–33.

46. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm formation and detection of *icaAB* genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2011;14(2):132–6.
47. Silva Filho RG, Lima e Silva AA, Saramago CSM, Bento CAM, Souza IS, Souza MJ, et al. Biofilm production by clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with genotypic profile, presence of virulence-related genes and antibiotic resistance. *African Journal of Microbiology Research*. 2015;9(14):1026–36.
48. Penesyan A, Gillings M, Paulsen I. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules* [Internet]. 2015;20(4):5286–98. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/4/5286/>
49. Sandoval-motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria : a systems biology perspective. *Wiley Periodicals*. 2016;8(June):253–67.
50. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2012;65(2):183–95.
51. Broszat M, Grohmann E. Horizontal Gene Transfer in Planktonic and Biofilm Modes. In: Rumbaugh KP, Ahmad I, editors. *Antibiofilm Agents: From Diagnosis to Treatment and Prevention* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 67–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-53833-9_5
52. Hellen Gelband, Molly Miller-Petrie, Suraj Pant, Sumanth Gandra, Jordan Levinson, Devra Barter, Andrea White RL. State of the world's antibiotics. Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, DC. 2015;
53. Laxminarayan R. Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation. *Science* [Internet]. 2014;345(6202):1299–301. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/345/6202/1299.full>
54. Dubos RJ. Studies on a bacterial agent extracted from soil *Bacillus*. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 1939 Jun 30;70(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133784/>
55. Liou JW, Hung YJ, Yang CH, Chen YC. The antimicrobial activity of gramicidin a is associated with hydroxyl radical formation. *PLoS ONE*. 2015;10(1):5–7.
56. Van Epps HL. Unearthing antibiotics. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(2):259.
57. Stec B. Plant thionins - The structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006;63(12):1370–85.
58. Hardy J. Small, But Potent Killers. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2012;436–48.
59. Society TR, Society R, Sciences B. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. 1922;

60. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. Vol. 10, *The British Journal of Experimental Pathology*. 1929. p. 226–36.
61. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery* [Internet]. 2012;25:67–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439833>
62. Fernandez de Caleyá R, Gonzalez-Pascual B, García-Olmedo F, Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Applied microbiology* [Internet]. 1972;23(5):998–1000. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=380489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Florack DEA, Stiekema WJ. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology*. 1994;26(1):25–37.
64. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1543–75.
65. Zeya HI, Spitznagel JK. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. *Journal of Bacteriology*. 1966;91(2):755–62.
66. Groves, M.L.; Peterson, R.F.; Kiddy CA. Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature*. 1965;207:1007–8.
67. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. 1985;76(4):1427–35.
68. Hultmark D, Engström a, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG, et al. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO journal* [Internet]. 1983;2(4):571–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=555063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(15):5449–53.
70. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*. 2005;27(18):1337–47.
71. Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS Journal*. 2011;278(20):3942–51.
72. Tam JP, Wang S, Wong KH, Tan WL. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 2015;8(4):711–57.

73. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(13):5807–22.
74. Lee JK, Jeon JK, Kim SK, Byun HG. Characterization of Bioactive Peptides Obtained from Marine Invertebrates [Internet]. 1st ed. Vol. 65, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2012. 47-72 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00004-4>
75. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010;1(5):440–64.
76. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews Microbiology* [Internet]. 2011;9(5):356–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2546>
77. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: Mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(6):1097–107.
78. Cirac AD, Moiset G, Mika JT, Koc A, Salvador P, Poolman B, et al. The Molecular Basis for Antimicrobial Activity of Pore-Forming Cyclic Peptides. *Biophysical Journal*. 2011;100(May):2422–31.
79. Amos STA, Vermeer LS, Ferguson PM, Kozłowska J, Davy M, Bui TT, et al. Antimicrobial Peptide Potency is Facilitated by Greater Conformational Flexibility when Binding to Gram-negative Bacterial Inner Membranes. *Nature Publishing Group* [Internet]. 2016;(May):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37639>
80. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Józwiak A, Horbańczuk J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular Biology Reports*. 2012;1–14.
81. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters*. 1995;374(1):1–5.
82. Veldhuizen EJA, Brouwer EC, Schneider VAF, Fluit AC. Chicken Cathelicidins Display Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria without Inducing Strong Resistance. *PLoS ONE*. 2013;8(4).
83. Mazzo-silva JA, Diamond G. Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*. 2014;265–310.
84. Gao W, Xing L, Qu P, Tan T, Yang N, Li D, et al. Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. *Scientific Reports* [Internet]. 2015;5(October):17260. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep17260>
85. Sarker P, Ahmed S, Tiash S, Rekha RS, Stromberg R, Andersson J, et al. Phenylbutyrate counteracts Shigella mediated downregulation of cathelicidin in

- rabbit lung and intestinal epithelia: A potential therapeutic strategy. PLoS ONE. 2011;6(6).
86. Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*. 1997;90(7):2796–803.
 87. Byfield FJ, Kowalski M, Cruz K, Leszczyńska K, Namiot A, Savage PB, et al. Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* [Internet]. 2011;187(12):6402–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095714>
 88. Lee D, Yamasaki K, Rudsil J, Zouboulis CC, Tae G, Yang J, et al. Sebocytes Express Functional Cathelicidin Antimicrobial Peptides and Can Act to Kill *Propionibacterium Acnes*. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(7):1863–6.
 89. Larrick JW, Lee J, Ma S, Li X, Francke U, Wright SC. Structural, functional analysis and localization of the human CAP 18 gene. *FEBS Letters* [Internet]. 2002;398:1–7. Available from: [papers3://publication/uuid/74466E96-9947-4D63-A77F-11181B1D3542](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181B1D3542)
 90. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters*. 1995;368(1):173–6.
 91. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1995 Jan 3;92(1):195–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42844/>
 92. Duplantier AJ, van Hoek ML. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(JUL):1–14.
 93. Li P, Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B, et al. PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Activity of the Naturally Occurring Human Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37 *. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(6):3718–24.
 94. Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *Faseb J* [Internet]. 2006;20(12):2068–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012259>
 95. Feng X, Sambanthamoorthy K, Palys T, Parnavitana C. The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [Internet]. Vol. 49, *Peptides*.

- Elsevier Inc.; 2013. 131-137 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.007>
96. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*. 2014;7(5):545–94.
 97. Ulaeto DO, Morris CJ, Fox MA, Gumbleton M. Destabilization of α -Helical Structure in Solution Improves Bactericidal Activity of Antimicrobial Peptides : Opposite Effects on Bacterial and Viral Targets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(4):1984–91.
 98. Peptide A, Ding B, Soblosky L, Nguyen K, Geng J, Yu X, et al. Physiologically-Relevant Modes of Membrane Interactions by the Human. *Scientific reports*. 2013;3–10.
 99. Byfield FJ, Kowalski M, Cruz K, Leszczynska K, Namiot A, Savage PB, et al. Cathelicidin LL-37 Increases Lung Epithelial Cell Stiffness, Decreases Transepithelial Permeability, and Prevents Epithelial Invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;
 100. Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis , infection , and disease. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(October):1–13.
 101. van der Does a. M, Bergman P, Agerberth B, Lindbom L. Induction of the human cathelicidin LL-37 as a novel treatment against bacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92(4):735–42.
 102. Noore J, Noore A. Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Is Effective against both Extra- and Intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(3):1283–90.
 103. Moncla BJ, Mietzner TA, Hillier SL. In vitro activity of cationic peptides against *Neisseria gonorrhoeae* and vaginal *Lactobacillus* species : The effect of divalent cations. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;2012(June):249–55.
 104. Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;
 105. Batoni G, Casu M, Giuliani A, Luca V, Maisetta G, Mangoni ML, et al. Rational modification of a dendrimeric peptide with antimicrobial activity: Consequences on membrane-binding and biological properties. *Amino Acids*. 2016;48(3):887–900.
 106. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature reviews Drug discovery [Internet]*. 2012;11(1):37–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173434>
 107. Liu W, Chen Y, Ming X, Kong Y. Design and Synthesis of a Novel Cationic Peptide with Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. *Biomed Research International*. 2015;2015.

108. Zhang S-K, Song J, Gong F, Li S-B, Chang H-Y, Xie H-M, et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity [Internet]. Vol. 6, Scientific Reports. 2016. p. 27394. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep27394>
109. Malmsten M. Interactions of Antimicrobial Peptides with Bacterial Membranes and Membrane Components [Internet]. Vol. 16, Current Topics in Medicinal Chemistry. 2016. p. 16–24. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/132781/article>
110. Morelli G, Leone M, Galdiero M. Structural Insights into and Activity Analysis of the Antimicrobial Peptide Myxinidin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;58(9):5280–90.
111. Yibing Huang, Liyan He, Guirong Li, Naicui Zhai, Hongyu Jiang YC. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein & cell*. 2014;
112. Shental-bechor D, Haliloglu T, Ben-tal N. Interactions of Cationic-Hydrophobic Peptides with Lipid Bilayers : A Monte Carlo Simulation Method. *Biophysical Journal* [Internet]. 2007;93(6):1858–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.103812>
113. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* [Internet]. 2016 May;141:528—536. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>
114. Tanaka M, Takamura Y, Kawakami T, Aimoto S, Saito H. Effect of amino acid distribution of amphipathic helical peptide derived from human apolipoprotein A-I on membrane curvature sensing. *FEBS Letters* [Internet]. 2013;587(5):510–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.026>
115. Reißer S, Strandberg E, Steinbrecher T, Ulrich AS. 3D Hydrophobic Moment Vectors as a Tool to Characterize the Surface Polarity of Amphiphilic Peptides. *BPJ* [Internet]. 2014;106(11):2385–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.020>
116. Vishnepolsky B, Pirtskhalava M. Prediction of Linear Cationic Antimicrobial Peptides Based on Characteristics Responsible for Their Interaction with the Membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2014;
117. Fjell CD, Hancock REW, Cherkasov A. AMPPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics* [Internet]. 2007 Mar 6;23(9):1148–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm068>
118. Brahmachary M, Krishnan SPT, Koh JLY, Khan AM, Seah SH, Tan TW, et al. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2004 Jan 1;32(Database issue):D586–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308766/>

119. Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research*. 2004 Jan;32(Database issue):D590-2.
120. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research [Internet]*. 2009 Jan 28;37(Database issue):D933–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686604/>
121. Falanga A, Lombardi L, Franci G, Vitiello M, Iovene MR, Morelli G, et al. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. Másson M, editor. *International Journal of Molecular Sciences [Internet]*. 2016 May 21;17(5):785. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881601/>
122. Ili N, Novkovi M, Guida F, Xhindoli D, Benincasa M, Tossi A, et al. Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013;1828:1004–12.
123. Albericio F. Developments in peptide and amide synthesis. *Current opinion in chemical biology*.
124. Behrendt R, White P, Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*. 2016;22(1):4–27.
125. Pipkorn R, Braun K, Wiessler M, Waldeck W, Schrenk H, Koch M, et al. A Peptide & Peptide Nucleic Acid Synthesis Technology for Transporter Molecules and Theranostics – The SPPS. *International Journal of Medical Sciences*. 2014;11.
126. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research [Internet]*. 2016;44(November 2015):D1087–93. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2015/11/23/nar.gkv1278.full>
127. Jacob B, Park IS, Bang JK, Shin SY. Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL-37 possessing both antimicrobial and antiendotoxic activities without mammalian cell toxicity. *Journal of Peptide Science*. 2013;19(11):700–7.
128. de La Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EBM, Horsman S, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(5):2696–704.
129. Fox M a., Thwaite JE, Ulaeto DO, Atkins TP, Atkins HS. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. *Peptides [Internet]*. 2012;33(2):197–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.013>
130. Schiffer M, Edmundson AB. Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential. *Biophysical Journal*. 1967;7(2):121–35.

131. Yan R, Xu D, Yang J, Walker S, Zhang Y. A comparative assessment and analysis of 20 representative sequence alignment methods for protein structure prediction. *Scientific reports* [Internet]. 2013;3:2619. Available from: <http://www.nature.com/srep/2013/130910/srep02619/full/srep02619.html>
132. Sharma A, Gupta P, Kumar R, Bhardwaj A. dPABBs : A Novel in silico Approach for Predicting and Designing. *Nature Publishing Group* [Internet]. 2016;(January):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21839>
133. Merrifield RB. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin*. *Biochemistry* [Internet]. 1964 Sep 1;3(9):1385–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00897a032>
134. Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* [Internet]. 1991 Nov 7;354(6348):84–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/354084a0>
135. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* [Internet]. 2012 Apr;16(2):97–116. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610310001584>
136. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2009;1(6):2876–90.
137. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology* [Internet]. 2015;5(February):7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4322838&tool=pmcentre&rendertype=abstract>
138. P.M.A. P, V.B. B, B.P.R. S, J.N. R, R.S. P, C. S, et al. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [Internet]. 2014;78(1):85–92. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52838224>
139. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1995 Sep;33(9):2233–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228385/>
140. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2011;15(4):305–11.

141. Christensen GD, Simpson W a., Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985;22(6):996–1006.
142. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS pathogens* [Internet]. 2014;10(5):e1004152. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4031209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
143. Sun S, Kjelleberg S, McDougald D. Relative Contributions of Vibrio Polysaccharide and Quorum Sensing to the Resistance of Vibrio cholerae to Predation by Heterotrophic Protists. *PLoS ONE*. 2013;8(2).
144. Walker JM. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009;531(1):588. Available from: <http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>
145. Oddo A, Hansen PR. Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides. In: Hansen PR, editor. *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 427–35. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_31
146. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(47):32637–43.
147. Chingaté S, Delgado G, Salazar LM, Soto CY. The ATPase activity of the mycobacterial plasma membrane is inhibited by the LL37-analogous peptide LLAP. *Peptides*. 2015;71(571):222–8.
148. Sigurdardottir T, Andersson P, Davoudi M, Malmsten M, Schmidtchen A, Bodelsson M. In silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(9):2983–9.
149. Xu W, Zhu X, Tan T, Li W, Shan A. Design of Embedded-Hybrid Antimicrobial Peptides with Enhanced Cell Selectivity and Anti-Biofilm Activity. *PLoS ONE*. 2014;9(6):1–13.
150. Dice B, Stoodley P, Buchinsky F, Metha N, Ehrlich GD, Hu FZ. Biofilm formation by ica-positive and ica-negative strains of Staphylococcus epidermidis in vitro. *Biofouling*. 2009;25(4):367–75.
151. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology*. 2005;55(6):1883–95.
152. Tormo MÁ, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. Bap-dependent biofilm formation

- by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*. 2005;151(7):2465–75.
153. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology*. 2010;75(1):187–207.
154. Waldrop R, McLaren A, Calara F, McLemore R. Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose in Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2014;472(11):3305–10.
155. Lee JS, Bae YM, Lee SY, Lee SY. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer. *Journal of Food Science*. 2015;80(10):M2279–86.
156. Dean SN, Bishop BM, Hoek ML Van. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 2011;114(May).
157. Reinhardt A, Neundorf I. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;
158. López-García B, Ubhayasekera W, Gallo RL, Marcos JF. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;356(1):107–13.
159. Tian ZG, Dong TT, Teng D, Yang YL, Wang JH. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;82(6):1097–103.
160. Hell É, Giske CG, Nelson A, Römling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Letters in Applied Microbiology* [Internet]. 2010;50(2):211–5. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-74049150646&partnerID=40&md5=119ed110aa534f972d10d583e9bbd928>
161. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs ECW, Rehm BH a, Hancock REW. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity*. 2008;76(9):4176–82.

