



**SÍNTESIS DE POSIBLES PÉPTIDOS β -PLEGADOS NANOENCAPSULADOS
CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y
Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA (SARM)**

ANDRES MAURICIO CASTAÑEDA AMAYA

**LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2017



**SÍNTESIS DE POSIBLES PÉPTIDOS B-PLEGADOS NANOENCAPSULADOS
CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y
Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA (SARM)**

ANDRES MAURICIO CASTAÑEDA AMAYA
Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Tesis para optar al título
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Directora:
CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, PhD Microbiología

Codirector:
RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, PhD Bioquímica

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIA

A MI MAMÁ Y PAPÁ POR HACER ESTE SUEÑO REALIDAD.
AL RESTO DE MI FAMILIA, QUIENES FUERON LOS PRINCIPALES
ESTIMULOS EN AVANZAR CON MI PROYECTO DE VIDA.
A QUIENES NO ESTÁN PRESENTES EN ESTE MOMENTO, PERO DEJARON
UN GRAN RECUERDO EN MI CORAZÓN.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dra. Claudia Cristina Ortiz López por su confianza, incansable orientación, apoyo incondicional, amistad e infinita sabiduría en sus consejos, sugerencias y por haber apreciado mis opiniones como profesional en formación. Dr. Rodrigo Torres Sáez muchas gracias por los momentos compartidos durante mi formación como magister y por mostrarme el camino para despertar mi lado científico con su sabiduría, creatividad, elocuencia y pedagogía. A Uds. dos los considero como mi mamá y papá adoptivos....

A la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo por fortalecerme como profesional a través de sus grandes conocimientos, comprensión, humildad, paciencia y confianza durante la estancia en el Núcleo Biotecnología de Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV), Chile.

A Colciencias muchas gracias por promover la ciencia mediante proyectos de pasantías en el exterior, permitiéndome desarrollar como profesional competente. Así mismo, por darme la oportunidad de conocer el lugar donde nació la gran idea del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM).

A mi familia adoptiva chilena, Dra. Marisela Carmona y Manuel Díaz por abrirme la puerta de su casa y aceptarme como otro miembro de su maravillosa y hermosa familia.

A la maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por la gran comprensión en mis momentos de calamidad y la oportunidad de regresar para seguir con mi sueño en la formación profesional de docente e investigador.

A la Universidad Industrial de Santander por los aportes en mi formación profesional, por permitirme interactuar con gente grandiosa, la cual ha sido modelo de competencia y estímulo para continuar en el logro de mis metas.

A todos mis compañeros y compañeras de la maestría, del laboratorio GIBIM y del laboratorio de péptidos de NBC, muchas gracias por el apoyo, enseñanza, disposición, diversión y su cálida amistad, factores que permitieron terminar esta etapa grande en mi vida.

A mis mascotas Baby & Happy; pequeños familiares quienes me acompañan en momentos de lectura, escritura y realización de gráficos. Son estos eternos niños que me alegran el día, así sean los más oscuros.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	16
1 Marco conceptual y antecedentes	27
1.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) 27	
1.2 Mecanismos de acción de los PAMs en la membrana celular bacteriana	28
1.2.1 Modelos de formación de poros celulares.....	29
1.2.2 Modelos de acción detergente en la membrana celular	30
1.3 Potencial antibacteriano de los PAMs	33
1.4 Péptidos Beta plegados y Beta giro 36	
1.5 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS)	38
1.6 Péptidos antimicrobianos encapsulados en polímeros biodegradables.....	42
2Objetivos	45
2.1 Objetivo General	45
2.2 Objetivo específicos	45
3Materiales y métodos	46
3.1 Materiales	46
3.1.1 Cepas resistentes a antibióticos	46
3.1.2 Cultivos.....	46
3.1.1 Reactivos.....	46
3.1.2 Software y recursos online.....	46
3.2 Métodos	47
3.3 Fase de síntesis de péptidos	50
3.3.1 Obtención de péptidos C1 y C2 oxidados	51
3.4 Fase de caracterización I. Aspectos Físicoquímicos de los péptidos	52
3.4.1 Caracterización de pureza y masas de los PAM	52
3.4.2 Purificación y análisis de la pureza de los péptidos por Cromatografía Líquida De Alta Eficiencia En Fase Reversa RP-HPLC.....	52
3.4.3 Análisis de las estructuras primarias de los péptidos B1 y B2 por Espectrometría de masas de Ionización por Electronebulización (MS-ESI) ...	53

3.4.4	Análisis de la estructura primaria de los péptidos mediante Espectrometría de Masas de Desorción e ionización por láser asistida a una matriz en Tiempo De Vuelo (MS MALDI-TOF)	53
3.4.5	Micro extracción en fase sólida.....	54
3.4.6	Análisis de la estructura secundaria mediante Dicroísmo Circular	54
3.5	Fase de caracterización I. Actividad biológica de los péptidos libres.....	55
3.5.1	Determinación de la actividad antibacteriana de los PAMs frente a EC O157:H7 y SARM	55
3.5.2	Ensayo de Toxicidad de los PAMs.....	56
3.6	Fase de encapsulación de los PAMs	57
3.6.1	Síntesis de nanopartículas de PLGA-PAM	57
3.7	Fase de caracterización II. Aspectos fisicoquímica de las nanopartículas de PLGA-PAM	58
3.7.1	Tamaño hidrodinámico y Potencial Zeta (ζ) de las nanopartículas.....	58
3.7.2	Morfología y tamaño de las nanopartículas por FE-STEM.....	59
3.7.3	Cuantificación del péptido cargado en Nps de PLGA utilizando cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)	59
3.8	Fase de actividad biológica del péptido encapsulado	60
3.8.1	Determinación de la actividad antibacteriana de los Nps PLGA-péptido frente a EC O157:H7 y SARM	60
3.8.2	Ensayo de Toxicidad de PAM encapsulado en nanopartículas de PLGA.....	61
3.8.3	Cálculo del índice terapéutico de los PAM libres y encapsulado.....	61
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1	Fase <i>in Silico</i>	62
4.1.1	Obtención de secuencias molde	62
4.1.2	Obtención de secuencias análogas	63
4.2	Fase de caracterización I: Caracterización fisicoquímica de los PAMs	66
4.2.1	Caracterización de pureza y masas de los PAMs	66
4.2.2	Análisis de estructura primaria de los péptidos mediante (MS-ESI) y MALDI-TOF	69
4.2.3	Análisis de la estructura secundaria mediante Dicroísmo Circular	72

4.3 Fase de encapsulación.	74
4.3.1 Selección del péptido B2 para encapsulación en polímero biodegradable PLGA.....	74
4.3.2 Síntesis de nanopartículas de PLGA- B2	75
4.4 Fase de caracterización II: Caracterización fisicoquímica de las NPs PLGA-PAM	75
4.4.3 Tamaño hidrodinámico y Potencial Zeta de las nanopartículas	75
4.4.4 Determinación del tamaño y morfología de las NPs PLGA-B2 mediante FE-STEM	77
4.4.5 Eficiencia de la encapsulación del péptido B2 cargado en las Nps de PLGA79	
4.5 Fase de caracterización II. Actividad biológica de la Nps PLGA-B2.....	80
4.5.1 Determinación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de los PAM libres y nanoencapsulados frente a las cepas resistentes de estudio.	80
4.5.2 Ensayo de Toxicidad de los PAM y PLGA-B2	89
4.5.2 Cálculo del Índice terapéutico	91
5CONCLUSIONES	94
6RECOMENDACIONES.....	95
BIBLIOGRAFÍA	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de los mecanismos de formación de poros de los PAMs: a. bastón-barril. b. Poro toroide. -----	30
Figura 2. Comparación de los mecanismos de acción de los PAMs: a. Alfombra. b. Canal agregado.-----	31
Figura 3. Estructura secundaria de un péptido beta plegado con su giro Beta y estabilizado con puentes de disulfuro entre cisteínas. (<i>Zhang y col, 2014</i>).---	37
Figura 4. Grupos protectores Boc y Fmoc. (<i>Fields y Noble, 1990</i>). -----	39
Figura 5. Estructuras de activadores de uronio (HBTU y TBTU), utilizados como agente de acoplamiento. (<i>Guzmán y col., 2007</i>).-----	40
Figura 6. Esquema de la metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc. -----	41
Figura 7. Estructura de ácido poli-láctico co- glicólico (x: número de unidades de ácido láctico, y: número de unidades de ácido glicólico). (<i>Makadia y col., 2011</i>) -----	43
Figura 8. Esquema general de la metodología -----	48
Figura 9. Esquema general de la síntesis de Nanopartículas de PLGA-B2 utilizando la metodología de doble emulsión/ difusión de solvente -----	58
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de identidad de Protegrina -1 para la obtención de la secuencia consenso con sus modificaciones sistemáticas. --	63
Figura 11. Alineamiento de las secuencias de identidad de B1 para la obtención de la secuencia análoga B2 con sus modificaciones sistemáticas. -----	64
Figura 12. Modificación sistemática de la secuencia C1 para la obtención de la secuencia análoga C2 -----	64
Figura 13. Estructuras secundarias de los péptidos B y C <i>in silico</i> -----	66
Figura 14. Cromatograma del péptido B1 obtenido por RP-HPLC.-----	67
Figura 15. Cromatograma del péptido B2 obtenido RP-HPLC.-----	67
Figura 16. Comparación de cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de los péptido C1: (A) No oxidado y (B) Oxidado.-----	68
Figura 17. Comparación de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de los péptidos C2: (A)No Oxidado y (B) Oxidado. -----	68
Figura 18. Espectro de masas obtenido por ESI del péptido B1 -----	69
Figura 19. Espectro de masas obtenido por ESI del péptido B2 -----	69
Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos C1 NOX / OX -----	71
Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos C2 NOX / OX.-----	71
Figura 22. Espectros de dicróismos circulares de los péptidos B y C. -----	73
Figura 23. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de Nps PLGA-B2 Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica,	

1 mg/mL de B2: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.004% (P/V) de Polietilenimina como fase acuosa externa. La medida del tamaño hidrodinámico se realizó por triplicado. -----	76
Figura 24. Histograma de distribución del potencial zeta (ζ) de las Nps PLGA-B2. Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica, 1 mg/mL de B2: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.004% (P/V) de PEI como agente catiónico. La medida del ζ de las Nps se realizó por triplicado (cada color es una medición). -----	77
Figura 25. Micrografía por FE- STEM en modo de transmisión de Nps PLGA-B2. Con un voltaje de aceleración del 30KV y magnificación de 80000x -----	78
Figura 26. Actividad antimicrobiana de péptido B1 y B2 frente a EC O157:H7 utilizando el método de microdilución en caldo. -----	81
Figura 27. Actividad antibacteriana de péptido B1 y B2 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo. -----	82
Figura 28. Actividad antibacteriana de los péptidos C1 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo. -----	84
Figura 29. Actividad antibacteriana de los péptidos C2 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo. -----	84
Figura 30. Actividad antibacteriana de los péptidos C1 frente a EC O157: H7 mediante el método de microdilución en caldo. -----	85
Figura 31. Actividad antibacteriana de los péptidos C2 frente a EC O157: H7 mediante el método de microdilución en caldo. -----	86
Figura 32. Actividad antibacteriana de PLGA-B2 frente a SARM y EC O157:H7 mediante el método de microdilución en caldo. -----	89
Figura 33. Actividad hemolítica de los péptidos B1 (1), B2 (2) y PLGA-B2 (3) determinada en eritrocitos, frente a las concentraciones de péptido evaluadas. -----	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de los PAMs en distintos blancos bacterianos ----	32
Tabla 2. Potencial antibacteriano en algunos PAMs -----	33
Tabla 3. Ejemplos de estudios realizados sobre encapsulación de PAMs en nanovehículos -----	44
Tabla 4. Propiedades Teóricas Físicoquímicas de los PAMs diseñados-----	65
Tabla 5. Iones teóricos de los péptidos B obtenidos por ESI-----	70
Tabla 6. Masa del ion molecular [M+H] obtenido del análisis de MALDI-TOF.-----	72
Tabla 7. Características físico-químicas de las Nps de PLGA-B2. -----	79
Tabla 8. Valores de la CMI ₅₀ y CMI ₉₉ frente a EC O157:H7 y SARM -----	83
Tabla 9. Comparación de la actividad antibacteriana de los péptidos C1 y C2 NO oxidados (NOX) y oxidados (OX) frente a las cepas de estudio. -----	87
Tabla 10. Índice terapéutico de los péptidos libres y encapsulado. -----	92

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu. Todos los aminoácidos presente el grupo Fmoc en el grupo amino terminal. NP: no presenta. -----	151
Anexo B. Soporte sólido utilizado en la síntesis de péptidos en fase sólida. ----	153
Anexo C. Agente de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc. -----	154
Anexo D. Tabla del número de acceso de las secuencias para los péptidos B y C, con identidad por encima del 85% de la base de datos de la NCBI. -----	155
Anexo E. Patrón de 50 ppm de la curva de calibración del péptido B2. Fase estacionaria: Columna C- 18 Agilent y Fase móvil Isocrática: 70:30, ACN:H ₂ O con 0.01% (V/V) TFA a 220 nm. -----	156
Anexo F. Determinación de la concentración mínima bactericida de C1 en cepas de SARM. -----	157
Anexo G. Actividad antimicrobiana de Poloxamer a diferentes diluciones frente a: a. <i>Escherichia coli</i> O157:H7, b. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina. (Concentración inicial de poloxamer: 0.1% P/V). -----	158
Anexo H. Cálculos del porcentaje de eficiencia de encapsulación del péptido B2 en polímero biodegradable de PLGA. -----	159
Anexo I. Cálculo de porcentaje de inhibición de la población bacteriana de los PAM libresy nanoparticulas de PLGA-B2.-----	132

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
β	Beta (estructura peptídica)
Θ	Elipticidad molar
A	Alanina
Aa / aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
A/O/A	Emulsión acuosa/orgánica/acuosa
ADN	Acido desoxirribonucleico
APD	Base de datos de péptidos antimicrobianos (del inglés <i>Antimicrobial Peptide Database</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección Americana de cultivos tipo (del inglés <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin Trifosfato (del inglés <i>Adenosin Triphosphate</i>)
BHI	Infusión Cerebro Corazón (del inglés <i>Brain Heart Infusion</i>)
BLAST	Herramienta de Búsqueda de Alineamientos locales (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
C	Cisteína
CAMP	Colección de péptidos antimicrobianos (del inglés <i>Collection of AntiMicrobial Peptides</i>)
CDC	Centro para el control de enfermedades (del inglés <i>Center for disease control</i>)
CH	Concentración hemolítica
CHA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D	Ácido Aspártico
Da	Daltons

DC	Dicroísmo circular
DCM	Diclorometano
DEPRAMs	Diseño y predicción de péptidos antimicrobiano (del inglés <i>Design and Prediction Antimicrobial Peptides</i>)
DESD	Doble emulsión - Difusión de solvente
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DLS	Dispersión de luz Dinámica (del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMF	N,N-Dimetilformiamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOTA	Acido 1,4,7,10 - tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (del ingles 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)
Ds	Desviación estándar
E	Ácido Glutámico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC O157:H7	<i>Escherichia coli</i> serotipo O157:H7
ESI	Ionización por electronebulización (del inglés <i>Electrospray ionization</i>)
F	Fenilalanina
FDA	Agencia de Drogas y alimentos (del inglés Food and Drug Administration)
Fmoc	9 – Flourenilmetiloxicarbonil
G	Glicina
H	Histidina
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il) 1, 1, 3,3-tetrametiluronio hexafluoroborato)
I	Isoleucina
IT	Índice terapéutico
K	Lisina
L	Leucina
LB	Luria-Bertani
LC-PDA	Cromatografía líquida con detector fotométrico de arreglo de diodos

LPS	Lipopolisacárido
M	Metionina
MALDI-TOF	Desorción e ionización por láser en asistida a una matriz en Tiempo de vuelo (del inglés Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight)
MBH	4-metilbencilhidrilamina
ME	Membrana Externa
MH	Medio Mueller Hilton
MI	Membrana interna
MS	Espectrofotometría de masas (del inglés: Mass Spectrometry)
MTT	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
N	Asparagina
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Nm	Nanómetros
NOX	No oxidado
Nps	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la salud
OX	Oxidado
Oxyma	Etil-2-ciano-2-(hidroximino)
P	Prolina
PAM	Péptido Antimicrobiano
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina (del inglés phosphatidilcholine)
PE	Fosfatidiletanolamina (del inglés phosphatidylethanolamine)
PEI	Polietilenimina
PG	Fosfatidilglicerol
PLGA	Ácido Poli-láctico co-glicólico (del ingles poly lactic-co-glycolic acid)
PS	Fosfatidil serina (del inglés phosphatidylserine)
Pz	Potencial Zeta
Q	Glutamina
R	Arginina

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de alta eficiencia en fase reversa (del inglés <i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
SARM-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina adquirido en la comunidad
SARM-IH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina intrahospitalario
SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida
STEM	Microscopía Electrónica de Barrido en modo de Transmisión (del inglés <i>Scanning Transmission Electronic Microscope</i>)
SUH	Síndrome urémico hemolítico
T	Treonina
TBTU	Tetrafluorobato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TFA	Ácido Trifluoroacético (del inglés Trifluoroacetic acid)
TFE	Trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano
TX-20%	Tritón X al 20%
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Valina
W	Triptófano
%P/V	Porcentaje Peso- volumen
ζ	Potencial Zeta

RESUMEN

TITULO: SÍNTESIS DE POSIBLES PEPTIDOS β -PLEGADOS NANOENCAPSULADOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)*

AUTOR: Andrés Mauricio Castañeda Amaya**

PALABRAS CLAVE: Péptidos beta plegados, péptidos antimicrobianos, Nanopartículas de PLGA, bacterias multirresistente a antibióticos

Se diseñaron in silico cuatro secuencias de péptidos con posible estructura secundaria de péptidos beta plegados y con potencial actividad antimicrobiana. Las modificaciones de W y R por aminoácido apolar / polar fueron sistemáticas. El péptido molde y su análogo fueron denominados como B1 y B2 y C1 y C2, respectivamente. Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida usando la estrategia Fmoc. Posteriormente se modificaron los péptidos C1 y C2 favoreciendo la formación de puentes disulfuro mediante la oxidación con dimetilsulfoxido. Los péptidos moldes y sus análogos fueron purificados mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC), obteniéndose una pureza superior del 90%. La estructura primaria de los péptidos fue caracterizada mediante Espectrometría de Masas y Ionización Electrospray (IES); la estructura secundaria de β -giro se determinó utilizando Dicroísmo Circular (DC). Posteriormente, se evaluó el efecto antibacteriano de los péptidos sintetizados frente a las cepas patógenas multiresistentes a antibióticos *Escherichia coli* O157: H7 (EC O157:H7) y *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM). También se evaluó el efecto hemolítico de los mismos. Todos los péptidos sintetizados presentaron actividad antibacterial frente a las cepas evaluadas. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron para los péptidos B2 y C2. En el caso de B2 se determinaron $CMI_{99} < 100 \mu M$ y $50 \mu M$ frente a la enterobacteria y el coco Gram positivo; mientras que en el caso de C2 se obtuvieron $CMI_{99} < 10 \mu M$ y $5 \mu M$, respectivamente. Debido al bajo rendimiento y el alto costo la de síntesis de C2, se trabajó con el péptido B2 para su encapsulación utilizando (PLGA). Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas utilizando (DLS), (STEM) y RP-HPLC. Finalmente, se evaluaron las actividades biológicas de PLGA-PAM B2, las cuales no presentaron actividad antibacteriana frente a las dos cepas evaluadas pese a los resultados previamente obtenidos para al péptido libre.

* Tesis de Maestría

** Facultad de Salud, Escuela de Microbiología. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora: Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga. Co-director: Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, Bioquímico

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS OF POSSIBLES β -FOLDED PEPTIDES NANOENCAPSULATED WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant. *

AUTHOR: Andres Mauricio Castañeda Amaya

KEYWORDS: β -sheet peptides, antimicrobial peptides, PLGA nanoparticles, multidrug resistant bacteria.

In this work, we design four peptides sequences with possible beta-sheet structure and potential antibacterial activity using bioinformatics tools. The W and R modifications by non-polar/polar amino acids were made systematically. The scaffold peptide and its analog were labeled as B1, B2, and C1, C2, respectively. The designed peptides were obtained by solid phase through N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy; C1 and C2 were modified with disulfide bonds by oxidation with DMSO. As results, all peptides were purified by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) with a purity above 90%, the primary and secondary structure were characterized by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) and circular dichroism (CD), respectively, obtaining typical beta structure. The antibacterial activity was performed against *Escherichia coli* O157: H7 and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). It is interesting to note that all peptides showed antibacterial activity against both bacteria tested, however, the best data and bioactivity were obtained both B2 and C2. In case of B2 obtained a Minimal Inhibitory Concentration MIC₉₉ < 100 μ M and 50 μ M against *E. coli* and SARM, while C2 got CMI₉₉ <10 μ M y 5 μ M, respectively. However, due to low efficiency and high cost of synthesis of C2, the peptide B2 was chosen to further studies. B2 was encapsulate into Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) nanoparticles, which were characterized by size, zeta potential, Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) and RP-HPLC (for loaded peptide). Finally, in comparison with free peptide, the biological activity of nanocomposite PLGA-peptide was tested finding no-activity against both bacteria.

* Magister's thesis

* ** Facultad de Salud, Escuela de Microbiología. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora: Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga. Co-director: Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, Bioquímico.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una extensa gama de bacterias patógenas que evolutivamente han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia frente a distintos antibióticos aprobados por la *Food and Drug Administration* (*FDA*, por sus siglas en inglés) [1]. La progresiva incidencia de bacterias con resistencia múltiple frente a antibióticos se ha convertido en un problema prioritario de salud pública. Algunas consecuencias se reflejan en la prolongación del tratamiento de enfermedades infecciosas, aumento del riesgo de muerte de los pacientes infectados, incremento de recursos destinados para el tratamiento de las infecciones y facilidad de transmisión [2; 3; 4; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>].

Entre los patógenos multirresistentes, se destaca en primer lugar *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (*SARM*), variante que ha sobrevivido al tratamiento con diferentes antibióticos incluyendo gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina, cloramfenicol, cefalotina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, lincomicina, tetraciclina y trimetropin sulfá [5; 6;7]. Por lo tanto, *SARM* ha sido declarado como uno de los patógenos emergentes con mayor resistencia antibiótica, implicado en infecciones hospitalarias (*SARM-IH*) e infecciones adquiridas en la comunidad (*SARM-AC*); a partir de este último grupo, se han aislado las cepas de mayor virulencia y resistencia antibiótica en contraste al grupo nosocomial [8; 9].

SARM produce diferentes espectros clínicos que se manifiestan desde infecciones superficiales autolimitadas o complicadas hasta infecciones invasivas graves caracterizadas por neumonía, bacteremia, endocarditis, sepsis o choque séptico, con índice de mortalidad estimada entre 20 y 50% (<http://www.MRSAsurvivors.org/about/MRSA-sepsis>).

Por otro lado, SARM causa 19.000 muertes anuales en hospitalizados de Norteamérica, superando otras infecciones como VIH, tuberculosis y las hepatitis virales [10].

SARM presenta una velocidad de mutación constante de 10^{-10} por nucleótido base [11], cuyos clones se han diseminado alrededor del mundo con perfiles de resistencia antibiótica que varían considerablemente entre regiones geográficas y países [12]. Colombia no ha sido ajena a esta problemática. Por ejemplo, SARM fue inicialmente caracterizada en 76 muestras recogidas entre 1996 y 1998, en cuatro hospitales de Bogotá y uno de Manizales; a partir de las muestras se aislaron cepas resistentes a ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina y trimetropin sulfá en distintas combinaciones [13;14]. Posteriormente, SARM fue identificada en otro estudio en el cual se encontró que el 83% de 597 aislados entre 2001 y 2002 de 15 hospitales a nivel nacional, eran resistentes a ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina [15]; en un estudio posterior, utilizando 200 muestras obtenidas de 17 hospitales nacionales, se encontró un 96% de resistencia múltiple a los antibióticos ciprofloxacina, gentamicina y rifampicina [14]. Finalmente, en un estudio con 618 muestras positivas para SARM obtenidas de 22 hospitales bogotanos, el 82% de los aislados presentaban un perfil de multiresistencia a clindamicina y eritromicina [16], lo cual demuestra el comportamiento constante de resistencia antibiótica de SARM en el país.

Además de los estudios sobre el desarrollo de resistencia en SARM, se han publicado estadísticas sobre prevalencia, las cuales incluyen un aumento significativo en cortos periodos de tiempo. Por ejemplo, en Bogotá, ascendió de un 28 % entre los años 1997 a 2000, hasta un 52% entre 2001 y 2002; y un 61% entre 2003 y 2006 [15; 17; 16]. Estas cifras alarmantes indicarían un aumento significativamente mayor que el presentado en otros países del mundo [15; 17].

En segundo lugar, la enterobacteria hemorrágica *Escherichia coli* O157:H7 (*EC O157:H7*) perteneciente al grupo caracterizado como Enterobacterias con Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLES); este serotipo virulento ha desarrollado resistencia en humanos frente a varios antibióticos comerciales como ampicilina, eritromicina, estreptomycin, sulfametoxazol y tetraciclina [18; 19], variando su rango de resistencia según las diferencias demográficas y económicas [20]. Este patógeno ha sido frecuentemente aislado de pacientes intoxicados por alimentos, quienes presentaban desde diarrea ligera hasta colitis hemorrágica. Esta última ocasionalmente progresa a síndrome urémico hemolítico (SUH) generando falla renal, anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica en niños, ancianos y adultos inmunocomprometidos. El SUH podría dejar secuelas renales, cardíacas y neurológicas e incluso ocasionar la muerte [21].

La revisión realizada por *Doyle y col.*, en 2006 sobre *EC O157:H7* [22], reveló que la mayoría de brotes y casos esporádicos a nivel mundial han ocurrido en países desarrollados, en particular en Estados Unidos, Reino Unido y Canadá. Adicionalmente en 1996, Japón presentó un brote masivo de 12.680 casos en la ciudad de Sakai, a partir del cual 121 desarrollaron SUH [23].

Respecto a Latinoamérica, *EC O157:H7* es la cepa aislada con mayor frecuencia, produciendo entre 60 a 80% casos de SUH post diarrea en Argentina [24; 25].

EC O157:H7 fue detectada por primera vez en Colombia en marzo de 1996, caracterizándose por presentar resistencia frente a ampicilina, furadolizona y trimetropin sulfa [26]. En adelante, los estudios realizados se han enfocado únicamente en la identificación molecular en diferentes zonas del país sin evidenciar su perfil de resistencia antibiótica frente a las intoxicaciones alimentarias [27; 28; 29].

El inquietante panorama debido a la constante prevalencia de bacterias multiresistentes y el elevado número de antibióticos convencionales no efectivos [30], demuestran la importancia de continuar en la búsqueda de compuestos con

potencial efecto contra bacterias patógenas multiresistentes, tales como *SARM* y *EC O157:H7*.

Numerosos trabajos han demostrado el uso de los *Péptidos Antimicrobianos* (PAMs) como una alternativa atractiva para enfrentar esta problemática [31; 30; 32; 33; 34; 35; 36]. Los PAMs son pequeñas moléculas con carga positiva y carácter anfipático, aisladas a partir de varios organismos que incluyen microorganismos, plantas y animales invertebrados y vertebrados. Los PAMs se caracterizan por presentar un amplio espectro de acción antimicrobiano que incluye bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, parásitos y virus problemática [37; 38; 39; 40; 41].

Además del papel antimicrobiano directo, los PAMs presentan hasta el momento un papel indirecto poco conocido como inmunomodulador en el cual forman parte de la expresión de cientos de genes en monocitos, células epiteliales y entre otras células, quimioatracción directa de células inmunes, liberación de citoquinas e inducción de respuesta inmune, promoción de angiogénesis, cicatrización, resolución de infecciones y citotoxicidad en células tumorales [42; 43; 44; 45; 46; 47].

Sin embargo, la actividad de los PAMs se ve limitada en términos de estabilidad, al ser degradados por proteasas como quimotripsinas, las cuales atacan los residuos básicos, que constituyen dominios esenciales para la actividad antimicrobiana de los mismos. En consecuencia, esta limitante reduciría la biodisponibilidad de los PAMs e impediría su administración oral, parenteral y tópica.

Ante esta limitante, es necesario realizar estudios que permitan aumentar la estabilidad de los péptidos frente a exo y endopeptidasas en células del organismo. En este sentido se han desarrollado estudios de diseño de PAMs mediante herramientas bioinformáticas que permiten predecir posibles actividades

biológicas mediante la modificación de secuencias de aminoácidos, para su posterior síntesis química [48; 49; 50; 51; 35].

Por otra parte, se han desarrollado métodos de conjugación con polímeros biodegradables mediante herramientas biotecnológicas de nanoencapsulación que mejoran la biodisponibilidad de los péptidos en varios tejidos conservando su bioactividad [52; 53; 54; 55; 56].

El presente trabajo estuvo dirigido hacia el diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica y biológica de nuevos péptidos con actividad antibacteriana frente cepas con multiresistencia antibiótica como *EC O157:H7* y SARM. Posteriormente se hicieron estudios de encapsulación con uno de los péptidos con mejores características y su respectiva caracterización.

1 Marco conceptual y antecedentes

1.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Son macromoléculas de aminoácidos producidos por gran variedad de organismos, como parte de su primera línea de defensa en eucariotas, o como una estrategia frente a limitación de nutrientes y de espacio en procariontes [58; 30]. En ambos clados filogenéticos, los péptidos presentan un amplio espectro de acción antimicrobiana, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y virus [37; 38; 39; 40]. Además de su función antimicrobiana, algunos PAMs presentan mecanismos diferentes de acción; por ejemplo, como inmunomoduladores participando en la quimioatracción de células inmunes, liberación de citoquinas e inducción de respuesta inmune, promoción de angiogénesis, mediador de la cicatrización, resolución de infecciones y citotoxicidad en células tumorales [42; 43; 44; 45; 46].

Los PAMs son relativamente pequeños, pueden contener de 5 a 20 residuos aminoácidos en el caso de péptidos sintéticos y hasta 50 en péptidos naturales; la mayoría son catiónicos con carga neta +2 o superior en condiciones fisiológicas, debido al exceso de aminoácidos básicos como arginina (R) y lisina (K) en relación con los aminoácidos ácidos aspartato (D) y glutamato (E) [59; 60]; aunque muchos de estos péptidos poseen otra carga positiva extra debido a la amidación del C-terminal (sustitución del grupo hidroxilo del carboxilo por amino), motivo típico hallado en ranas [59; 60; 61]. Los PAMs además poseen estructura anfipática, manifestada como una separación espacial de residuos hidrofílicos con hidrófobos sobre la superficie molecular. Estas propiedades son esenciales para su mecanismo de acción antimicrobiana, aumentando la solubilidad en soluciones acuosas que promueven la dimerización/oligomerización y la partición de las membranas lipídicas de los microorganismos [62; 63; 41].

Diferentes PAMs han sido evaluados en su actividad antimicrobiana y también han sido publicados en distintas bases de datos tales como: (i) APD [60], (ii) CAMP [64],

(iii) YADAMP [65] y (iv) LAMP [66]; siendo CAMP la más completa, con 2867 secuencias de péptidos experimentalmente validados.

Los PAMs pueden ser clasificados en distintos subgrupos dependiendo de los siguientes criterios: origen, tamaño, secuencia aminoacídica, acción biológica, mecanismo antimicrobiano y estructura tridimensional [67]. Para este proyecto se tendrá en cuenta la clasificación de los PAMs de acuerdo con la estructura tridimensional obtenida por Resonancia Magnética Nuclear (NMR); esta clasificación incluye los siguientes grupos: (a) PAMs con estructura β -plegada, (b) PAMs de α -hélice, c) PAMs ricos en cisteína d) PAMs ricos en aminoácidos regulares y e) PAMs compuestos de aminoácidos modificados [68].

1.2 Mecanismos de acción de los PAMs en la membrana celular bacteriana

Numerosos estudios han evidenciado varios mecanismos de actividad antimicrobiana de los PAMs, considerando universal la alteración y daño de la membrana bacteriana. La selectividad ante esta estructura celular es atribuida principalmente a su carga superficial negativa, debida a la composición bioquímica de fosfolípidos como fosfatidilglicerol, cardiolipina y lipopolisacárido en bacterias Gram negativas; mientras que en las bacterias Gram positivas es el ácido teicoico.

En contraste, las membranas mamíferas generalmente son de carga superficial neutra, debido a que los lípidos aniónicos como fosfatidilserina y esfingomiélinas están dispuestos en el lado citoplasmático y no expuestos como la membrana bacteriana [69; 32]. Así mismo, la inclusión de colesterol en la membrana mamífera puede reducir la citotoxicidad de los PAMs, dificultando la actividad del PAM por estabilización en la bicapa lipídica o actuando directamente y neutralizando su acción [70; 71;72].

Se han propuesto tres etapas consecutivas generales para el inicio y resolución de los mecanismos de acción de los PAMs sobre la superficie celular bacteriana: La primera etapa es la atracción PAM – membrana, donde ocurre la interacción

electroestática entre los residuos catiónicos de los péptidos con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana bacteriana. La segunda etapa es la adhesión o captación autopromovida, periodo de tiempo en que los péptidos atraviesan la membrana externa para poder interactuar con la membrana interna. La tercera etapa es la inserción del péptido y permeabilización de la membrana, en la cual se han propuesto los siguientes modelos para explicar el mecanismo de acción de los PAMs [73; 74 ;41]:

1.2.1 Modelos de formación de poros celulares

(a) *Modelo de tapón de barril*: los PAMs se insertan en orientación perpendicular al plano, arreglando grupos de “tapones” en forma de barril, debido a que la región hidrofílica de los péptidos interactúan frente al lumen del poro mientras la región hidrofóbica interactúa con los lípidos de la bicapa. Este modelo es generalmente aceptado para alameticina, gramicidina S y peptaboiles del género fungal *Trichoderma* [75; 76; 77; 78; 79] como se ilustra en la **figura 1a**.

(b) *Modelo del poro toroidal*: de manera semejante al modelo anterior, los PAMs se insertan en una orientación perpendicular al plano de la bicapa lipídica, en la cual regiones hidrofílicas e hidrofóbicas del péptido se asocian tanto con los fosfolípidos de la cara interna e interna de la membrana bacteriana, doblándolas y fusionándolas, permitiendo la difusión y arreglo forma de círculos de los péptidos, generando poros transmembranales. La longitud de estos poros correspondería a los diámetros de las cabezas de los fosfolípidos de membrana que interactúan con el PAM [80]; en este modelo están representado los PAMs magainina, melitina, proteigrina 1 y MSI-78 [81; 70; 71; 82; 79] como se observa en la **figura 1b**.

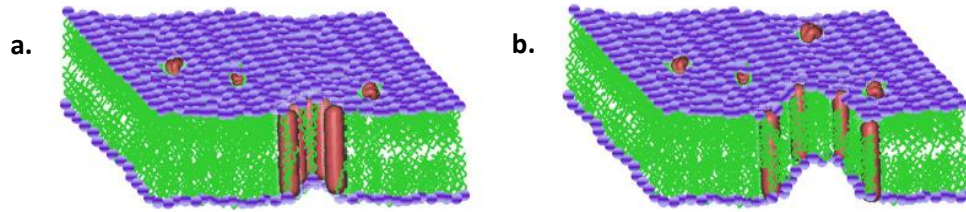


Figura 1. Comparación de los mecanismos de formación de poros de los PAMs: a. bastón-barril. b. Poro toroidal. [83].

1.2.2 Modelos de acción detergente en la membrana celular

(a) *Modelo de alfombra:* Contrario al mecanismo de formación de poros previamente descrito, este modelo los péptidos antibacterianos se acumulan y se al eje paralela / horizontal de la membrana bacteriana mediante interacciones iónicas fuertes o polares entre la regiones catiónica de los péptidos y grupos anionicos de las cabezas de los fosfolipidos, cubriendo áreas en forma semejante al de una “alfombra”. La acumulación de estos péptidos llega a un nivel crítico, aumentando la tensión entre las dos caras de la membrana, adelgazandola y desintengrandola en micelas, como se observa en la **figura 2a**. Este mecanismo ha sido propuesto para Ovispirina, Dermaseptina y Catecilidina ovina SMAP-29 [84;85;79].

(b) *Modelo del agregado molecular:* los PAMs se arreglan en la membrana sin orientación particular, produciendo en su interior agregados de distintos tamaños y formas, permeabilizando y desintengrando la membrana por acción detergente formando micelas, reportado en PAM como polifemusina (Wu y col., 1999; Powers y col., 2006), **figura 2b**.

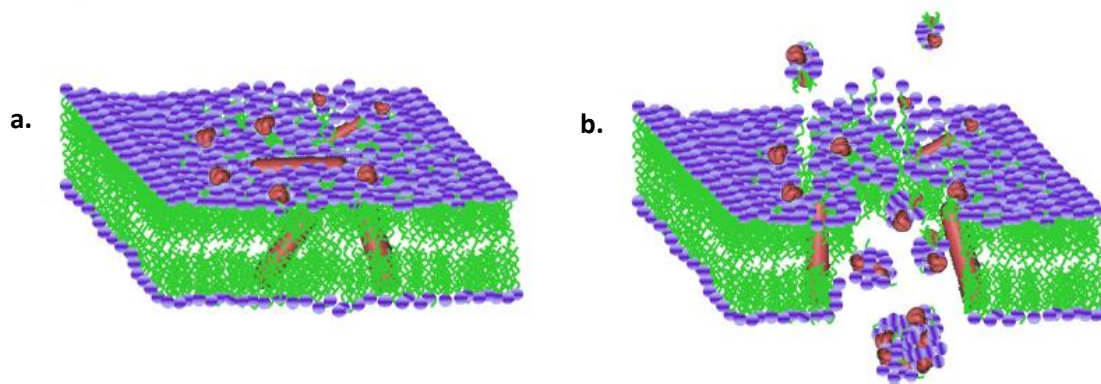


Figura 2. Comparación de los mecanismos de acción de los PAMs: a. Alfombra. b. Canal agregado. [83].

La cuarta etapa corresponde al debilitamiento de la membrana por acción de los distintos mecanismos del PAMs que involucran: (1) despolarización de la membrana celular, (2) filtración de metabolitos esenciales [73], (3) pérdida de componentes específicos de la membrana [70] y (4) alteración del potencial de membrana para la producción de ATP, para facilitar la salida de iones y, en consecuencia, la muerte celular [86].

Asimismo, varias investigaciones han reportado que algunos PAMs internalizados en la bacteria pueden interactuar con distintas dianas intracelulares como ácidos nucleicos y otras proteínas debido a su carga neta negativa, afectando procesos bioquímicos esenciales: Por lo tanto, favoreciendo un efecto sinérgico antibiótico y reduciendo la posibilidad de desarrollar resistencia contra los PAMs [87; 70] . En la **tabla 1** se presenta una recopilación bibliográfica sobre el mecanismo de acción de los PAMs en distintos blancos bacterianos.

Tabla 1. Mecanismo de acción de los PAMs en distintos blancos bacterianos

Blanco de acción	PAM	Mecanismo de acción	Referencia
Pared celular	Mersacidina	Inhibición síntesis de peptidoglicano por unión al lípido precursor II.	[88; 89]
	Nisina	Unión a los lípidos II, III y IV, interfiriendo en la síntesis de ácidos lipoteicos.	[90]
Ribosomas	Pirrocoricidina	Inhibe las chaperonas moleculares para el plegamiento de proteínas.	[91]
Ácidos nucleicos (ADN y ARN)	Pirrocoricidina	Inhibe la acción ATPasa de DnaK	[91]
	Proteigrinas	Inactivación del operon <i>dlt</i> en <i>S. aureus</i>	[92]
	Buforina II	Unión DNA y RNA	[93;94]
	Taquiplesina I	Unión al surco menor del DNA	[95]
Ácidos nucleicos (ADN y ARN)	Microcidina J25	Unión a la RNA polimerasa, inhibiendo la síntesis de RNA	[96]
Enzimas	Histatina 5	Unión a proteasas bacterianas	[97]

1.3 Potencial antibacteriano de los PAMs

Se ha publicado un extenso número de estudios de la actividad antibacteriana de diferentes PAMs contra una gran variedad de microorganismos. El aspecto más documentado ha sido el potencial antibacteriano, de acuerdo con la revisión bibliográfica que se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Potencial antibacteriano en algunos PAMs

PAM	Microorganismos		Referencias
	Gram Positivo	Gram Negativo	
Ascafina-1	CMI: <i>S. aureus</i> NCTC 8325 > 50, <i>S. epidermidis</i> RP62A = 50, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 >100 <i>Streptococcus</i> grupo B <i>HNTCC</i> 80130 = 13µM	CMI: <i>E.coli</i> ATCC 25922 = 3 – 6, <i>P. aureginosa</i> ATCC 27853 = 25, <i>E. cloacae</i> NHTCC 53001 = 50, <i>K. pneumoniae</i> KK3 9904 = 50 µM	[98]
Ascafina -5	CMI: <i>S. aureus</i> NCTC 8325 = 50, <i>S. epidermidis</i> RP62A = 13, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 >100 <i>Streptococcus</i> grupo B <i>HNTCC</i> 80130 = 6µM	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 25922 = 6, <i>P. aureginosa</i> ATCC 27853 = 13, <i>E. cloacae</i> NHTCC 53001 = 6, <i>K. pneumoniae</i> KK3 9904 = 13 µM	[98]
Dermaseptina s9	CMI: <i>S. haemolyticus</i> = 12.5, <i>B. megaterium</i> = 0.4, <i>L. monocytogenes</i> = 0.4µM	CMI: <i>E. coli</i> 363 = 3.1, <i>S. typhimurium</i> =3.1, <i>K. pneumonia</i> = 12.5 µM	[99]
Fowlicidina - 3	CMI: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 = 0.8 -2, <i>S. aureus</i> ATCC 25923=1, SARM BAA-39 = 1, MRSA ATCC43300 = 1 µM	CMI: <i>E.coli</i> ATCC 5922 = 2, <i>S. typhimurium</i> DT104 ATCC 700408= 2, <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076=2, <i>K. pneumoniae</i> = 1 µM	[100]
Maximina 1	CMI: <i>S. aureus</i> ATCC 2592 = 19.5, <i>B. pyocyaneus</i> CMCCB 10104 =19.5, <i>B. megatherium</i> = 19.5, <i>B. dysenteriae</i> = 2.7, <i>K. pneumoniae</i> = 9µg/mL	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 25922 = 19.5µg/mL	[101]

Nombre	Gram		
	Positivo	Negativo	
Maximina 4	CMI: <i>S. aureus</i> ATCC 2592 = 3.1, <i>B. pyocyaneus</i> CMCCB 10104 = 1.5, <i>B. megatherium</i> = 0.9, <i>B. dysenteriae</i> = 0.9, <i>K. pneumoniae</i> = 3.1 µg/mL	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 25922 = 2.7 µg/mL	[101]
MRP	CMI: <i>S. aureus</i> NCTC 8325 = 3,5 µM	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 2592 = 20 µM	[102]
Pandinina 2	CMI: <i>E. faecalis</i> ATCC 19433=2.4, <i>B.subtilis</i> ATCC 6051 = 4.8, <i>S. aureus</i> IAM 1098 = 2.4, <i>S. epidermidis</i> SAM 0020= 4.8 µM	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 11775 = 19.1, <i>P. aureginosa</i> ATCC 10145 = 38.2 µM	[103]
Piscidina 3	CMI: <i>S. iniae</i> = 3.1, <i>L. garviae</i> (R) = 3.1 – 6.3, <i>S. aureus</i> = 3.1, <i>S. faecalis</i> = 12.5 µg/mL	CMI: <i>E. coli</i> = 3.1, <i>K. pneumoniae</i> = 6.3, <i>S. flexneri</i> = 6.3, <i>P. aureginosa</i> = 25.0, <i>A. salmonicida</i> = 12.5, <i>A. hydrophila</i> = 1.6, <i>V. alginolyticus</i> = 6.3 µg/mL	[104]
Ponericina W1	CMI: <i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> I 116 > 0.125, <i>S. aureus</i> CIP 677 = 2-4 µM	CMI: <i>E. coli</i> ATCC 25922 = 2.5-20, <i>E. cloacae</i> HNTCC 53001 = 80, <i>K. pneumonia</i> KK3 9904 = 40, <i>P. aureginosa</i> ATCC 27853 = 80, <i>P. mirabilis</i> ATCC 25933 > 80 µM	[105]

Así mismo, diferentes estudios han demostrado las ventajas de emplear PAMs en contraste con antibióticos convencionales. *Ge y col., 1999* [106], demostraron el reducido desarrollo de la resistencia al PAM *pexiganima* (un análogo de la magainina) en *Staphylococcus aureus*, después de 7 subcultivos con el PAM en concentraciones subinhibitorias. El valor final de su Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI) de 8.3 µg/ml fue superior que su CMI inicial (5.8 µg/ml), indicando una leve disminución de su potencia antibiótica. Por el contrario, con el antibiótico mupirocina produjo una disminución de 8 veces el valor de CMI al de su CMI inicial (datos no mostrados). Resultado similar se obtuvo con el PAM *Proteigrina-1* frente a MRSA y *Pseudomonas aureginosa*, realizando más de 10 subcultivos con un CMI al 50% [31].

Zhang y col., 2005 [106], demostraron la escasa resistencia de *P. aureginosa* frente a cuatro PAMs (*HB50*, *HB153*, *HBPM4*, y *HB71*) en concentraciones mínimas subinhibitorias tras 30 subcultivos consecutivos en paralelo con los antibióticos cloranfenicol y rifampicina. En el caso de los PAMs la resistencia bacteriana fue aumentada tan solo de 2 a 4 veces; mientras que frente a ambos antibióticos fue de 8 a 16 veces. Estos resultados sugieren que, aunque la resistencia es posible frente a los PAMs, no sucedería por posología médica sino inducida en laboratorio. En consecuencia, los PAMs son candidatos viables para el desarrollo terapéutico de infecciones resistentes.

Demostrada la reducida inducción de los PAMs para promover los mecanismos de resistencia en comparación con antibióticos tradicionales frente a microorganismos patógenos, numerosas investigaciones han promovido la búsqueda de nuevas secuencias peptídicas. *Jenssen y col. (2006)* [61], evaluaron la efectividad antibacteriana de 23 péptidos α -hélice que incluían 10 catelicidinas humanas contra SARM. Por otra parte, estudios con el PAM *Imcroporina* alcanzaron una CMI de 50µg/ml, ocho veces menor que la presentada por cefotaxima (CMI: 400 µg/ml) y cuarenta veces menor que la exhibida frente a penicilina (CMI: 2000 µg/ml). Además de su potencial antibacteriano *in vitro*, demostró inhibición del crecimiento de SARM en ratón infectado [108].

En 2012 se realizó un monitoreo de la base de datos de la APD, que permitió obtener seis péptidos análogos que exhibieron actividad antibacteriana incrementada; uno de los PAMs (*DasamP1*) presentó actividad bactericida *in vitro*

y además impidió la formación de biopelículas en ratón con SARM asociado a infección de catéter [109]. En el mismo año se determinó la actividad bactericida de otro PAM (LTX-19) contra SARM, *S. aureus* con resistencia intermedia a Vancomicina (SARIV) y *S. aureus* resistente a Vancomicina (SARV) con una CMI entre 2 a 4 µg/ml, en ensayos de mortalidad en el tiempo [110].

Por otro lado, las publicaciones de PAMs contra EC O157:H7 han sido limitadas. Un estudio publicado en 2001 demostró que el análogo derivado del PR-39, PR-26 inhibió *in vitro* a *EC O157:H7* y *Listeria monocytogenes* en concentraciones de 10⁷ UFC/ml frente a dos concentraciones de péptido de 50 y 75 µg/ml, en distintos tiempos de incubación y temperatura [111]. Otro estudio publicado en 2012 sobre catecilidina humana LL37 y su homólogo murino CRAMP, demostraron el potencial antibacteriano de los péptidos al eliminar la bacteria *in vitro* y además de evidenciar que la ausencia genética de genes CRAMP en ratones *knockout*, padecieron la sintomatología y lesiones intestinales por la enterobacteria en contraste con los ratones salvajes, que fueron asintomáticos. Esto resaltaría la importancia de un posible tratamiento para el SUH [112].

Cabe resaltar que en nuestro grupo de investigación se demostró el aumento dramático de la actividad antibacteriana de algunos análogos de Lactoferrampina 265 - 284 (*LFampin 265-284*) con la incorporación de la secuencia GKLI en la región N-terminal, cuyos rango CIM fueron 10 y 40 µM para *264G-D265K* y *264GD-D265K/S272R*, respectivamente; concluyendo que la adición de los residuos, pudieron haber estabilizado la conformación hélice para el diseño y síntesis de futuros péptidos [113].

1.4 Péptidos Beta plegados y Beta giro

Los péptidos beta plegados son una familia de péptidos aislados de fuentes naturales y contienen una gran proporción en su secuencia aminoacídica de cisteína 14.57%, lisina (13.57%) y glicina (11.6%). Constituye un grupo de péptidos cuya configuración espacial está conformada por dos láminas unidas mediante puentes de hidrógeno entre sus grupos C-N / O-C ligadas por un giro

Beta y, además, que podrían presentar puentes disulfuro, denominándose esta configuración como péptidos beta lámina o conformación Beta (**figura 3**).

En este gran grupo de péptidos se encuentran las arenicinas, proteigrinas, y el dominio Beta de las β -defensinas taquiplesinas, entre otros (Zhang y col. 2014, Shenkarev y col. 2011, Scudiero y col. 2010) [107; 50; 51]. Así mismo, investigaciones recientemente publicadas han demostrado la síntesis racional de péptidos Beta plegados sin el requerimiento de cisteína, como se ha demostrado con el péptido (KIAGKIA)₃-NH₂ [115], IK8 all D, (IKIK)₂-NH₂ y (IRIK)₂-NH₂ [116].

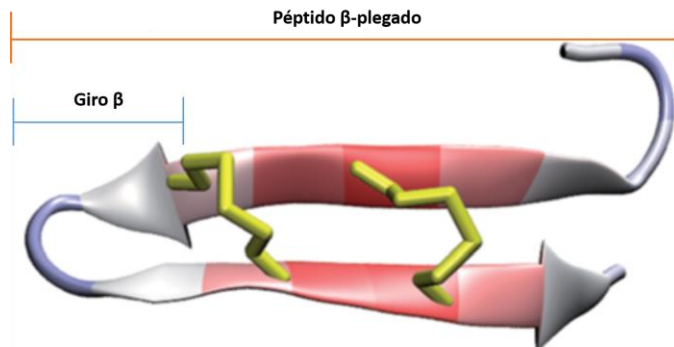


Figura 3. Estructura secundaria de un péptido beta plegado con su giro Beta y estabilizado con puentes de disulfuro entre cisteínas. [107].

A pesar de que los péptidos α -hélice presentan mayor enfoque investigativo y caracterización fisicoquímica y biológica hasta la fecha [117], los péptidos β -plegados han ido ganando importancia debido a su amplio espectro de acción antimicrobiana y su gran selectividad sobre la membrana bacteriana. En contraparte de los péptidos α -hélice de igual longitud, carga neta e hidrofobicidad, los β -plegados han demostrado una menor selectividad, es decir una reducida actividad hemolítica (tóxicos) en eritrocitos humanos manteniendo su actividad antimicrobiana [119].

Otros péptidos antimicrobianos raramente investigados, son los péptidos beta giro que representan la región bucle de los péptidos beta plegados (**figura 3**),

considerándose como los péptidos de menor tamaño, mayor estabilidad estructural para ser candidatos para el diseño de moléculas bioactivas [107].

1.5 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS)

La síntesis de péptidos en fase sólida consiste en la elongación de una cadena peptídica anclada a un soporte sólido a través de la adición sucesiva de alfa aminoácidos protegidos en sus cadenas laterales, los cuales se unen mediante un enlace amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del previamente ligado al soporte, realizándose de manera cíclica hasta que la secuencia y el largo del péptido haya sido alcanzado. La síntesis en fase sólida presenta varias ventajas: mayores rendimientos de producto, lavados de mayor eficiencia y un filtrado sencillo de los péptidos con una opción susceptible para la automatización [120; 121].

Existen dos estrategias de protección para la síntesis de péptidos en fase sólida: la estrategia *terc*-butoxicarbonil /Benzil (Boc/Bzl) [122] y la estrategia 9-fluorometoxicarbonil/*terc*-butil (Fmoc/*t*Bu) [123]. En la primera, Boc/Bzl se utiliza el grupo Boc como protector de los grupos α -amino terminal y grupos Bzl como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. En la segunda, Fmoc/*t*Bu emplea el grupo Fmoc como protector temporal del grupo α -amino terminal y grupos del tipo *t*Bu para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales [123], como se observa en la **figura 4**.

Los soportes sólidos (resinas) empleados en SPFS deben ser de tamaño uniforme, mecánicamente robustos, químicamente inertes y estables en la síntesis química, fácilmente separables y accesibles a los solventes para permitir la entrada de los reactantes. Durante el proceso de síntesis, las perlas de las resinas se solvatan (mediante el uso de solventes orgánicos como la Dimetilformilamida (DMF) y Diclorometano (DCM)), expandiendo su volumen superficial, facilitando la entrada de reactantes que interactúan con el grupo amino desprotegido del aminoácido acoplado. De esta manera se generaría un

mayor rendimiento en la síntesis hasta el acople aproximado de 50 aminoácidos por péptido.

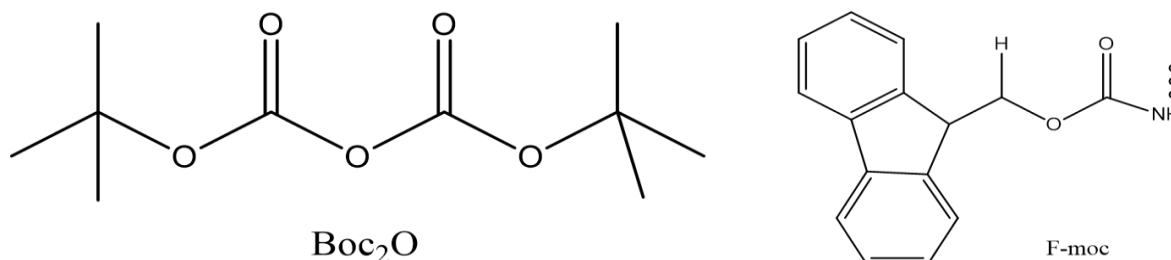


Figura 4. Grupos protectores Boc y Fmoc. [123].

Los soportes sólidos comúnmente empleados son: 4-metilbencilhidrilamina (MBHA), 4-hidroximetilfenilacetamidometil poliestireno (Pam), resinas funcionalizadas con hidroximetil usadas para *t*-Boc/Bzl y 4-(2',4'- dimetoxifenilaminofenil) fenoximetilpoliestireno (Rink) para Fmoc/*t*Bu [123]. Además, los soportes presentan una región denominada linker (espaciadora) ubicada entre las matrices poliméricas y el grupo protector de la misma, permitiendo el desanclaje final del péptido sintetizado. Por lo tanto, los linkers de las resinas Rink amida (MBHA) son susceptibles al corte o clivaje en medio ácido empleando ácido Trifluoroacético al 95% (TFA), en combinación con scavengers (reactivos captadores de carbocationes) como Triisopropilsilano (TIS) y agua tipo I, evitando la formación de productos no deseados [125].

Los agentes activadores más usados para la activación del grupo carboxilo son sales de uronio y fosfonio, siendo muy reactivas y obteniéndose altos rendimientos con alta especificidad de acople [126]. Entre estas pertenecen el 2-(1H-benzotriazol-1-il) 1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluoroborato (HBTU) y el O-(benzotriazol-1-il) N, N, N', N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU). Así mismo, en combinación se adiciona la oxyma que minimiza la racemización

debido a que acelera la reacción de condensación y la base DIEA como agente neutralizante *In situ* [127], **figura 5**.

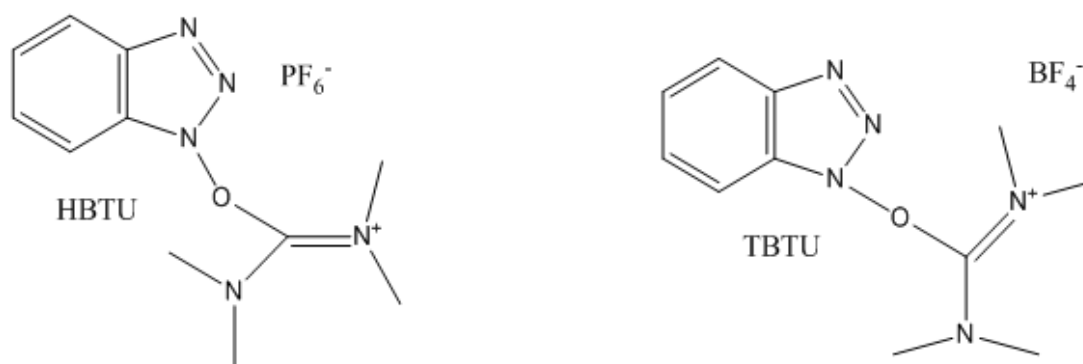


Figura 5. Estructuras de activadores de uronio (HBTU y TBTU), utilizados como agente de acoplamiento. [128].

La SPFS con estrategia Fmoc se fundamenta en dos procesos cíclicos consecutivos; la desprotección del grupo protector resina/aminoácido en medio básico y el acople por la activación del grupo carboxilo del aminoácido que interactúa con el grupo amino desprotegido; ambas fases monitoreadas por indicadores de pH reversibles como azul de bromofenol empleando la metodología de bolsita de te y/o reactor en jeringa y/o irreversibles como Ninhidrina empleando la última metodología, respectivamente [129]. Inicialmente el grupo Fmoc se retira de la resina con la adición de solvente básico, habitualmente piperidina al 25% [131]. Durante el tiempo de desprotección, se prepara la activación del grupo carboxilo del Fmoc - aminoácido con agentes activadores, facilitando el acople (enlace peptídico) entre el grupo amino desprotegido de la resina y el carboxilo reactivo del aminoácido, **figura 6**. Estos ciclos se repiten hasta obtener el péptido deseado según el número de residuos [121].

Concluida la síntesis, el péptido es clivado (escindido) de la resina en su región espaciadora y de los grupos protectores de los aminoácidos mediante hidrólisis ácida [130].

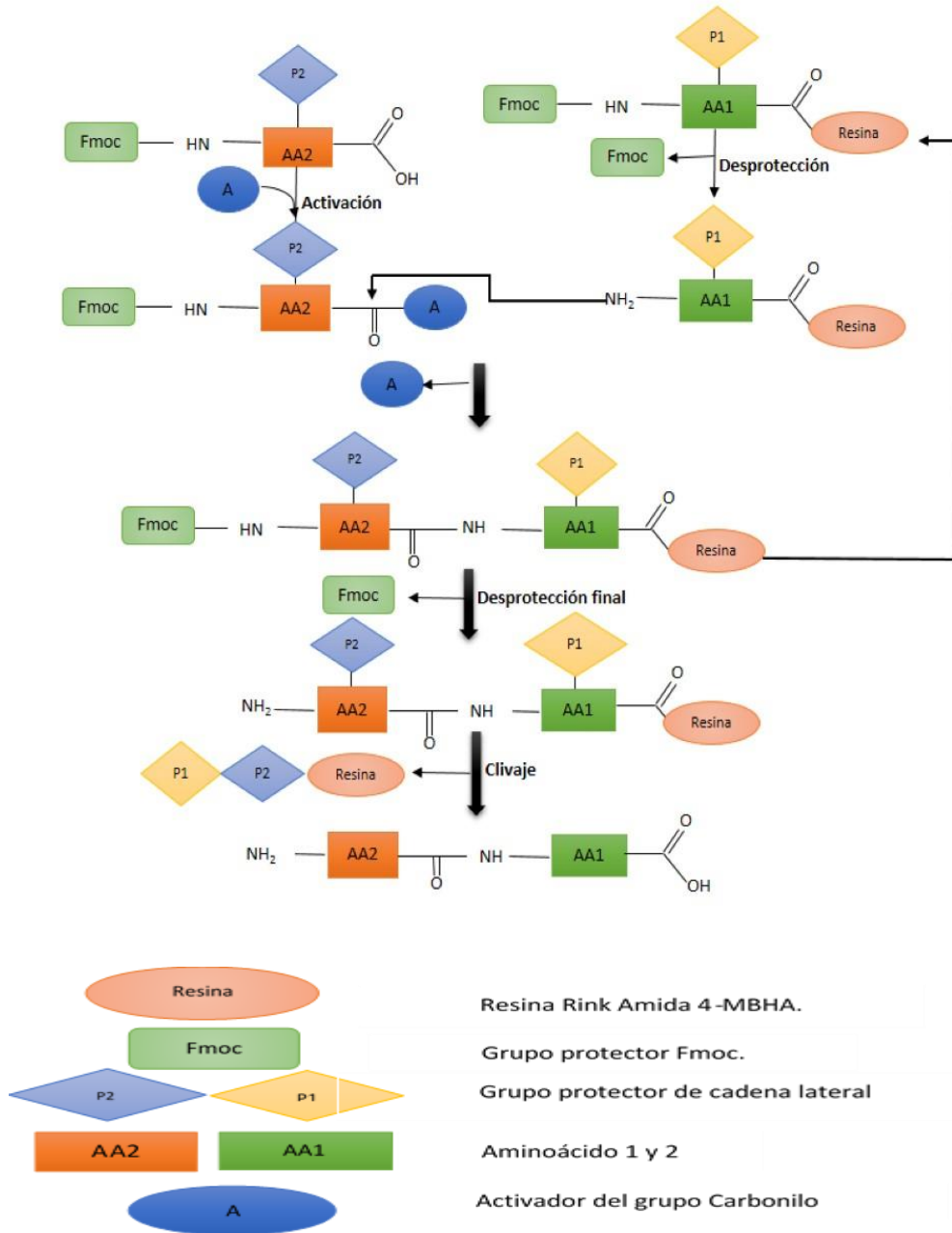


Figura 6. Esquema de la metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc. [132].

1.6 Péptidos antimicrobianos encapsulados en polímeros biodegradables

La encapsulación es el revestimiento de sustancias biológicamente activas con partículas inactivas, como polímeros biodegradables naturales y químicamente sintetizados. Los PAMs en nanovehículos biodegradables, representan una de las alternativas más llamativas para aumentar su vida media, estabilidad estructural y entrega debido a la degradación proteolítica en el organismo. De esta manera se logra ampliar la biodisponibilidad en diversas áreas corporales y la prolongada administración del péptido. Hasta la fecha, existen varias publicaciones sobre la encapsulación de PAMs con distintos nanovehículos orgánicos siendo principalmente en liposomas y en polímeros biodegradables. Algunas de las investigaciones iniciales han demostrado la encapsulación de PAMs en ácidos grasos formando lipopéptidos. Los autores demostraron la encapsulación de distintos lipopéptidos que difieren en morfología, lo que podría explicar diferencias en bioactividad, sugiriendo que la nanoestructura por si misma juega un papel importante en la actividad microbicida sobre *Neisseria gonorrhoeae* [133].

Así mismo, se ha propuesto una relación directa entre la tendencia de nanoagregación y la capacidad de desestabilización resultando en actividad microbicida para péptidos catiónicos ricos en alanina [133]. Un estudio realizado demostró la fusión de un PAM (CG₃R₆TAT) con moléculas de colesterol para promover su encapsulación y mejorar la permeabilidad de la membrana. El resultado fue comparado con un amplio espectro de antibióticos contra *SARM*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus resistente a vancomicina* y *Streptococcus haemolyticus*, además de mohos y levaduras. Las nanopartículas fueron más potentes que el péptido sin encapsular. Su eficacia *in vivo* y la no-toxicidad en modelos animal hacen que la encapsulación de PAM, sea prometedora para subsiguientes evaluaciones en otros ambientes [53; 67].

Por otra parte, un polímero aprobado por la FDA y ampliamente utilizado para la encapsulación de péptidos, es el ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA) debido a su

fácil biodegradabilidad en monómeros de ácido láctico y ácido glicérico que son metabolizados en el ciclo de Krebs (**figura 7**). Presentan liberación controlada del principio activo, y mayor biocompatibilidad debido a su reducida antigenicidad y toxicidad, en una variedad de aplicaciones tópica [135], ocular [136] y pulmonar [137], siendo el método más empleado doble emulsión con difusión de solvente (DESD) por la facilidad de la síntesis de las nanopartículas, reproducibilidad y control de su tamaño [138].



Figura 7. Estructura de ácido poli-láctico co- glicólico (x: número de unidades de ácido láctico, y: número de unidades de ácido glicólico). [139]

Existen pocos estudios sobre PAMs encapsulados en PLGA enfocados en su actividad antimicrobiana y su toxicidad en glóbulos rojos de mamíferos. La mayoría de investigaciones están direccionadas hacia la encapsulación de PAMs en ensayos para estandarización de su encapsulación, análisis de sus propiedades fisicoquímicas y algunos para ensayos inmunológicos y citotóxicos como se puede detallar a continuación, en la **tabla 3**; donde se resumen algunas investigaciones de encapsulación de PAMs en distintos vehículos biodegradables.

Tabla 3. Ejemplos de estudios realizados sobre encapsulación de PAMs en nanovehículos

PAM	Polímero	Tamaño (nm) / ζ^* (mV)	EE ** (%)	Parámetro biológico	Referencia
Plectasina	PLGA (75:25)	227.1±6.1 / -45.0 ± 2.2	90.1	Baja citotoxicidad en línea celular Calu-3	[140]
Péptido M3 Péptido M7	PLGA (50:50)	235.2 /10.5 266.3/7.68	34 25.8	La encapsulación de los péptidos aumento su actividad antibacteriana 2 a 3 veces respecto a los péptidos libres	[141]
Catelicidina	PLGA (75:25)	1460±14.02 / ND	88.50	Baja toxicidad en hematíes de cobayo. Inhibición eficiente por liberación prolongada contra <i>E. coli</i>	[142]
LL-37	PLGA (50:50)	304.5±10.0 / -21±2.5	70.2	Mejora la angiogénesis en ratón Rj. Han	[143]
LA6	PLGA (50:50)	227.4/ 7.98	31.7	Aumenta la actividad antibacteriana	[132]
Lactoferrina bovina	Nanovesículas lipídicas	(100 a 200) / -20	ND	No hubo diferencias significativas entre la actividad antibiótica del péptido libre y encapsulado	[144]
Nisina	Nanopartículas solidas lipídicas	159±6.4 – 167.±8.6 / -28.3±0.1 a 29.2 ± 0.1	73.6	La encapsulación de lisina prolonga la actividad antibacteriana hasta 20 días.	[145]
IG-25	Liposoma polimerizado con alquinil	254 nm / ND	ND	Baja toxicidad en línea celular SV40-HCEC. Inhibición eficiente contra <i>P. aureginosa</i>	[146]
Leucinostatina A	PLGA (85:15)	201±14 / ND	24.6	Nps reducen la infección in vivo en hígado de ratón contra <i>Candida albicans</i>	[147]

* Potencial Zeta

** Eficiencia de Encapsulación

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Sintetizar péptidos con posible estructura β -plegada nanoencapsulados en polímero biodegradable de PLGA con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Escherichia coli* O157:H7

2.2 Objetivo específicos

- Diseñar *in silico* péptidos análogos con una predicción del potencial antibacteriano superior al 95%.
- Sintetizar los péptidos en fase sólida mediante la estrategia Fmoc.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas (carga, tamaño, estructura secundaria) de los péptidos libres y encapsulados.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos libres y encapsulados frente a SARM y EC O157:H7
- Evaluar actividad hemolítica de los péptidos libres y encapsulados.

3 Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Cepas resistentes a antibióticos

Las cepas de *SARM* con resistencia antibiótica a penicilina, oxacilina y ofloxacina, y las cepas de *EC O157:H7* que son resistentes a los antibióticos tetraciclina, cefalotina fueron adquiridas del cepario de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, ambas cepas de aislados clínicos.

3.1.2 Cultivos

Los glóbulos rojos de carnero desfibrinado y su Medio Esencial Mínimo (MEM) fueron adquiridos comercialmente en Oxoid.

3.1.1 Reactivos

Los diferentes L- aminoácidos Fmoc- α -protegidos fueron adquiridos en *Iris Biotech GmbH*; como soporte polimérico se empleó resina Rink amida 4 – metilbencilhidrilamina (MBHA) adquirida en Merck Novabiochem. Los disolventes grado analítico para la síntesis de péptidos como piperidina, DIEA, dimetilformiamida (DMF), diclorometano (DCM), isopropanol y para su purificación con acetonitrilo fueron comprados en *Merck*. El ácido poli láctico-coglicólico (PLGA 50:50, PM 38000 - 54000 Da), el poloxámero 407 y la polietilenimina (50% v/v en solución acuosa, PM 2000) fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

Se usó agua MilliQ con una resistividad de 18.3 M Ω para la preparación de todas las soluciones.

3.1.2 Software y recursos online

Para análisis estadísticos de datos se empleó el software *SPSS v22*, cuya licencia fue adquirida por el autor de la propuesta. Para el alineamiento múltiple se ejecutó *Clustal omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para la visualización de la posible estructura de los péptidos se realizco con *Pep fold 1.5* (<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=PEP-FOLD#forms::PEP-FOLD>). Para la búsqueda y comparación de secuencias

peptídicas se emplearon las siguientes bases de datos: *Antimicrobial Peptide Database*; *APD* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) y *Collection of Antimicrobial Peptides*; *CAMP* (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>).

3.2 Métodos

En la **figura 8**, se presenta el diagrama de flujo del procedimiento que se utilizó para cubrir el alcance de los objetivos.

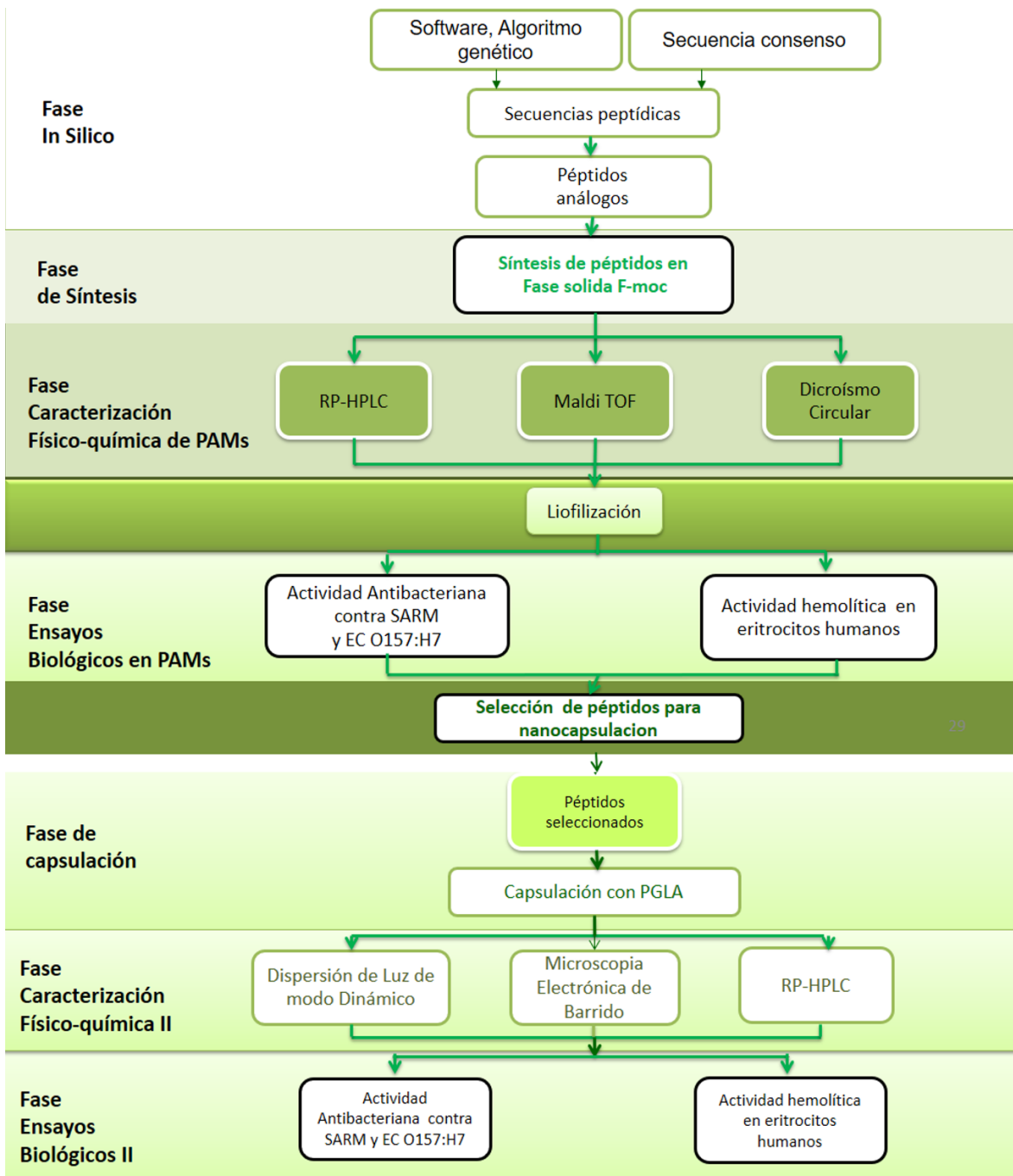


Figura 8. Esquema general de la metodología

3.2.1 Fase *in silico*

3.2.1.1 Diseño de secuencias peptídicas moldes

Una de las secuencias molde de los péptidos, fue diseñada *in silico* mediante algoritmo genético DEPRAMS, que permite la búsqueda y predicción de secuencias con posible potencial antimicrobiano. El algoritmo forma parte del trabajo de investigación de nuestro grupo [148]. *Los descriptores* que se utilizaron para la búsqueda y selección de las secuencias peptídicas fueron los siguientes: longitud de péptido corto (14), tamaño de la población, número de generaciones, porcentaje de cruzamiento, porcentaje de mutación, porcentaje de reemplazo de individuos en cada generación y la diversidad genotípica. Como resultado se obtuvo la primera secuencia molde del péptido denominado B1. El diseño del péptido molde B1 presumiblemente correspondería con péptido Beta plegado y su secuencia carecía de residuos de cisteína.

Por otra parte, la segunda secuencia molde denominada C1 se obtuvo a partir del alineamiento local de las cuatro clases de protegrina 1, 2, 3 y 4; El péptido C1 contiene cuatro residuos conservados de cisteína y por su naturaleza presentaba estructura beta plegada [31; 92]. La posterior modificación sistemática de residuos no conservados siguiendo los parámetros de sustitución permitieron la obtención de péptidos análogos como se describe más adelante.

La exclusividad del origen y diseño de las secuencias aminoacídicas de ambos péptidos moldes (B1 y C1) se verificó mediante la búsqueda de datos de las bases CAMP y APD.

Posteriormente, se calcularon los valores teóricos de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos moldes (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/featcalc>) y se hizo la predicción de actividad antimicrobiana superior al 95%; aplicando el algoritmo de máquina de soporte vectorial (SVM) (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>) y se visualizó su estructura secundaria *in*

sílicico en Pepfold v1.5, seleccionando solamente los péptidos que exhibieran estructura beta plegada.

3.2.1.2 Obtención de secuencias análogas

A partir de las secuencias molde B1 y C1, se buscaron secuencias peptídicas homólogas, mediante el empleo de las bases de datos BLASTP de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) y/o BLAST de la CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/ncbiBlast/index.php>). De esta manera las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo *Clustal Omega* [149].

Para el diseño de los péptidos análogos, se adoptaron los siguientes criterios: (i) sustitución de aminoácidos conservados, de características similares y poco conservados, con respecto a su clasificación bioquímica; y (ii) sustitución de triptófano (W) y arginina (R) en aminoácidos apolares / polares respectivamente [35; 36]; el propósito fue incrementar la actividad antibacteriana. De esta manera se obtuvieron las secuencias análogas denominadas B2 (sin cisteína en su secuencia) y C2 (que contiene cuatro cisteínas), las cuales fueron evaluadas desde su exclusividad aminoacídica y su estructura plegada *in sílicico* de la misma forma en que se evaluaron los péptidos molde.

3.3 Fase de síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados mediante síntesis química en Fase sólida, empleando la estrategia de síntesis simultánea Fmoc en bolsitas de té de polipropileno soportados en una resina Rink amida MBHA con 40 mg (capacidad: 0.59 mmol/gramo) [150]. Los aminoácidos correspondientes a las secuencias previamente diseñadas fueron acoplados con dos activaciones consecutivas, iniciando con HBTU 2-(1H-benzotriazol-1-il) 1, 1, 3,3-tetrametiluronio hexafluoroborato (HBTU) y después con TBTU, ambos en combinación de un amortiguador de pH *in situ* DEIA y Etil-2-ciano-2-(hidroximino) acetato (Oxyma) como agente antiracémico disueltos en DMF (10 equivalentes de aminoácido /

HBTU / TBTU / DIEA) en agitación durante dos horas. La desprotección del grupo 9 – Flourenilmetiloxicarbonil (Fmoc) de los aminoácidos se realizó con piperidina al 20 % en DMF. La determinación de grupos aminos libres (desprotegidos) y enlace péptido (acoplados) se realizó cualitativamente mediante azul de bromofenol (1% en DMF). Los lavados se realizaron después de desprotección y acople con dimetilformamida (DMF), alcohol isopropilico (IPA) y en la última etapa con diclorometano (DCM).

Finalizada la síntesis, los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y la matriz de la resina se removieron con una solución de clivaje del ácido trifluoracético / Triisopropilsilano (TFA / TIS) / H₂O ultrapura / ácido 1,4,7,10 - tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) en proporción de (92.5:2.5:2.5:2.5), con agitación rotaria durante a 110 rpm en agitador IKA KS 501. Los péptidos se lavaron 3 veces con 5ml de éter frío (-70°C) por centrifugación a 3500 rpm, para retirar la solución de clivaje y obteniendo la precipitación por cada péptido. El excedente de éter se evaporó a temperatura ambiente en cámara de gases.

3.3.1 Obtención de péptidos C1 y C2 oxidados

Inicialmente 20 mg de cada péptido C1 y C2 (los cuales contienen cuatro cisteínas en su secuencia), fueron previamente reducidos usando β-mercaptoetanol al 10% en agua ultrapura a 100°C en baño seco durante 5 minutos, cuya mezcla fue rotoevaporada y disuelta en ácido acético 50% P/V. Posteriormente, cada péptido fue disuelto en 110 ml de buffer de oxidación (2mM Guanidina-HCL, 10 % Isopropanol, 5% de dimetilsulfoxido DMSO) a pH 5.8 y en agitación orbital de 110 rpm, al aire libre durante 20 horas a temperatura ambiente. Una vez concluida la agitación, se ajustó el pH del buffer de oxidación a 2.5, con el fin de evitar la aglomeración de los péptidos catiónicos. Posteriormente, se purificaron los péptidos oxidados usando la técnica de microextracción en fase sólida (el cual se detalla más adelante). Finalmente se confirmó la oxidación de los péptidos en

comparación con los no oxidados mediante las técnicas de RP-HPLC, ES-ESI y dicroísmo circular, que se detallarán más adelante. Los péptidos no oxidados y oxidados se denominaron C1NOX, C1OX, C2NOX, C2OX. [151].

En resumen, se sintetizaron los péptidos aparentemente beta plegados molde, denominados B1 (modelado con base en DEPRAMS, que no contienen cisteína) y C1 (producto de la alineación del péptido natural protegrina que contiene cuatro cisteínas). Posteriormente se obtuvieron las secuencias análogas B2 y C2. Adicionalmente, se modificaron los péptidos C1 y C2 para la obtención de los péptidos no oxidados y oxidados que se denominaron C1NOX, C1OX, C2NOX, C2OX.

3.4 Fase de caracterización I. Aspectos Físicoquímicos de los péptidos

3.4.1 Caracterización de pureza y masas de los PAM

Los análisis de la pureza y la cuantificación de la masa molar de los péptidos se realizaron en los laboratorios de la Escuela de Química y sede Guatiguará de la UIS, así como en el laboratorio de péptidos del Núcleo Biotecnología de Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV), Chile.

3.4.2 Purificación y análisis de la pureza de los péptidos por Cromatografía Líquida De Alta Eficiencia En Fase Reversa RP-HPLC

Los péptidos fueron purificados en una columna X Bride BEH 130 (C18) empleando una fase móvil equilibrada por: (A) H₂O conteniendo 0.01% de ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) y 0.01% TFA. Se utilizó un gradiente desde 0-100% de ACN en un tiempo de 20 minutos, ajustando a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se inyectaron 20 µl de cada péptido (1µg/ml) y con detección UV a 220 nm utilizando detector fotométrico de arreglo de diodos (PDA). Los cromatogramas obtenidos permitieron analizar el grado de pureza de cada uno de los péptidos sintetizados [152; 153; 131].

3.4.3 Análisis de las estructuras primarias de los péptidos B1 y B2 por Espectrometría de masas de Ionización por Electronebulización (MS-ESI)

Las masas moleculares de los péptidos B1 y B2 fueron obtenidas empleando el equipo LCMS-2020 con analizador cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo líquido. Se inyectó un volumen de 20 µl para cada péptido (1ug/µL + 90 µL Agua MQ) y fueron ionizados por fuente dual DUIS, obteniéndose sus respectivos iones teóricos en el espectro de masas [121; 131]. El cálculo de los iones teóricos se referencia en la ecuación (1) [121]. Los péptidos obtenidos se congelaron a -20°C para su posterior liofilización y posterior uso.

$$\text{Iones teóricos} = \frac{\text{Masa del peptido (g/mol)} + \# \text{ ion(es) protonado(s)}}{\# \text{ Ion(es) protonados}} \quad (1)$$

3.4.4 Análisis de la estructura primaria de los péptidos mediante Espectrometría de Masas de Desorción e ionización por láser asistida a una matriz en Tiempo De Vuelo (MS MALDI-TOF)

Se registraron los espectros de masas de los péptidos C1 y C2 los cuales fueron obtenidos empleando el espectrofotómetro MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) Daltonics en el laboratorio de espectrofotometría del Parque Tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando el modo de desorción/ionización laser asistida por una matriz de (MALDI) con detector de tiempo de vuelo (TOF) en modo reflectrón. La matriz fue preparada con una solución saturada de 1mg/ml de Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHA) en una mezcla de ACN: H₂O (50:50) y 0.01% TFA. Se añadió 1 µl de la muestra de solución de péptido y sobre esta se añadió 1 µl de solución de matriz; cada una sobre el spot de la placa para posteriormente ser secada a temperatura ambiente en cabina de extracción [154].

3.4.5 Micro extracción en fase sólida

Se realizó en péptidos cuya pureza no fuera superior al 95% y/o para purificar péptidos oxidados. Por lo tanto, los péptidos se purificaron en micro columna LiChrolut RP Sep-Pak C18 activada con metanol y lavada con agua ultrapura. Posteriormente, los péptidos fueron eluidos en gradientes de 0, 10, 20, 30, 60, 100 % de ACN usando un flujo de 1ml/min por manifold, filtrando cada muestra por duplicado tal como se describió anteriormente.

Los péptidos purificados en agua se congelaron para su posterior liofilización; en contraste, los péptidos obtenidos en gradientes superiores al 10% de ACN fueron rotoevaporados en Speedvac y alicuotados con agua ultra pura para su posterior liofilización.

3.4.6 Análisis de la estructura secundaria mediante Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular fue llevado a cabo en un espectro polarímetro Jasco J815 acoplado a sistema de control temperatura Peltier Jasco CDF-426S/15. Las mediciones se realizaron a 15°C, utilizando un rango de longitud de onda entre los 190 a 250 nm, con paso óptico de la celda de cuarzo de un 1mm de ancho, previamente lavada con nitrógeno. Cada espectro fue registrado como promedio de cuatro escaneadas tomados a velocidad de 20nm/min y respuesta de un segundo. El perfil del DC para los péptidos, se estabilizó con 35µL de cada péptido (2mg/ml) en una solución acuosa de 2, 2, 2 - trifluoroetanol (TFE) al 30% en agua, hasta completar un volumen final de 250µL [153; 155]. Los espectros fueron visualizados por software del equipo Spectra manager II y, además, los resultados obtenidos fueron expresados en grados de elipticidad molar (θ); de acuerdo con la ecuación 2:

$$(\theta) = \frac{\theta_{\lambda}}{100 * l * c * n} (\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}) \quad (2)$$

Donde:

l = la longitud del camino óptico (cm)

c = concentración del péptido (mg/mL)

n = número de residuos de aminoácidos en la secuencia.

3.5 Fase de caracterización I. Actividad biológica de los péptidos libres

3.5.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los PAMs frente a EC O157:H7 y SARM

Se evaluaron las actividades antibacterianas de los PAMs frente a las cepas de estudio (EC O157:H7 y SARM) mediante el método de microdilución en caldo en microplaca de ELISA de 96 pozos, protocolo referenciado por varios investigadores y estandarizado en nuestro laboratorio [155; 156; 157; 159; 141].

Inicialmente se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 y SARM en caldos de Luria-Bertani (LB) y Müller Hinton (MH) respectivamente. Los preinóculos se incubaron durante 12 horas a 37°C en agitación mecánica de 200 rpm, hasta obtener una densidad bacteriana de aproximada de 5×10^8 unidades formadoras de colonia /mL (UFC/mL). Una vez incubado, el preinóculo es diluido en su respectivo caldo estéril hasta obtener una densidad bacteriana de 1.5×10^8 UFC/ml correspondiente a 0.08 – 0.1 de la escala de McFarland, suspensión que fue denominada inóculo. La cinética de crecimiento bacteriano se realizó adicionando 100 μ l de inóculo con 100 μ L de diluciones de diferentes concentraciones (0.5, 5, 10, 25, 75, 100) μ M del PAM en los pozos correspondientes en la microplaca, incubando a 37°C durante 8 horas en agitación mecánica de 200 rpm. La medida de la concentración bacteriana fue monitoreada cada hora mediante espectrofotometría en lector de placas de ELISA (Bio-Rad imark), realizando lecturas por hora a una longitud de onda de 595 nm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la mínima concentración de péptido capaz de

inhibir el crecimiento bacteriano, referenciando valores de CMI₉₉, CMI₉₀ y CMI₅₀, que corresponden a los títulos que inhibían el 99, 90 y 50 % respectivamente (Anexo I).

Si la inhibición era superior al CMI₉₀, se alícuotan 100 µl a partir de los pozos correspondientes con 900 µl de caldo estéril de BH en tubo eppendorf, incubándose a condiciones de 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se tomaron 10 µl de cada tubo y se sembraron en superficie de placas de agar BHI que se incubaban en las condiciones anteriores. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se definió como la concentración mínima de péptido capaz de inhibir el 99.9% de crecimiento bacteriano en comparación con el control de control de crecimiento (bacteria con medio). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.2 Ensayo de Toxicidad de los PAMs

Los ensayos de toxicidad de los PAMs en células de mamífero se realizaron mediante la evaluación de su actividad hemolítica en glóbulos rojos de carnero. Se centrifugó 1 ml de sangre desfibrinada (500 g durante 5 min a 4°C) e inmediatamente se realizaron tres lavados seriados empleando 3ml buffer 1mM de Buffer fosfato salino (BFS) a pH 7.4. Posteriormente se ajustó su densidad celular aproximadamente el 4% de la población (2×10^7 células/ml) mediante conteo celular en cámara de Neubauer. Alícuotas de 100µL de esta suspensión fueron transferidas a tubos eppendorf e incubadas con diluciones de diferente rango de concentración (10,25, 50, 75) µM del PAM durante una hora a 37°C. Posteriormente, los eritrocitos fueron precipitados por centrifugación (500 g durante 5min a 4°C) y alícuotas de 100ul del sobrenadante fueron transferidas a una placa de Elisa para medir la hemoglobina liberada a 550 nm en un lector de ELISA BIO-RAD imark, siendo (Abs muestra). Se emplearon controles de hemolisis al 100% adicionando detergente Tritón 20% (Abs Control de hemolisis) y control de viabilidad con PBS solamente (Abs Control Viabilidad), realizando cada

ensayo por triplicado [160; 161; 162]. El porcentaje de la concentración hemolítica se expresó en la ecuación (3) como:

$$\%CH = \frac{Abs\ muestra - Abs\ Control\ viabilidad}{Abs\ Control\ viabilidad - Abs\ Control\ Hemolisis} * 100 \quad (3)$$

3.6 Fase de encapsulación de los PAMs

El péptido que presentó la mejor bioactividad, es decir con el menor valor de CMI en ambas cepas de estudio, y con un porcentaje reducido de hemólisis de membrana mamífera a una elevada concentración de péptido, fue seleccionado como candidato para su encapsulación en polímero biodegradable.

3.6.1 Síntesis de nanopartículas de PLGA-PAM

La síntesis de nanopartículas de PLGA-PAM se realizó mediante la metodología doble emulsión/ difusión de solvente (DESD), de acuerdo con lo publicado por Cohen-Sela y col., 2009 [163]. Se empleó acetato de etilo como fase orgánica, solución tampón de fosfato de potasio (1mM a pH: 7.4) como fase acuosa, poloxamero 407 como agente surfactante (1mg/mL), ácido poli- láctico co- glicólico (PLGA, 50:50 de monómeros, PM: 38000-54000) como agente encapsulante y Polietilenimina (PEI) como agente catiónico a 0.004% (P/V); con el objetivo de mejorar la actividad antibacteriana al interactuar con las membranas citoplasmáticas de cargadas negativamente debido a su composición bioquímica de fosfolípidos ácidos [164].

Inicialmente, se realizó una primera emulsión mezclando 1mL de solución tampón fosfato 1 mM a una concentración del péptido de 1mg/mL con 4 mL de una solución de PLGA y acetato de etilo (2.5 mg/mL). Esta mezcla se agitó a 20.000 rpm en un Ultra-Turrax (IKA T18 Basic) durante 32 segundos en vidrio de homogeneizador. Posteriormente, se adicionaron 10ml de Poloxamer 407 a la primera emulsión durante la agitación constante del Ultra Turrax, en las mismas

condiciones anteriormente mencionadas, hasta formar la segunda emulsión, como se detalla en la **figura 9**.

La suspensión de partículas obtenida fue roto-evaporada para remover el acetato de etilo a 40 atm, 25°C y 50 rpm. A continuación, se adicionó polietilenimina (PEI) a una concentración de 0.004% (P/V) ajustando el pH a 6.8. Finalmente, las Nps fueron purificadas y lavadas para eliminar los reactivos en exceso de la síntesis, las cuales fueron caracterizadas por DLS y STEM.

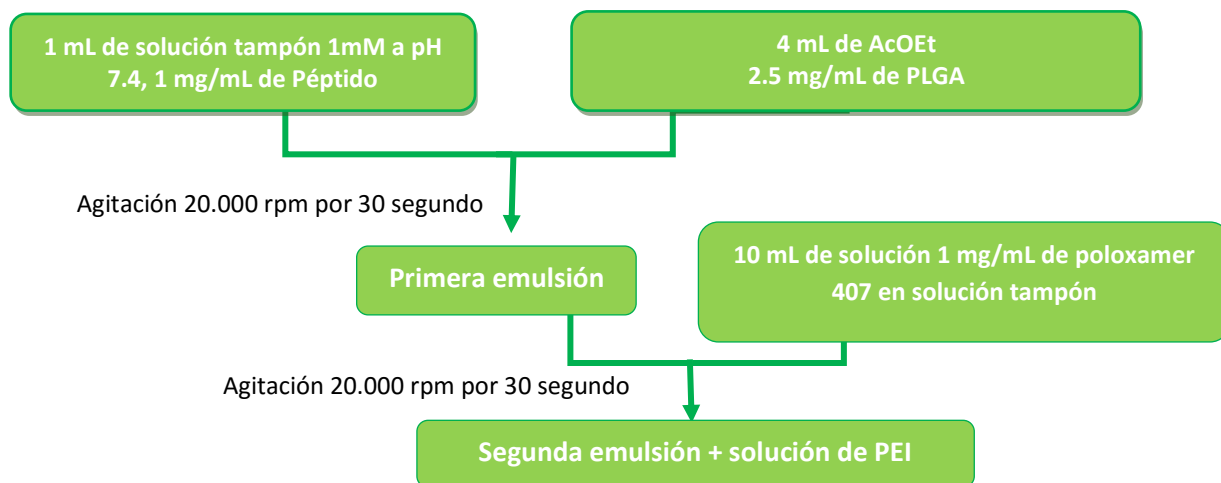


Figura 9. Esquema general de la síntesis de Nanopartículas de PLGA-B2 utilizando la metodología de doble emulsión/ difusión de solvente

3.7 Fase de caracterización II. Aspectos fisicoquímica de las nanopartículas de PLGA-PAM

3.7.1 Tamaño hidrodinámico y Potencial Zeta (ζ) de las nanopartículas

Las nanopartículas de PLGA-péptido fueron caracterizadas mediante Dispersión de Luz en Modo Dinámico (DLS) para determinar el tamaño hidrodinámico y carga superficial en un equipo NanoZetasizer-90 (Malvern, USA) del Laboratorio de

Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander. Se depositaron 600 μL de la solución de Nps PLGA-péptido de una concentración de 1mg/mL en una celda plástica de volumen reducido con el equipo en modo tamaño, el cual opera con un ángulo de incidencia de luz de 90°C. Para la determinación de la carga superficial el equipo se ejecutó en modo Zeta, donde una dilución de 1/10 de la muestra se depositó en una celda capilar plástica DST 1060 con electrodo de oro a una concentración de 0.2 mg/mL de suspensión de nanopartículas, donde opera con un potencial de 148 V. Todas las muestras se realizaron por triplicado a pH: 6.8 y temperatura ambiente. Los histogramas de tamaño hidrodinámico y potencial zeta fueron obtenidos por Zetasizer software [165; 166; 167].

3.7.2 Morfología y tamaño de las nanopartículas por FE-STEM

Para caracterizar la morfología y el tamaño de las Nps PLGA-péptido se depositaron 5 μL de la muestra en un *grid* con recubrimiento de oro (100-400 Mesh) para ser analizados por Microscopía electrónica de Barrido con cañón de emisión de campo en modo transmisión (FE-STEM, QUANTA FEG 650), que se encuentra en el Parque tecnológico de Guatimar de la Universidad Industrial de Santander. Este funciona con un dispositivo (filamento, 30KV) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con un detector de electrones secundarios, donde se recolectan los electrones generados de la interacción con la superficie de la muestra, con el fin de generar una imagen que refleja las características superficiales de la misma, proporcionando información sobre la forma y textura.

3.7.3 Cuantificación del péptido cargado en Nps de PLGA utilizando cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)

Para la cuantificación del péptido encapsulado en las nanopartículas de PLGA, se centrifugaron 800 μL de la suspensión utilizando 14000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue removido y posteriormente se adicionaron 350 μL de acetonitrilo al precipitado para disolver el polímero PLGA. Después se añadió la misma

cantidad de agua para disolver el péptido hidrofílico y precipitar el polímero. La suspensión fue agitada, centrifugada otra vez, y se usaron 700 μL del sobrenadante (que contiene el péptido) para ser analizados mediante RP-HPLC, en las mismas condiciones de corrida usadas para el péptido libre [168]. Para la elaboración de la curva de calibración del péptido libre se usaron patrones en rangos de concentración de 0 a 500 ppm.

El sistema cromatográfico fue equilibrado utilizando dos soluciones: (A) H_2O con 0.01% ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con 0.01% TFA. Para la corrida de las muestras se utilizó una mezcla 70 % B y 30% de A durante 20 min. El volumen de inyección utilizado fue de 20 μL y la detección ultravioleta (UV) se realizó a 220 nm en una columna C-18 [169].

La eficiencia de encapsulación (%EE) y péptido cargado (PC) en el sistema nanométrico de PLGA fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones (4) – (5), respectivamente [168; 170].

$$\%EE = \frac{\text{masa de péptido efectivo en el sistema de PLGA} - \text{Peptido (mg)}}{\text{masa de péptido inicial en el sistema de PLGA} - \text{Peptido (mg)}} * 100 \quad (4)$$

$$PC = \frac{\text{cantidad de péptido encapsulado (mg)}}{\text{cantidad total de polímero (mg)}} \quad (5)$$

3.8 Fase de actividad biológica del péptido encapsulado

3.8.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los Nps PLGA-péptido frente a EC O157:H7 y SARM

Se calculó la CMI de las nanopartículas de PLGA-péptido frente a las cepas de estudio mediante el método de microdilución en caldo descrito en 3.5.1. Se definió CMI como la concentración menor de péptido encapsulado en PLGA que inhibió el crecimiento bacteriano. En este caso, se transfieren 100 μL de péptido encapsulado en nanopartículas de PLGA en diluciones seriadas de 0.5, 5, 10, 25,

50,100 μM a 100 μl de suspensión bacteriana, referenciado valores de CMI_{50} , CMI_{90} y CMI_{99} . Así mismo, se calculó la CMB la cual fue definida como la concentración mínima de péptido encapsulado en nanopartículas de PLGA que inhibe el 100% crecimiento en medio sólido en contraste al control de crecimiento, como se describió anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. [171]

3.8.2 Ensayo de Toxicidad de PAM encapsulado en nanopartículas de PLGA

Se repitió el ensayo de hemólisis en glóbulos de rojos de carnero empleando disoluciones seriadas de PLGA-péptido (10, 25, 50, 75) μM v referenciando en el apartado 3.5.2. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.8.3 Cálculo del índice terapéutico de los PAM libres y encapsulado

Se determinó el índice terapéutico de los péptidos libres y nanoencapsulado en polímero de PLGA respectivamente mediante la ecuación 6 [172].

$$\text{IT} = \frac{\text{Concentracion hemolitica del peptido 10\% (uM)}}{\text{Concentracion minina inhibitoria 50\% (uM)}} \quad (6)$$

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase *in Silico*

4.1.1 Obtención de secuencias molde

Se obtuvieron dos primeras secuencias de posible péptido Beta plegado, que se denominaron B1 y C1, respectivamente. La primera secuencia molde fue obtenida mediante DEPRAMS (B1), aplicando los parámetros sugeridos para ejecución de los descriptores del programa con predicción *in silico* para la obtención de un péptido beta plegado sin residuos de cisteína.

La segunda secuencia molde (C1) fue basada en el PAM de protegrina porcina-1, PAM de 18 residuos, que incluye cuatro residuos de cisteína de acuerdo con la caracterización previa (estructura beta plegada y alta actividad antibacteriana). La secuencia molde C1 se diseñó utilizando la secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento local de secuencias de identidad superior al 90% encontrada mediante BLASTP. La secuencia C1 sufrió modificaciones sistemáticas: sustitución de un aminoácido catiónico por otro de similar propiedad antimicrobiana 4R→K (y) la sustitución de un aminoácido aromático por otro con mejor actividad antimicrobiana 12F→W, como se detalla en la **figura 10**. Se verificó que las secuencias moldes B1 y C1, no aparecían en las bases de datos, con lo cual se confirmaron la exclusividad y originalidad de los diseños.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PROTEGRINA-4      RGGRLCYCRGWICFCVGR
PROTEGRINA-2      RGGRLCYCRRRFCICV--
PROTEGRINA-5      RGGRLCYCRPRFCVCG-
PROTEGRINA-1      RGGRLCYCRRRFCVCGR
PROTEGRINA-3      RGGRLCYCRRRFCVCGR
                   ***  *****  :*  **
CONSENSO (C1)     RGGKLCYCRRRWCVCVGR
  
```

Convenciones: (*) Representa aminoácido conservado. (.) Sustitución no conservada (aa con distintas propiedades). (:.) Sustitución conservada (aa con mismas propiedades). Aa en azul, modificaciones sistemáticas sin alterar su estructura y predicción de actividad antimicrobiana superior al 95% *in silico* (Deslouches y col., 2013).

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de identidad de Protegrina -1 para la obtención de la secuencia consenso con sus modificaciones sistemáticas.

4.1.2 Obtención de secuencias análogas

Se sintetizaron dos secuencias análogas B2 y C2 a partir de las secuencias molde B1 y C1. La secuencia B2 se diseñó a partir del alineamiento local con otras secuencias de identidad superior al 85% en BLAST de CAMP, relacionando la secuencia molde y la análoga a otros PAMs como Lantibiótico salivaricina A de *Streptococcus salivarius* y péptido HP1035, toxina del escorpión asiático forestal *Heterometrus petersii*. B2 fue modificado de manera sistemática en 6R→K para comparar su actividad antibacteriana con la de B1 *in vitro*, detallado en la **figura 11**.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Lantibiotic  -----KRGSGWIATI'
B1           --IIWGKRGLGWIKK-
Peptide      LKSIFGKRGLQDLMDI
                   ***      :
B2           IIWGKKGLGWIKK
  
```

Convenciones: (*) Representa aminoácido conservado. (.) Sustitución no conservada (aa con distintas características). (:.) Sustitución conservada (aa con distintas características). Aa en azul, modificaciones sistemáticas sin alterar su estructura y predicción de actividad antimicrobiana superior al 95% *in silico* (Deslouches y col., 2013).

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de identidad de B1 para la obtención de la secuencia análoga B2 con sus modificaciones sistemáticas.

La secuencia análoga C2 se obtuvo haciendo la modificación sistemática del péptido C1, aumentando su hidrofobicidad con Triptófano (W) para mejorar su actividad antimicrobiana 5L→W y delección de 14R para obtención de su estructura secundaria *in silico*, resultando en una disminución de su carga neta de +6 a +5. (Ver **figura 12**). Los números de acceso del GenBank y Uniprot de las secuencias de identidad alineadas se encuentran documentados en el Anexo D.



Convenciones: (*) Representa aminoácido conservado. (.) Sustitución no conservada (aa con distintas características). (:.) Sustitución conservada (aa con distintas características). **Aa en azul**, modificaciones sistemáticas sin alterar su estructura y predicción de actividad antimicrobiana superior al 95% *in silico* (Deslouches y col., 2013).

Figura 12. Modificación sistemática de la secuencia C1 para la obtención de la secuencia análoga C2

Mediante el uso de las herramientas bioinformáticas de CAMP se calcularon las siguientes propiedades fisicoquímicas: longitud, peso molecular (PM: g/mol), carga neta a pH 7, porcentaje de hidrofobicidad y probabilidad de presentar actividad antimicrobiana de PAMs, cuyos resultados están resumido en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades Teóricas Fisicoquímicas de los PAMs diseñados

Péptido	Numero de residuos (aa)	PM (g/mol)	Q**	μ H (%)	PAM (%)	Volumen A ³
B1	13	1554.95	+4	46	99	1882
B2	13	1526.91	+4	46	100	1882
C1	18	2171.66 / 2167.64*	+6	44	99	2628
C2	18	2088.50 / 2084.51*	+5	47	100	2528

PM: peso molecular, **Q:** Carga, **μ H:** Hidrofobicidad, **PAM:** Probabilidad de actividad antimicrobiana, **A:** Unidades Armstrong, * Masas moleculares de péptido sin oxidar y oxidado.

Con base en los datos calculados de la **tabla 4**, las secuencias B1/ B2 y C1/C2, presentaron las siguientes características: Porcentaje de probabilidad de ser un PAM mayor del 95%, carga catiónica entre +4 a +6. La propiedad de carga positiva les confiere a los PAMs una interacción electrostática con los fosfolípidos acidicos de la membrana bacteriana cargada negativamente y por lo tanto, mejora la selectividad antimicrobiana en relación con las células de mamífero [173].

La predicción y visualización de la estructura secundaria de los péptidos molde y de sus análogos se realizó en PEP FOLD, obteniéndose estructuras de péptido β -plegado como se detalla en la **figura 13**.

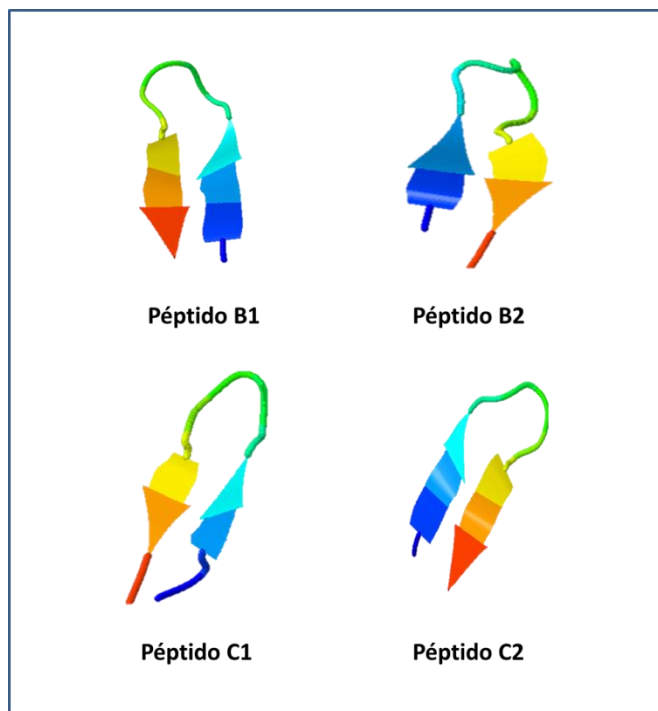


Figura 13. Estructuras secundarias de los péptidos B y C *in silico*

4.2 Fase de caracterización I: Caracterización fisicoquímica de los PAMs

4.2.1 Caracterización de pureza y masas de los PAMs

La purificación y análisis de la pureza de los péptidos B y C se hizo mediante RP-HPLC. Los péptidos sintetizados fueron purificados en columnas Sep-Pak C18 utilizando un gradiente ACN:H₂O en proporción de 10 y 20%, respectivamente. La señal principal del espectro de masas (ion molecular) y una pureza superior al 95%, se interpretó como ausencia de deleciones. Los tiempos de retención de los péptidos B1 y B2 obtenidos en los cromatogramas fueron de 8.98 y 8.92 min, respectivamente (**figuras 13 y 14**). En contraste, para los tiempos de retención de los péptidos no oxidados (C1NOX y C2NOX), no se obtuvo una única señal principal, probablemente debido a la formación de dímeros intermoleculares (**figura 15a y 15a**). En el caso de los péptidos oxidados de (C1OX y C2OX), los tiempos de retención de las señales principales se presentaron a los 5.68 y

6.09 min respectivamente, debido a la formación de puentes disulfuro intramoleculares evitando la formación de dímeros (**ver figura 15b y 16b**).

Así mismo, los tiempos de retención obtenidos entre péptidos los B y los péptidos C, respectivamente, fueron cercanos entre sí (menos de un minuto) debido a que las modificaciones de residuos entre aminoácidos de características estructurales semejantes, que conservaron aun su estructura secundaria. Por lo tanto, se presume que los péptidos moldes y sus análogos interactuaron con la fase estacionaria C-18 de manera similar.

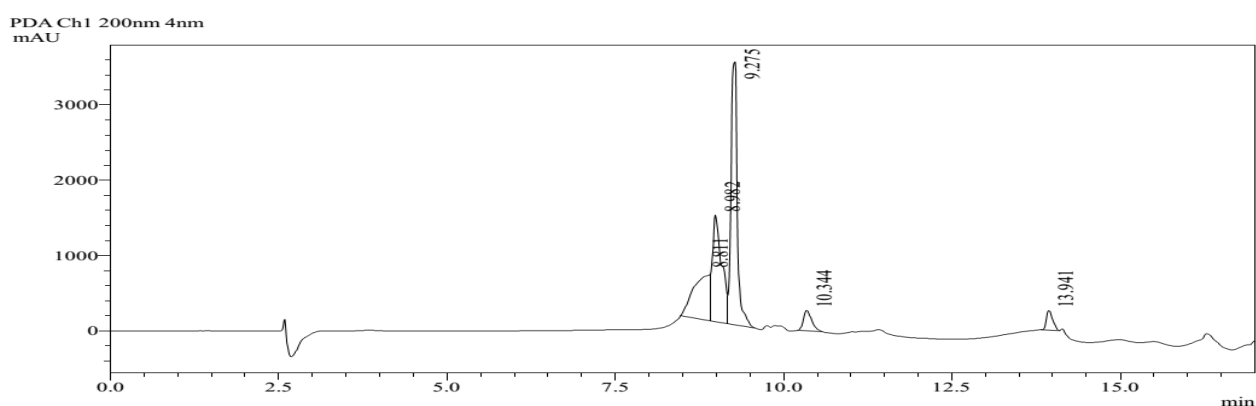


Figura 14. Cromatograma del péptido B1 obtenido por RP-HPLC.

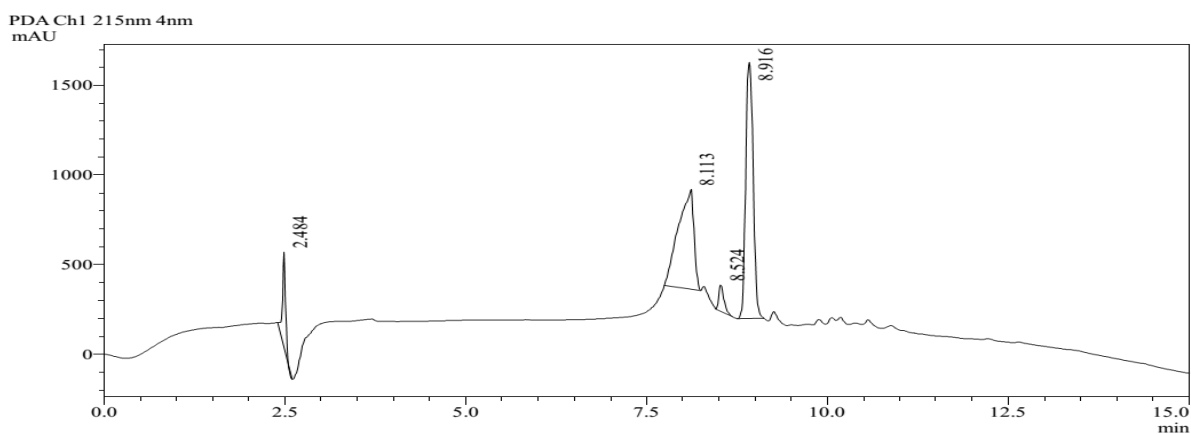


Figura 15. Cromatograma del péptido B2 obtenido RP-HPLC.

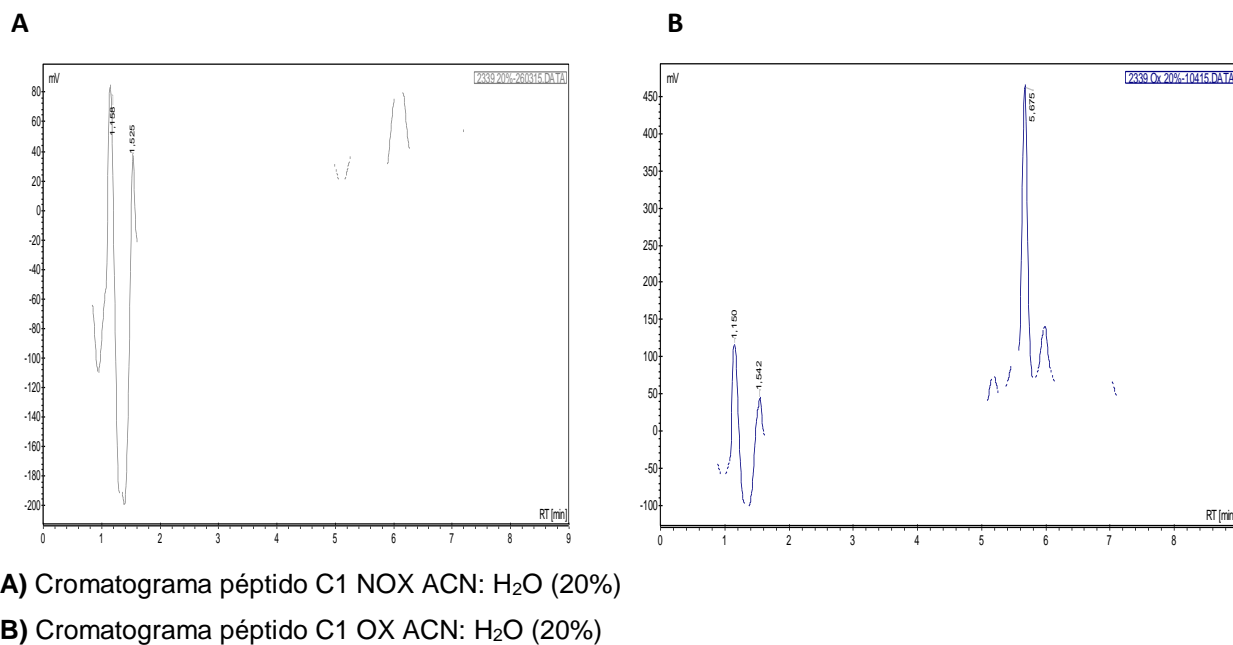


Figura 16. Comparación de cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de los péptido C1: (A) No oxidado y (B) Oxidado.

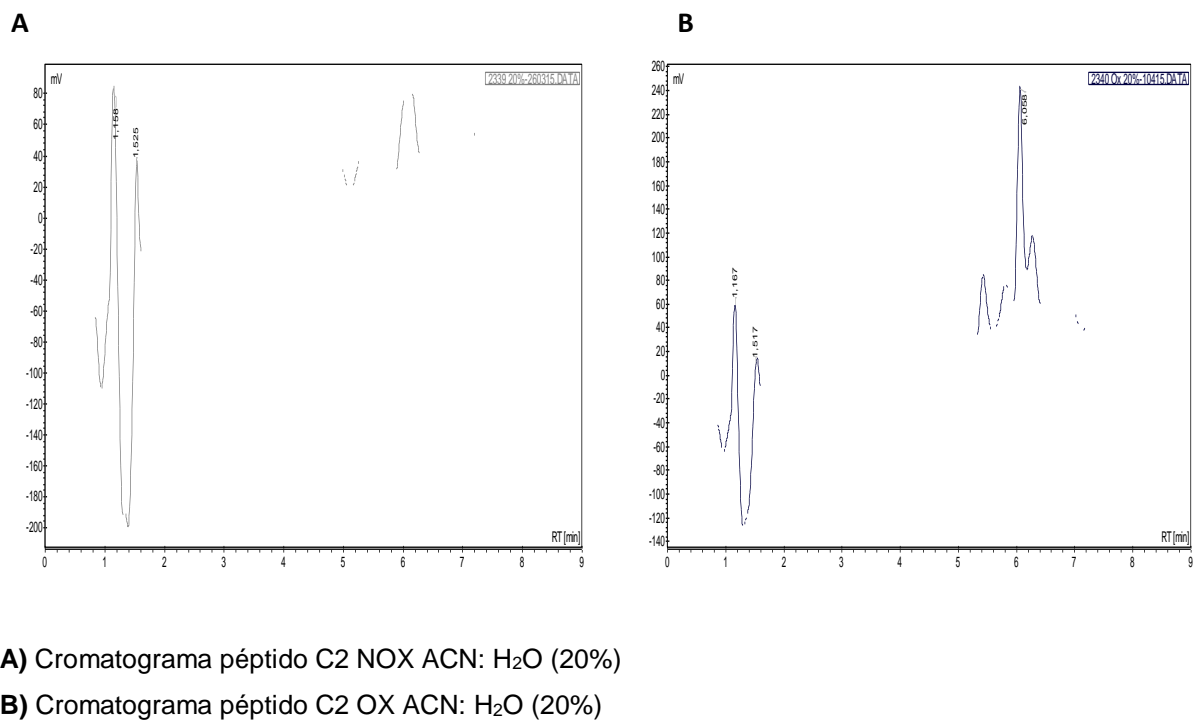
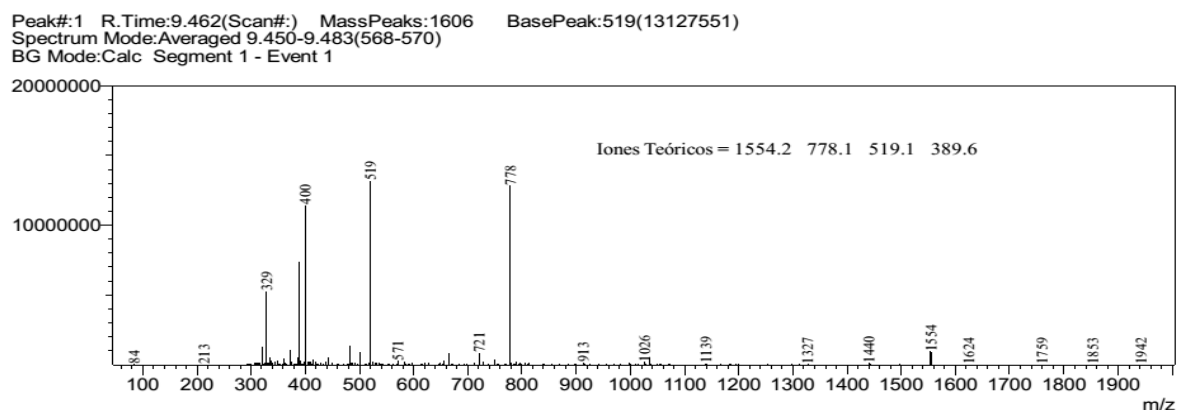


Figura 17. Comparación de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de los péptidos C2: (A) No Oxidado y (B) Oxidado.

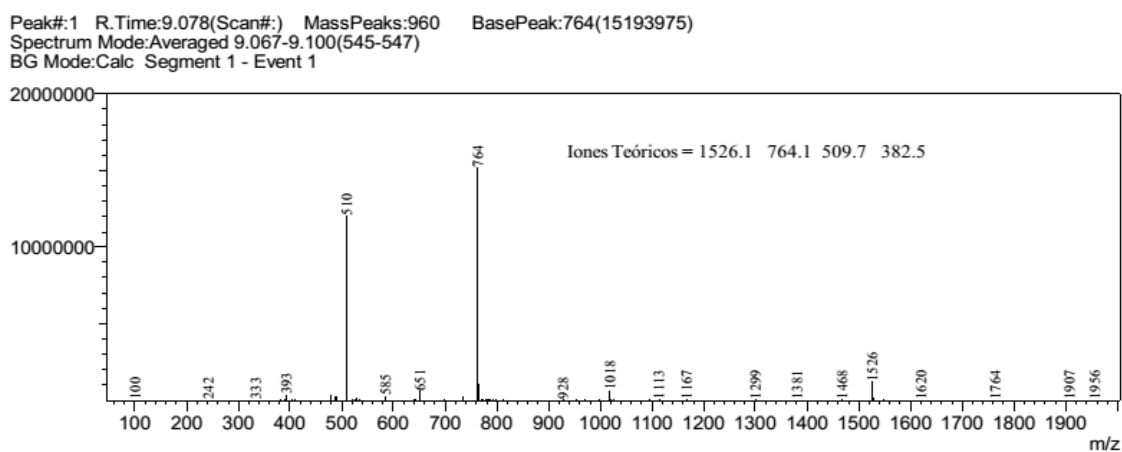
4.2.2 Análisis de estructura primaria de los péptidos mediante (MS-ESI) y MALDI-TOF

La masa molecular de los péptidos B1 y B2, presentó correspondencia entre el valor calculado de cada masa de los péptidos y los iones moleculares de los péptidos. De esta manera se demostró la amplia fidelidad de síntesis química de péptidos, como se muestra en las **figuras 18 y 19**.



Péptido B1 ACN: H₂O (10%)

Figura 18. Espectro de masas obtenido por ESI del péptido B1



(B) Péptido B2 ACN: H₂O (10%)

Figura 19. Espectro de masas obtenido por ESI del péptido B2

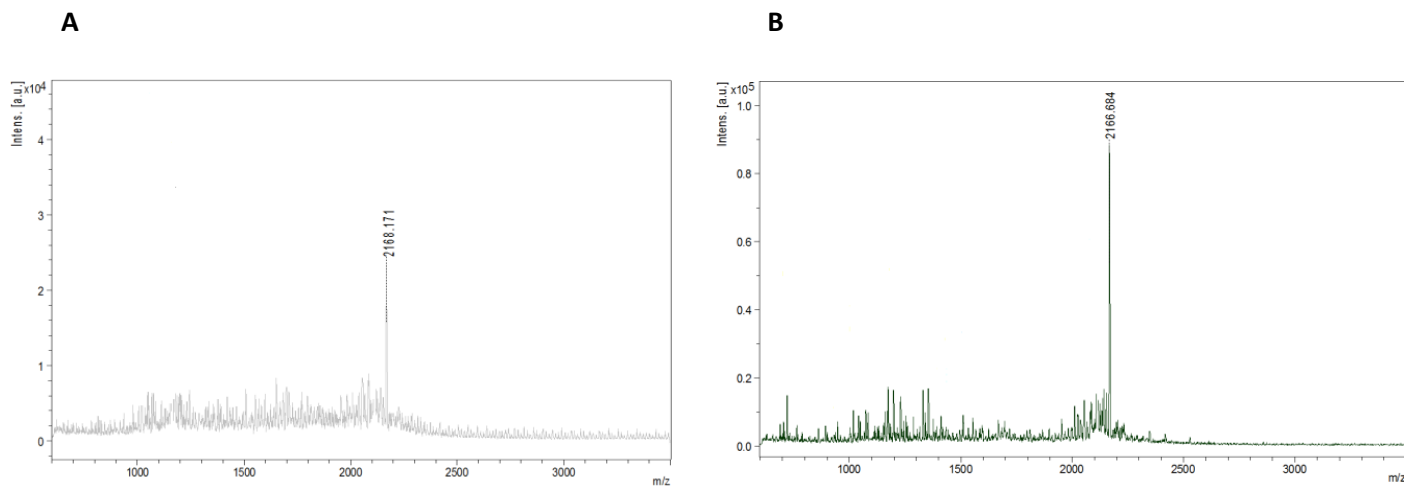
En algunos casos se observaron picos por encima del peso molecular del péptido en el cromatograma, los cuales corresponderían con aductos positivos (cationes de Na⁺, H⁺, K⁺) que se forman y adhieren al péptido durante en el proceso de ionización con la matriz, sales y metales presentes. No obstante, son señales minoritarias en relación a la intensidad de los picos de los iones moleculares de interés y son inherentes a la técnica analítica. En la **tabla 5** se resumen las masas obtenidas por ESI, cuyos valores de los iones teóricos coincidieron en más de dos picos experimentales, demostrado la amplia fidelidad de la síntesis química de los péptidos.

Tabla 5. Iones teóricos de los péptidos B obtenidos por ESI

Péptido	Masa molecular teórica (g/mol)	Ion(es) teóricos m/z*			
		1	2	3	4
B1	1554.95	1554.0	778.1	519.0	389.5
B2	1526.91	1526.1	764.1	509.7	—

*m/z: relación masa/carga

Los valores teóricos de las masas de los péptidos C1NOX y C2NOX no concordaron con los valores experimentales obtenidos en el MALDI-TOF. Esto se debe probablemente a la oxidación ocurrida por la interacción de los péptidos con el oxígeno ambiental con los respectivos péptidos, lo cual pudo haber favorecido la formación de puente disulfuro entre dos residuos de cisteína de cada péptido (**figura 20a y 21a**). Esta explicación se basa en que la masa inicial de los péptidos anteriores fue restada a -2, equivalente a los hidrógenos desplazados por el enlace disulfuro. En contraste, para los péptidos C1OX y C2OX utilizando DMSO, se obtuvieron coincidencias totales entre los valores teóricos y experimentales de sus masas moleculares. La posible pérdida de dos hidrógenos en los dos péptidos, indicaría la formación del restante enlace disulfuro (**figura 20b y figura 21b**). Los resultados de los espectros son presentados en la tabla 7.

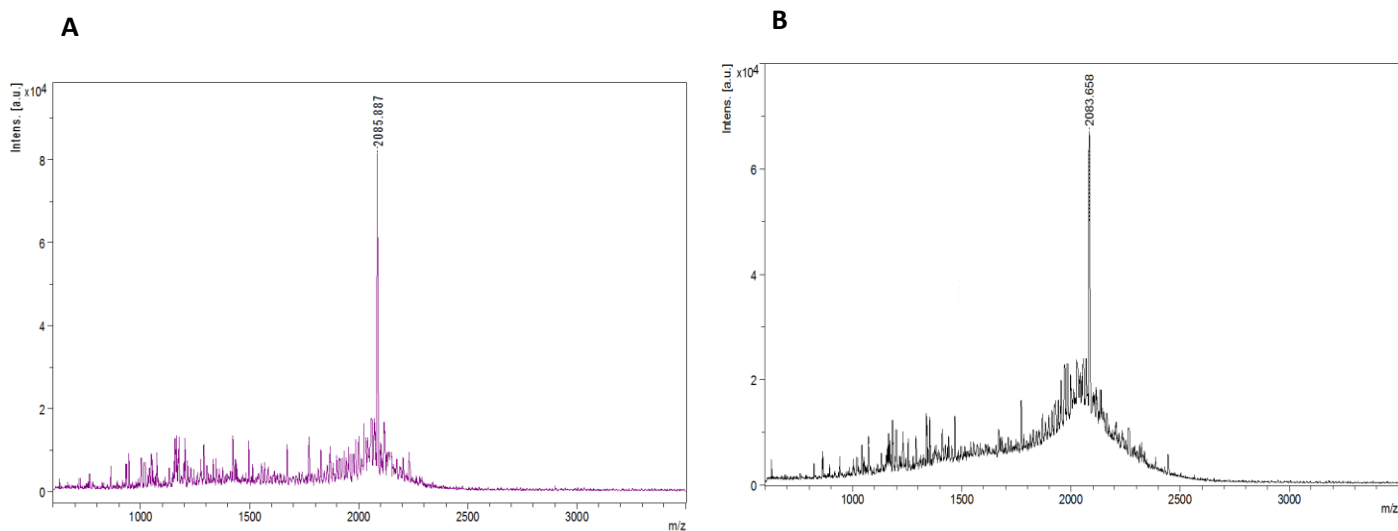


(A) Espectro de masas péptido C1 NOX ACN:H₂O (20%)

(B) Espectro de masas péptido OX ACN:H₂O (20%)

Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos C1 NOX / OX

Se empleó solución matriz de CHA:PAM en proporción: 1:1 V/V



(A) Espectro de masas péptido C2 NOX ACN:H₂O (20%)

(B) Espectro de masas péptido C2 OX ACN:H₂O (20%)

Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos C2 NOX / OX.

Se empleó solución matriz de CHA con PAM en proporción 1:1 V/V

Tabla 6. Masa del ion molecular [M+H]⁺ obtenido del análisis de MALDI-TOF.

Péptidos	[M+H]⁺ Calculado (m/z) **	[M+H]⁺ Experimental (m/z) **
C1 NOX	2171.69	2168.17(*)
C1 OX	2167.64	2166.68
C2 NOX	2088.55	2085.88(*)
C2 OX	2084.51	2083.65

* Pérdida de 2 protones por oxidación del aire.

M: Masa ion molecular

H: Masa de protón

m/z: Relación masa/carga

** : la diferencia mínima entre los valores teóricos y experimentales es debido probablemente a falla de calibración interna del equipo, no obstante no afecta la interpretación de los mismos.

4.2.3 Análisis de la estructura secundaria mediante Dicroísmo Circular

La estructura secundaria de los PAMs: B1, B2, C1/C2 NOX y C1/C2 OX, fue caracterizada utilizando dicroísmo circular, empleando una solución de trifluoretanol (TFE) al 30% (v/v), que simula la condición hidrófoba de membrana biológica. Los espectros de los péptidos presentaron bandas correspondientes con un perfil de péptido β-giro.

A pesar de que los modelos *in silico* para los péptidos habían predeterminado la estructura de péptidos β-plegados con sus respectivas laminas antiparaleras, estos no coincidieron con algunos péptidos sintetizados. Únicamente se

obtuvieron para los péptidos OX de C1 y C2. Es probable que en la simulación *in silico* de los péptidos presente un modelado de homología de proteínas, donde el reconocimiento de plantilla se basa en la alineación de perfil-perfil guiada por estructura secundaria y predicciones de exposición. Por lo anterior, todos los péptidos podrían haber presentado mayor homología con secuencias de péptidos de estructura beta plegada (**figura 22**).

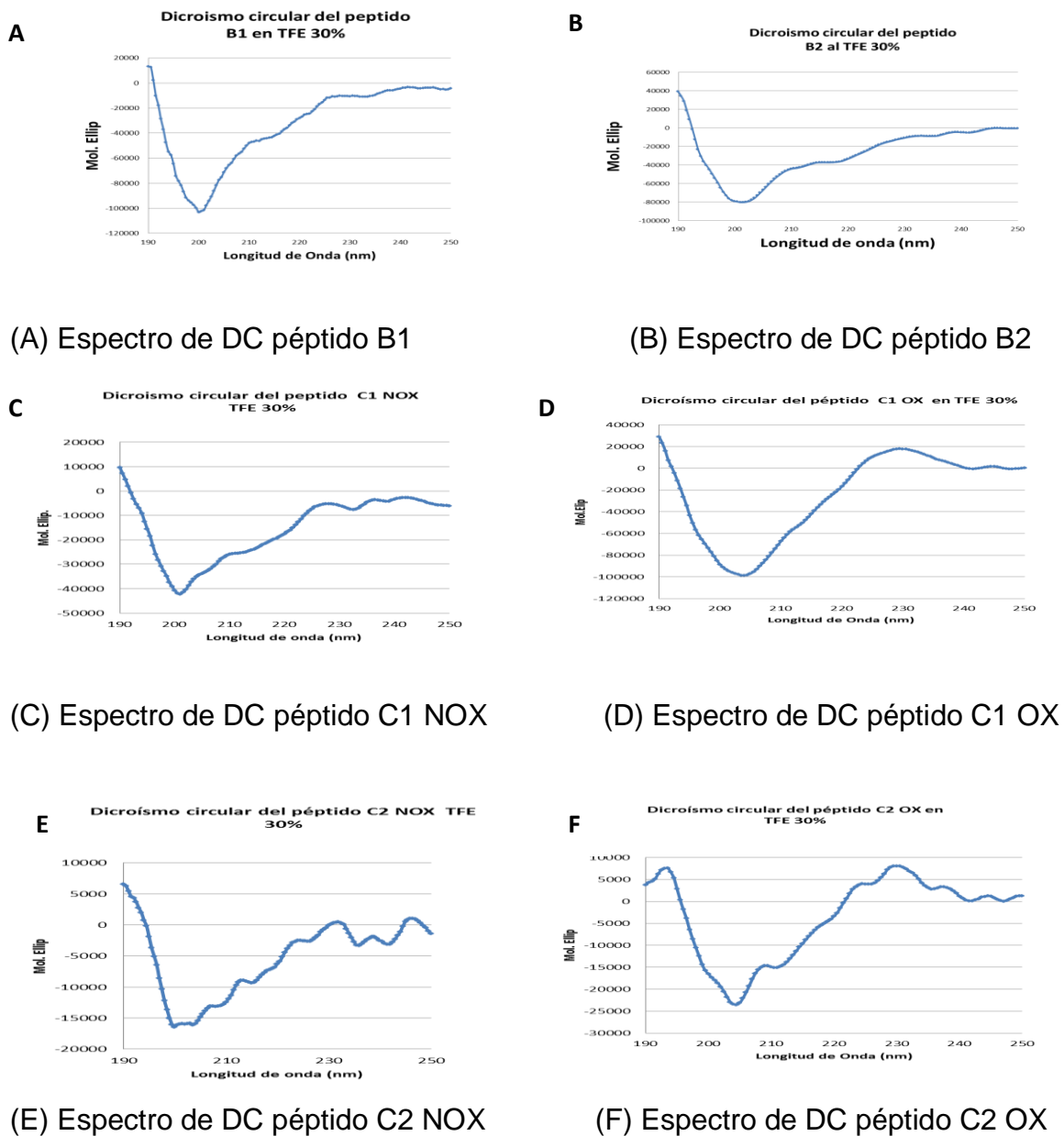


Figura 22. Espectros de dicroísmos circulares de los péptidos B y C.

Solución de TFE al 30%. (A) B1, (B) B2, (C) C1 NOX, (D) C1 OX, (E) C2 NOX y (F) C2 OX. Concentración de los péptidos: 2mg/mL.

4.3 Fase de encapsulación.

4.3.1 Selección del péptido B2 para encapsulación en polímero biodegradable PLGA

El péptido candidato para la encapsulación sería C2 NOX, sin embargo, su rendimiento durante su síntesis fue reducido debido a las repetitivas y continuas purificaciones del péptido para su oxidación. Por lo tanto, no se obtuvo cantidad considerable para complementar los ensayos biológicos de toxicidad; de esta manera los gastos económicos de producción no serían alternativa viable para su encapsulación. No obstante, se escogió el segundo mejor péptido, B2 por su aceptable rendimiento al no ser un péptido con residuos de cisteínas, además de presentar una gran actividad antibacteriana frente a las dos cepas de estudio y su aceptable toxicidad en glóbulos rojos de carnero. Los resultados serán analizados en paralelo con el péptido encapsulado en los apartados 4.4 y 4.5.

4.3.2 Síntesis de nanopartículas de PLGA- B2

Teniendo en cuenta el rendimiento de la síntesis peptídica se seleccionó el péptido B2 a pesar de que el PAM C2 presentaba mejores valores de actividad antimicrobiana. Para la síntesis de Nps de PLGA se utilizó la metodología de doble emulsión/ difusión de solvente (DESD), que reúne las ventajas de dos técnicas conocidas: un sistema de doble emulsión que minimiza la salida del principio activo hidrofílico del centro acuoso y el empleo del acetato de etilo como fase orgánica que es farmacéuticamente más aceptado y considerado menos tóxico que el diclorometano [163].

El homogenizado de Nps obtenido fue una suspensión blanca. Las Nps se caracterizaron mediante DLS y FE-STEM después de la remoción del acetato de etilo mediante rotoevaporación (40 atm, 25°C durante 30 min) y fueron purificadas empleando filtros ULTRAFREE MC Amicon de 30 kDa, realizando lavados seriados con solución tampón fosfato 1 mM pH 7.4 para retirar el excedente de PEI.

4.4 Fase de caracterización II: Caracterización fisicoquímica de las NPs PLGA-PAM

4.4.3 Tamaño hidrodinámico y Potencial Zeta de las nanopartículas

En el histograma de la distribución de tamaño hidrodinámico promedio de las Nps PLGA-B2 sintetizadas (**figura 23**), se observan poblaciones de tamaño comprendido entre 98.3 nm y 177.2 nm, con una población de tamaño hidrodinámico en promedio de 166.1 nm y un índice de polidispersión de 0.1 (Tabla 8).

Las Nps presentaron una distribución monomodal de tamaño, como se ilustra en el histograma de la **figura 22**. Este tamaño promedio de Nps está en los rangos de uso terapéutico en equilibrio con la carga neta [172]. De esta manera, se logró obtener Nps con tamaños acordes con la literatura (entre 100-200 nm) utilizando la metodología de DESD [174].

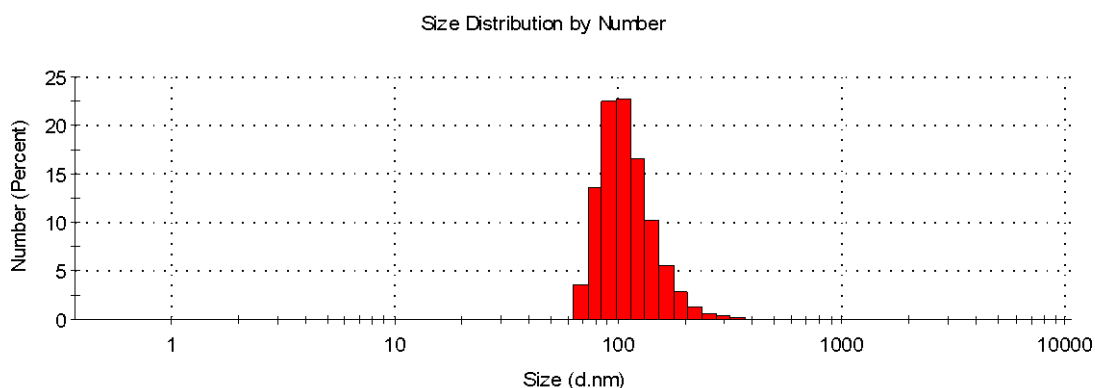


Figura 23. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de Nps PLGA-B2. Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica, 1 mg/mL de B2: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.004% (P/V) de Polietilimina como fase acuosa externa. La medida del tamaño hidrodinámico se realizó por triplicado.

El potencial Zeta (ζ) es el potencial eléctrico en el plano de corte, y por lo general se expresa en milivoltios (mV). Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen un coloide. Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, sea electrostático o estérico, al tiempo que constituye una variable clave para el control electrostático del coloide de la dispersión. Valores de potencial Zeta (ζ) comprendidos entre -30 y +30 mV, se correlacionan con una estabilidad coloidal baja, especialmente en la medida que el valor se acerca a la neutralidad [175].

En la **figura 24** se aprecia la distribución del potencial zeta de las Nps PLGA-B2 en presencia de PEI (agente catiónico). Estas Nps presentaron un ζ promedio de

+40.05 mV, indicando una excelente estabilidad (porque está por fuera del rango de -30 a +30, [175]). En este sentido, la medida del potencial de las Nps PLGA-B2 indicaría una óptima estabilidad y una reducida tendencia de agregación, lo cual favorecería la permanente liberación del péptido de la matriz polimérica de PLGA.

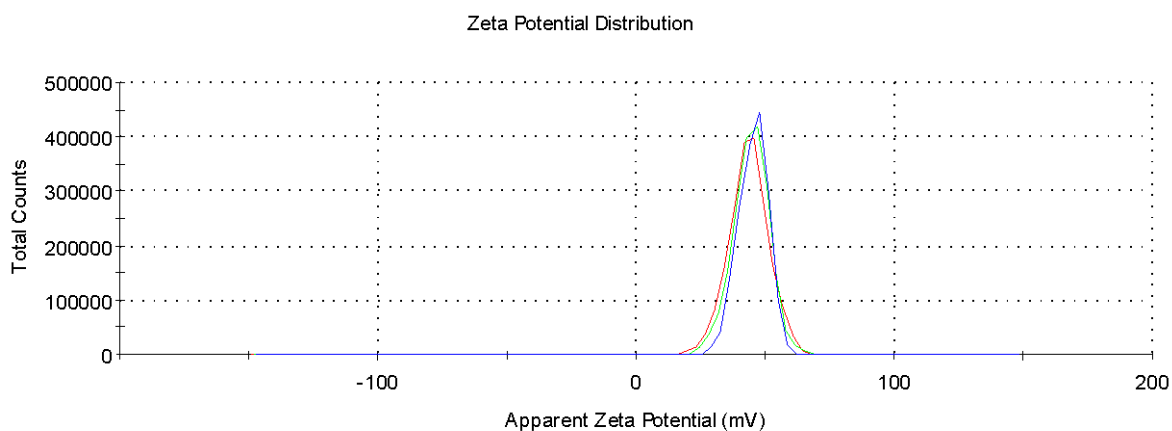


Figura 24. Histograma de distribución del potencial zeta (ζ) de las Nps PLGA-B2. Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica, 1 mg/mL de B2: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.004% (P/V) de PEI como agente catiónico. La medida del ζ de las Nps se realizó por triplicado (cada color es una medición).

4.4.4 Determinación del tamaño y morfología de las NPs PLGA-B2 mediante FE-STEM

Se realizó la caracterización de las Nps PLGA-B2 por microscopía FE-STEM en modo transmisión, utilizando un voltaje de 30 KV. Se determinó un tamaño promedio de 157.2 nm, como se observa en la **figura 25**.

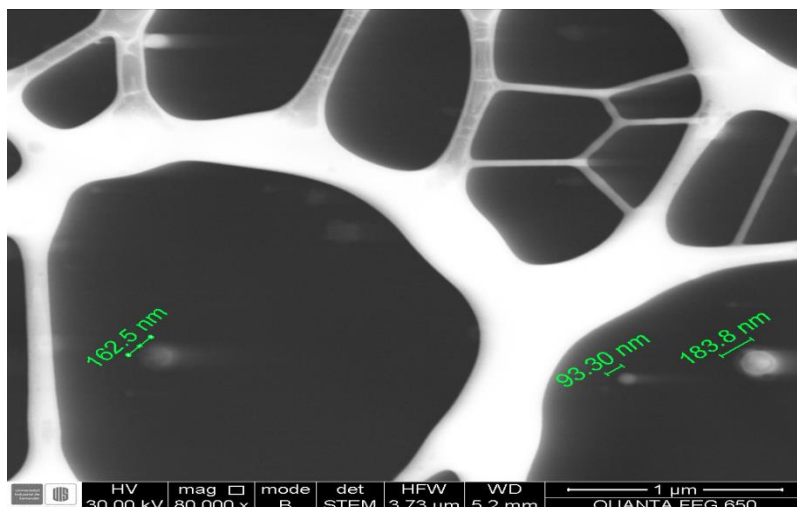


Figura 25. Micrografía por FE- STEM en modo de transmisión de Nps PLGA-B2. Con un voltaje de aceleración del 30KV y magnificación de 80000x

Todas las Nps formadas se encontraban dispersas de manera homogénea, sin formación de aglomerados y sin agregación; Estas propiedades de las Nps son muy importantes para la actividad antimicrobiana como lo demuestran otros estudios de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando NPs en diferentes formas y tamaños [176]. Así mismo, como se observa en la tabla 7, el aumento del tamaño hidrodinámico de la Nps PLGA-B2 (166.06 nm) con respecto las Nps PLGA vacía (130.1 nm), permite inferir la encapsulación del péptido B2.

Por otra parte, el valor negativo de potencial zeta obtenido para las NPs vacías se podría deber a una reducida área de contacto con la superficie del polímero PLGA. Esta diferencia de potencial zeta entre las NPS vacías y cargadas con el péptido B2, es probablemente que en la encapsulación del péptido quedara expuesto en la superficie de la NP aumentando drásticamente el potencial zeta positivo del nanovehículo, por lo cual se podría inferir que es una posible nanopartícula tipo nanoesfera (NE), (ver tabla 7).

Tabla 7. Características físico-químicas de las Nps de PLGA-B2.

	FE - STEM ± DS* (nm)	Tamaño hidrodinámico promedio ± DS*(nm)	Potencial Zeta ± DS* (mV)
Nps PLGA-B2	157.2 ± 23	166.06 ± 0.7	+40.5 ± 1.0
Nps de PLGA	ND**	130.1 ± 1.6	-10.57 ± 0.4

ND: No determinado

DS: desviación estándar

4.4.5 Eficiencia de la encapsulación del péptido B2 cargado en las Nps de PLGA

La concentración del péptido B2 encapsulado en Nps de PLGA se cuantificó mediante RP-HPLC, observando una señal con un tiempo de retención de 1.89 min que correspondía al tiempo característico del péptido libre B2.

Se determinó una concentración de péptido cargado de 93.4 ppm en las Nps de PLGA mediante una curva de calibración del péptido libre entre 0 y 500 ppm (ver anexo H). Posteriormente se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana utilizando un rango de concentración entre 10 y 75 μ M. Así mismo, esta concentración representó 2.64×10^{-3} B2/PLGA de PAM cargado en el sistema de liberación nanométrico de PLGA (el cálculo se presenta en el anexo G).

La eficiencia de encapsulación de B2 en el sistema de liberación de PLGA fue del 6.6 %, siendo bastante reducida para una proporción de péptido/ Polímero 1:10 (mg de PAM/mg de PLGA) en referencia a otros estudios de encapsulación de péptidos con este polímero (Tabla 2), siendo esta la menor establecida. El rendimiento de encapsulación tan bajo podría explicarse de diferentes maneras: 1) la técnica de encapsulación por DESD; porque se podría la degradación del

péptido, en situación de estrés físico por calor y agitación del dispersor metálico y temperatura de la reacción, entre otros. 2) la naturaleza del péptido (peso y tamaño molecular superior a 1100 Da, por ejemplo); en este caso el péptido puede quedar funcionalizado con los grupos carboxilo en la superficie de la NPs, lo cual probablemente al ocupar varios sitios de unión con el PLGA, ocasionarían gran pérdida del péptido.

Sería recomendable estudiar otras metodologías de encapsulación de PAMs, intentando obtener una mayor eficiencia utilizando el mismo polímero. No obstante, se realizó la caracterización biológica completa de la suspensión de Nps de PLGA-B2 para observar el efecto biológico de su escasa encapsulación.

4.5 Fase de caracterización II. Actividad biológica de la Nps PLGA-B2

4.5.1 Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los PAM libres y nanoencapsulados frente a las cepas resistentes de estudio.

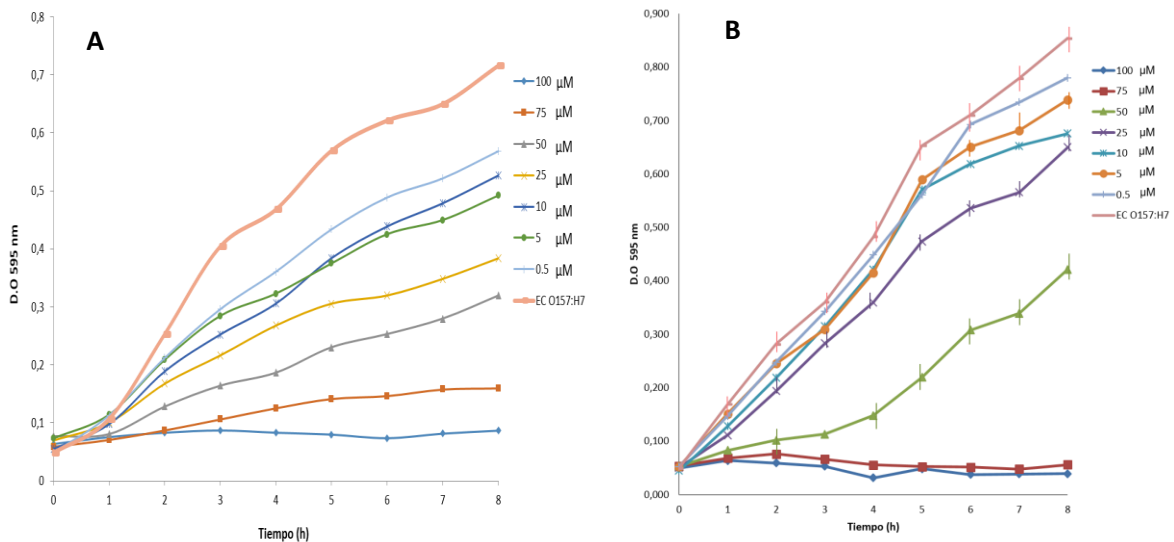
Se evaluó la actividad antibacteriana de todos los péptidos sintetizados y de las Nps PLGA-B2 contra las cepas resistentes multiresistentes a antibióticos como EC O157:H7 y SARM, mediante ensayos de microdilución en caldo. Los resultados se describirán a continuación:

4.5.1.1 Actividad antibacteriana de los péptidos libres

Se evaluaron las cinéticas de crecimiento de *EC O157:H7* y SARM en presencia concentraciones seriadas del péptido a evaluar (0.5, 5, 10, 25, 75,100 μ M), utilizando como controles negativos la cepa pura, el medio de cultivo sin inocular y un control positivo del microorganismo en presencia del antibiótico ofloxacina. En las **figuras 26 y 27** se observa el efecto del péptido a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de los microorganismos evaluados.

En la **figura 26 (a, b)** se observan las cinéticas de crecimiento de *EC O157:H7* frente a los péptidos B1 y B2, los cuales inhibieron el crecimiento bacteriano a una

mínima concentración de 100 μM , es decir entre 95% y 99% respectivamente con referencia al control de crecimiento. No obstante, la concentración de inhibición de la mitad densidad bacteriana (CMI_{50}) en los dos péptidos fue distinta, siendo el péptido B1 el que exhibió mayor actividad a una concentración menor de 25 μM , a diferencia de la obtenida con péptido B2 (superior de 50 μM). Además, ambos péptidos presentaron actividad bacteriostática a 100 μM , evidenciándose su crecimiento visible en los viales eppendorf antes de ser sembrado en el agar BHI.



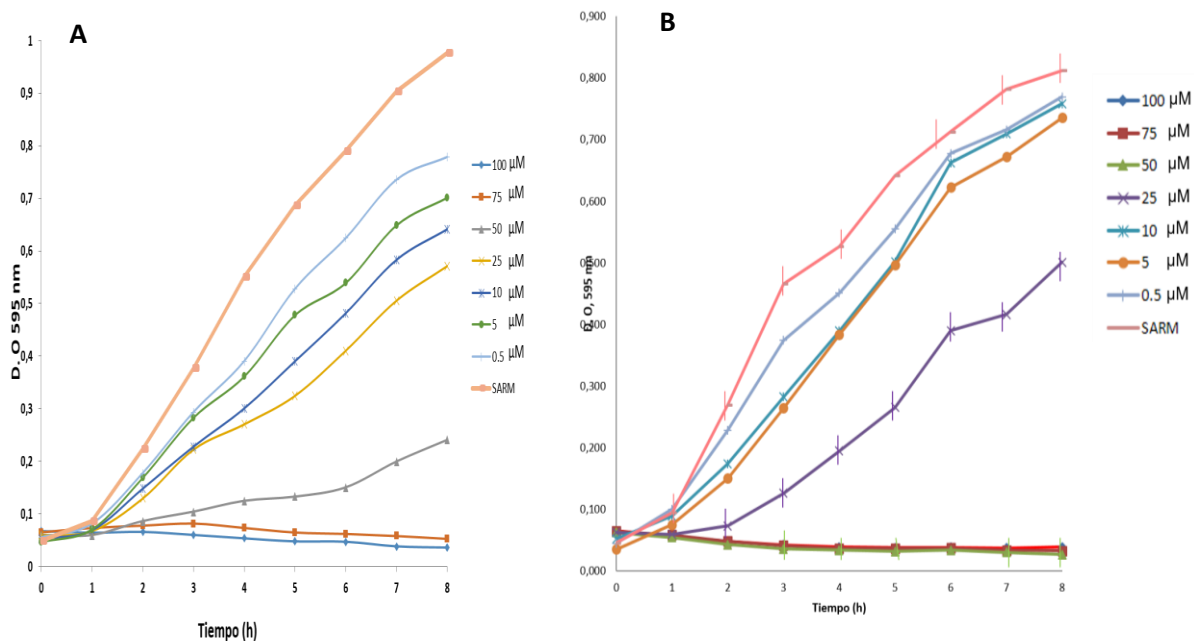
(A) Actividad antibacteriana del péptido B1

(B) Actividad antibacteriana del péptido B2

Figura 26. Actividad antimicrobiana de péptido B1 y B2 frente a EC O157:H7 utilizando el método de microdilución en caldo.

Por otra parte, se probó la actividad antibiótica de los péptidos B frente a SARM, siendo B2 el péptido con mayor actividad antibacteriana, debido a que su concentración mínima inhibitoria del 99% de la población bacteriana fue 50 μM . En contraste, el péptido B1 presentó una CMI_{95} a 100 μM ; mientras que la CMI_{50} de los dos péptidos (B1 y B2) fue de 25 y 50 μM , respectivamente (**figura 27 (a,b)**).

Finalmente, ambos péptidos presentaron una actividad bacteriostática por su crecimiento visible en los viales eppendorf a partir de 100 μM para cada péptido.



(A) Actividad antibacteriana del péptido B1

(B) Actividad antibacteriana del péptido B2

Figura 27. Actividad antibacteriana de péptido B1 y B2 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo.

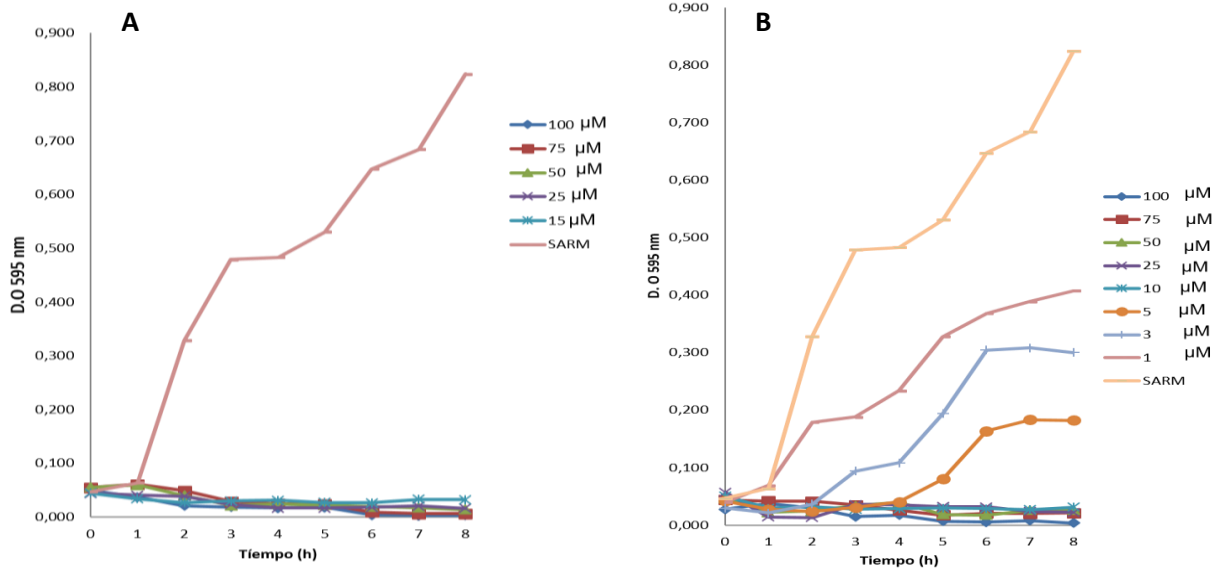
El péptido B2 presentó la mayor actividad antibacteriana (tabla 9), superando a la calculada para el B1 *in silico* (tabla 5). Este resultado se atribuye posiblemente a la modificación sistemática de la secuencia del péptido B2 en 6R→K, ocasionando aumento de estabilidad de la estructura beta giro y favoreciendo la interacción del péptido con la membrana biológica bacteriana. Cabe recordar que ambos péptidos presentaban la misma carga +4, hidrofobicidad (46%) y volumen (1882 Å³) (tabla 4).

Tabla 8. Valores de la CMI₅₀ y CMI₉₉ frente a EC O157:H7 y SARM

PAM	Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> O157:H7		Actividad antibacteriana frente a SARM	
	CMI ₅₀ ±DS (µM)	CMI ₉₉ ±DS (µM)	CMI ₅₀ ±DS (µM)	CMI ₉₉ ±DS (µM)
B1	>25	>100*	>50	>100
B2	>50	>100	>25	>50

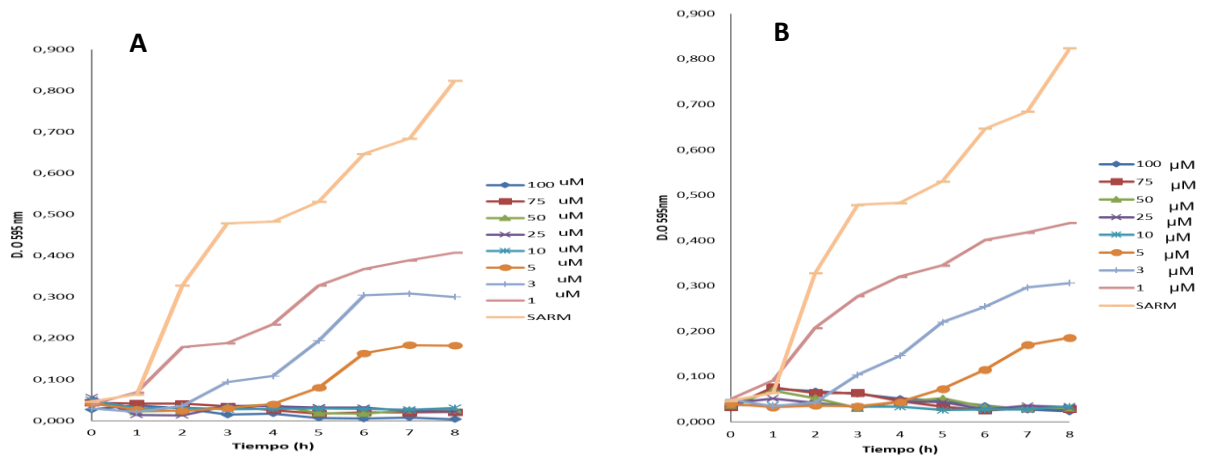
DS: Desviación estándar (*) CMI95

Por otra parte, la actividad de los péptidos con presencia de cisteína (C), se compararon inicialmente sus actividades antibióticas del estado de los péptidos no reducidos o no oxidados (extraídos y purificados directamente de la síntesis) frente a los oxidados en solución con DMSO, contra las cepas de estudio. En la **figura 28 (a, b)** se observan la cinética de inhibición tanto del péptido C1 NOX/ C1 OX frente a SARM, en CMI₉₉ superiores de 25 µM y 15 µM, respectivamente. Asimismo, ambos péptidos de diferentes estados (NOX / OX) presentaron una actividad bacteriostática debido al crecimiento de colonias visibles en agar BHI. (Anexo G). Por otra parte, los péptidos C2 NOX/ C2 OX exhibieron una mejor actividad inhibitoria frente a SARM, ambos péptidos presentaron una CMI₉₉ a partir de 10 µM como se detalla en la **figura 29 (a, b)**, sin embargo, presentaron actividades bacteriostáticas frente a SARM (Anexo G)



(a) Actividad antibacteriana del péptido C1 NOX (b) Actividad antibacteriana del péptido C1 OX.

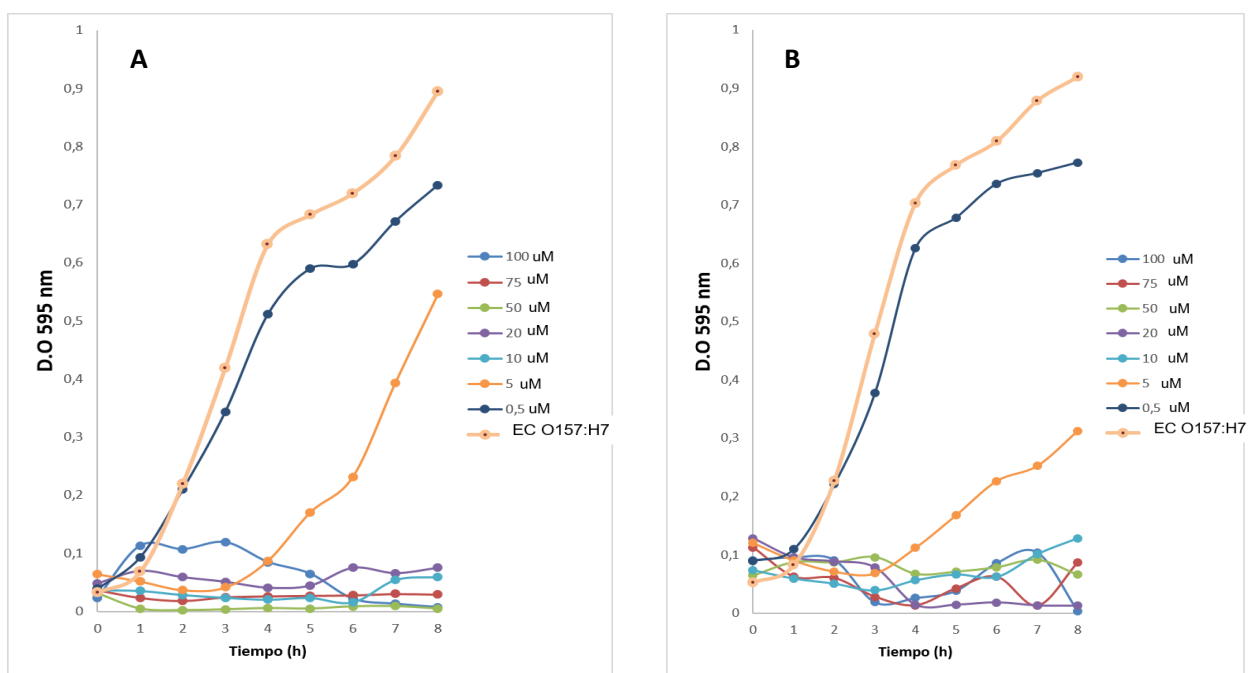
Figura 28. Actividad antibacteriana de los péptidos C1 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo.



(a) Actividad antibacteriana del péptido C2 NOX (b) Actividad antibacteriana del péptido C2 OX

Figura 29. Actividad antibacteriana de los péptidos C2 frente a SARM mediante el método de microdilución en caldo.

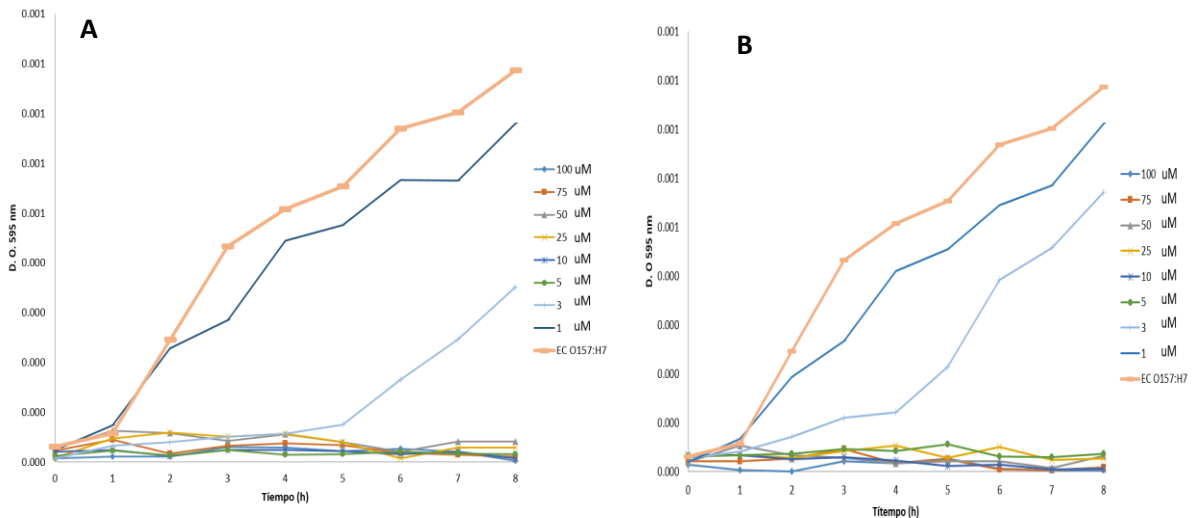
Posteriormente, se evaluaron las actividades biológicas de los estados químicos de los péptidos C frente a EC O157:H7. En la figura 30 (a, b), se observan las curvas de inhibición tanto del péptido C1 NOX y OX, las cuales fueron similares y con una CMI₉₉ superior de 25 µM para ambos estados de péptidos. Asimismo, ambos péptidos probados presentaron una CMB a partir de 25 µM (Anexo F). De tendencia semejante, ambos péptidos C2 NOX y C2 OX presentaron actividades antibióticas a una CMI₉₉ de 5 µM como se observa en la figura 31 (a, b), y exhibieron una CMB a partir de 10 µM y 25 µM, respectivamente.



(A) Actividad antibacteriana del péptido C1 NOX

(B) Actividad antibacteriana del péptido C1 OX

Figura 30. Actividad antibacteriana de los péptidos C1 frente a EC O157: H7 mediante el método de microdilución en caldo.



(A) Actividad antibacteriana del péptido C2 NOX

(B) Actividad antibacteriana del péptido C2 OX.

Figura 31. Actividad antibacteriana de los péptidos C2 frente a EC O157: H7 mediante el método de microdilución en caldo.

De lo anterior, el péptido C2 NOX presento una mejor actividad biológica frente a las cepas de estudio como lo predicho *in silico* para los péptidos C (tabla 4), debido la eliminación sistemática de la arginina (R) en la posición 14 del péptido molde C1 para reducir su carga de +6 a +5, lo cual probablemente pudo generar menor repulsión electrostática entre péptido – péptido y además, de permitir una débil unión del péptido C2 con la membrana bacteriana; permitiendo la partición de la misma y/o probablemente la migración de los péptidos para interactuar con dianas intracelulares bacterianas realizando su actividad antibacteriana. [173; 177]. Por otra parte, a pesar de que diversas investigaciones han demostrado que la oxidación de péptidos con cisteína para estabilizar la estructura secundaria de la hoja beta plegada del péptido mediante la formación de puentes disulfuros, mejoraría su actividad biológica antibacteriana frente a cepas patógenas. No obstante, en este estudio no se pudo comparar los resultados obtenidos con otras

investigaciones debido a que contrastan la actividad del péptido reducido empleando varios agentes reductores como β -mercaptoetanol al 10%, Ditiotreitól, DOTA frente a los péptidos oxidados principalmente con DMSO; en péptidos como la región beta plegada de la beta defensinas y hepcidina [50; 51; 153] , y por utilidades de rendimiento de síntesis no se procedió a su reducción. Así mismo, como se menciona en el apartado 4.2.2; los péptidos NOX son parcialmente oxidados debido al contacto con el oxígeno del ambiente. Es probable que la amplia actividad el péptido C2 NOX, respecto a los otros sea inferido a su equilibrada proporción de hidrofobicidad / hidrofilia (47:53) respectivamente y su bajo volumen en solución con respecto a los péptido C1, le hubieran facilitando atravesar la pared celular y la(s) membrana(s) biológica(s) bacteriana(s) de las cepas de estudio. Los resultados anteriores, se resumen en la siguiente Tabla 9.

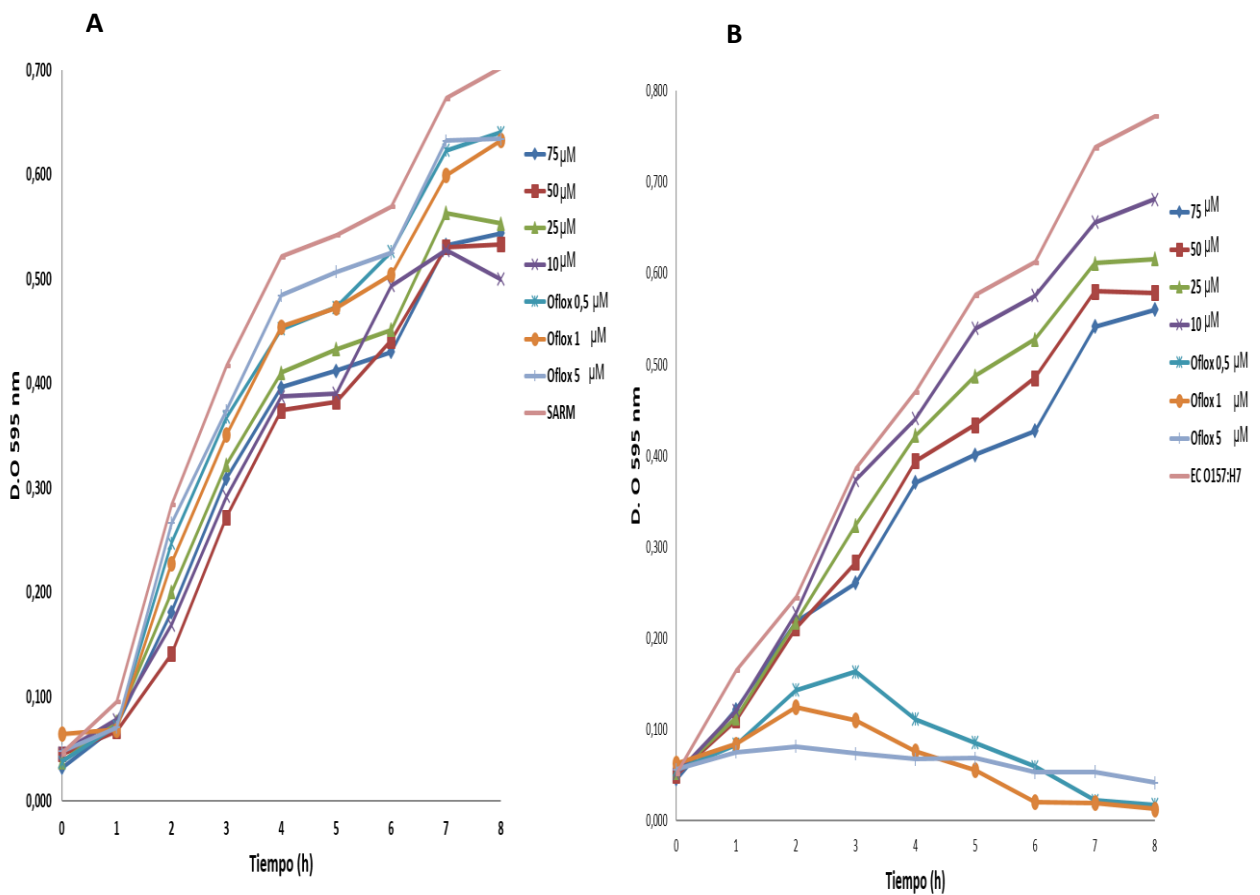
Tabla 9. Comparación de la actividad antibacteriana de los péptidos C1 y C2 NO oxidados (NOX) y oxidados (OX) frente a las cepas de estudio.

	Actividad antibacteriana de los péptidos (CMI ₉₉ /CMB)							
	Péptido C1				Péptido C2			
	NOX CMI ₉₉ (μ M)	NOX CMB (μ M)	OX CMI ₉₉ (μ M)	OX CMB (μ M)	NOX CMI ₉₉ (μ M)	NOX CMB (μ M)	OX CMI ₉₉ (μ M)	OX CMB (μ M)
MRSA	>25	>100	>15 μ M	>100	>10 μ M	>100	>10 μ M	>100
EC O157:H7	>25	25 μ M	>25 μ M	25 μ M	>5 μ M	10 μ M	>5 μ M	25 μ M

4.5.1.2 Determinación de la actividad antibacteriana de las NPs PLGA-B2 frente a EC O157:H7 y SARM

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las las Nps PLGA-B2 sintetizadas, frente a *EC O157:H7* y SARM, utilizando diferentes concentraciones de NPsPLGA-B2 (entre 10 y 75 μM); los controles negativos fueron las cepas puras, el medio de cultivo sin inocular, PEI al 0.04% y el polímero PLGA. El control positivo se hizo con el cultivo en presencia del antibiótico ofloxacina (Anexo F)

Para determinar la actividad antibacteriana de las Nps PLGA-B2 se tomaron como referencia los valores de las menores CMI del 99% obtenidas con el péptido B2 libre. Sin embargo, no se observó actividad antibiótica del péptido encapsulado en PLGA frente a las dos cepas de estudio, como se muestra en la **figura 32 (a,b)**. Todos los resultados se presentan en los Anexos D y E.



(A) Actividad antibacteriana del PLGA-B2 frente SARM

(B) Actividad antibacteriana del PLGA-B2 frente EC O157:H7.

Figura 32. Actividad antibacteriana de PLGA-B2 frente a SARM y EC O157:H7 mediante el método de microdilución en caldo. Oflox: Ofloxacina.

Por lo tanto, se demostró que las Nps PLGA-B2 no inhiben el crecimiento bacteriano a concentraciones cercanas a la que inhibe péptido B2 libre. Esto se debe posiblemente a una escasa liberación del péptido B2 en su diana de acción sea por la reducida eficiencia de la encapsulación o la retardada liberación del péptido B2 de la matriz polimérica, a causa de su elevada carga positiva, como se ha reportado en otros estudios de encapsulación [178].

4.5.2 Ensayo de hemólisis para evaluación preliminar de toxicidad de los PAMs libres y Nps-PLGA-B2

Para determinar el efecto hemolítico de los péptidos libres y el encapsulado, se utilizaron eritrocitos de carnero. Los resultados de toxicidad tanto de los PAMs y PLGA-B2 son presentados en la **figura 29**. Los PAMs B1 y B2 presentaron un comportamiento tóxico similar, por presentar la misma característica de hidrofobicidad, volumen y carga. No obstante, el péptido B2 fue ligeramente más hemolítico (5.97%) respecto a B1 (4.82%), es decir 1.2 veces, a una concentración máxima de 75 μ M en 1.2 veces. Cabe destacar, que los valores obtenidos siguen siendo aceptables, al estar por debajo del porcentaje permitido de hemólisis (<10%).

Es probable que la estructura secundaria del péptido B2, presente una mayor aproximación a la estructura de péptido β -giro, plegándose sobre sí mismo, favoreciendo una estructura más anfipática en contraste con el B1. De esta manera, su región hidrófoba puede interactuar más fácilmente con las cadenas acil de los fosfolípidos de membrana y algunos fosfolípidos de membrana. Por otro lado, las diferentes concentraciones de NPs-PLGA-B2 presentaron una actividad hemolítica 6 a 8 veces superior a la de los péptidos libres (**figura 33**).

Por otro lado, se confirmó el efecto hemolítico de las NPs vacías con adición y sin adición de (PEI), obteniéndose una actividad hemolítica entre 19.55 y 29.79%

respectivamente. Es probable que el alto contenido de ácido glicólico utilizado para la síntesis (relación 50:50) confiera a las nanocápsulas una mayor hidrofiliabilidad, capturando el agua alrededor de los eritrocitos y generando un cambio osmótico del medio para su posterior cremación. Estos hallazgos fueron demostrados por micrografía publicados por Luo col., 2012 [179]. Además, estudios de Kim y col., 2005, corroboraron una actividad hemolítica del 80% en las NPs de PLGA con diferentes surfactantes.

Por otra parte, las NPs-PLGA-B2 presentaron una actividad hemolítica del 31,5 %, resultado un poco elevado al estudio previo realizado por Li y col., 2014 [179]. Por otra parte, se ha demostrado que las NPs de PLGA cargadas positivamente tienen una mayor afinidad con la membrana celular eritrocitaria y por lo tanto una mayor captación que las nanopartículas neutras o cargadas negativamente. En el caso de las nanopartículas de PLGA-PEI al 0.004%, se evaluó el efecto hemolítico del PEI a concentraciones de 0.002% y 0.004%, y se encontró una actividad muy reducida entre 0.5 y 0.8% de actividad hemolítica, respectivamente. Estos valores no superaron los obtenidos con las NPs vacías, debido a que la PEI actuaría como aislante catiónico del PLGA, minimizando su contacto con las membranas de los eritrocitos.

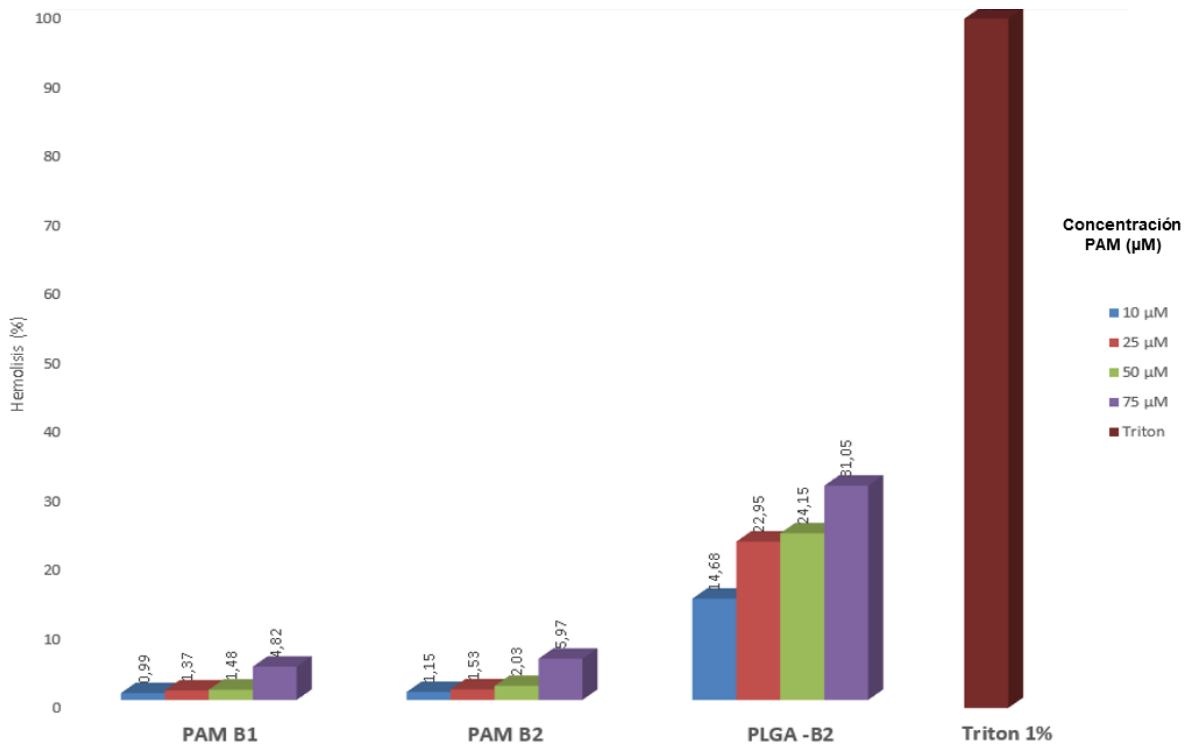


Figura 33. Actividad hemolítica de los péptidos B1 (1), B2 (2) y PLGA-B2 (3) y control de hemolisis (tritó) determinada en eritrocitos, frente a las concentraciones de péptido libre y encapsulado evaluadas.

4.5.2 Cálculo del Índice terapéutico

Se calcularon solamente para el caso de los péptidos B1 y B2, y las NPs PLGA-B2. El índice terapéutico constituye marcador importante de bioseguridad médica para asegurar los posteriores ensayos en fases clínicas. Entre mayores son los valores de índice terapéutico, mayor la especificidad de los péptidos antimicrobianos frente a células bacterianas. Los valores obtenidos se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 10. Índice terapéutico de lo péptidos libres y encapsulado.

	%CH₁₀(:)* (μM)	CMI₅₀* (μM)	Índice terapéutico (IT)
Péptido B1	>24.5	>15	1.63
Péptido B2	>24.5	>15	1.63
PLGA-B2.	>7.8	>100	0.08

(*) Media geométrica de las CMI₉₀ de las dos cepas de estudio.

(:)Porcentaje de concentración hemolítica al 10%: valor donde comienza la perturbación de membrana bacteriana.

IT: Razón de las medias cuadradas de % CH₁₀ / CMI₅₀.

En la tabla anterior se observa que B1 y B2 presentaron el mismo índice terapéutico, a pesar de que el péptido B1 fuera más activo frente a EC O157:H7 y menos activo contra SARM, en contraposición con el péptido B2, cuya actividad fue mayor frente a SARM y moderada frente EC O157:H7.

En relación con la actividad hemolítica al 10%, este valor se encontraba por encima de 100 μ M para ambos péptidos. No obstante, las NPs-PLGA-B2 y las recubiertas con PEI, ocasionaron un índice terapéutico 20 veces menor que los péptidos libres, probablemente debido al elevado número de posibles NE sintetizadas al ajustarse sus concentraciones debido a la reducida eficiencia de encapsulación; posiblemente aumentado concentraciones de PLGA/PEI por encima del valor terapéutico para el PLGA. Sin embargo, los datos del IT no pueden ser comparados con otros estudios de la literatura científica, porque en la mayoría se emplearon hematíes humanos que difieren en composición bioquímica de fosfolípidos de membrana y como también, la concentración de eritrocitos. Adicionalmente, en esta clase de estudios únicamente evalúan la actividad

hemolítica de los péptidos, mas no de los péptidos encapsulados en polímeros como se ha demostrado en otros estudios (Tabla 3).

Resultaría difícil la comparación de resultados con otros autores, porque en cada caso consideran diferentes condiciones y métodos de determinar el porcentaje de hemólisis. En algunos estudios, para determinar la actividad hemolítica se establece una relación entre el porcentaje de hematíes y el volumen de sangre. En este caso, algunos autores han publicado como aceptables los porcentajes de hemólisis comprendidos entre 2 y 4%. En otros casos, se tiene en cuenta un margen de hemólisis entre 5 y 10%.

Otro factor a tener en cuenta es el tiempo del ensayo de hemólisis, debido pasadas las dos horas, el efecto hemolítico no se deberá al efecto del péptido, sino a la disminución de la actividad metabólica eritrocitaria. Algunos autores (ver apartado 3.5.2) emplean buffer con adición de distintos suplementos energéticos como glucosa para evaluar el efecto hemolítico por más tiempo. En otros estudios se ha recomendado determinar el % CH₁₀, donde la concentración del péptido empezaría a perturbar la integridad de la superficie eritrocitaria que se correlacionaría con una CMI₅₀ para cinéticas de crecimiento con aproximadamente 1x10⁶ ufc/ml en la cinética bacteriana. Sin embargo, estos datos presentados por Chon y col., 2013 no aparecen referenciados por otros autores.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el péptido B2 encapsulado (NPs-PLGA-B2) se determina que el sistema de encapsulación mejora la acción antimicrobiana del péptido, frente a cepas patógenas resistentes evaluadas en este trabajo. A pesar de haber alcanzado un 6,6% de encapsulación del péptidos, utilizando la metodología de doble emulsión/ difusión de solvente (DESD), se observó una aparente sinergia entre el péptido libre B2 y el encapsulado.

5 CONCLUSIONES

- Se diseñaron y sintetizaron nuevos PAMs utilizando la metodología en fase sólida F-moc con pureza superior del 95%.
- Se demostró experimentalmente que las estructuras secundarias de los péptidos B y C son β -giro, contrario a las predicciones *in silico*.
- Los péptidos C presentaron un bajo rendimiento de purificación debido a dificultad para remover las sales generadas durante la formación de los puentes disulfuro. Sin embargo, el péptido C2 NOX presentó la mejor actividad antibiótica.
- El péptido B2 fue seleccionado ya que presentó una actividad antibacteriana aceptable frente a EC O157:H7, alcanzando CMI₅₀ y CMI₉₀ de 50 y 100 μ M, respectivamente. De manera similar, el PAM B2 presentó una actividad antibacteriana frente a SARM, alcanzando CMI₅₀ y CMI₉₀ de 25 y 50 μ M, respectivamente.
- La encapsulación del péptido B2 en PLGA, disminuyó la actividad antibacteriana frente a SARM y EC O157:H7 en relación con el péptido libre.
- Los péptidos B1 y B2 presentaron una reducida actividad hemolítica en comparación con el péptido B2 encapsulado. Este aumento de la actividad hemolítica fue debida a la adición de PEI, que tiene una gran atracción por las membranas biológicas, en especial la eritrocitaria.

6 RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antibacteriana de los PAMs diseñados frente a otros microorganismos multirresistentes de importancia clínica como *Candida*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp* e *Histoplasma capsulatom*, entre otros.
- Determinar los posibles mecanismos de acción de los péptidos sintetizados debido a que su acción bacteriostática, puede deberse a la acción en la membrana bacteriana o en dianas intracelulares.
- Determinar la respuesta inmunológica inflamatoria de los péptidos mediante el monitoreo de la producción de citoquinas como la Interleukina 8 (IL-8) o factor de necrosis tumoral alfa (α -TNF) en línea celular o cultivo primario de macrófagos humanos.
- Evaluar *in silico* las interacciones de los PAM frente a los fosfolípidos de membrana en modelos de bacterias Gram negativa y Gram positiva.
- Probar otros métodos de síntesis de NPs de péptidos variando el procedimiento, el polímero y las condiciones, para lograr desarrollar NPs con actividad antimicrobiana y baja hemólisis.
- Realizar pruebas de resistencia de los péptidos frente a proteasas séricas en los péptidos libres y encapsulados, determinando la vida media de los mismos y los perfiles de liberación para estos últimos.

7 CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. *FISCHBACH, Michael; WALSH, Christopher.* Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. Vol. 325; 2009: pag. 1089-1093.
2. *ENGEMANN, John; CARMELI, Yehuda; COSGROVE, Sara y col.* Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 36; 2003: pag. 592-598.
3. *COSGROVE, Sara; Qi, Youlin; KAYE, Keith y col.* The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hospital Epidemiology*. Vol. 26; 2005: pag. 166 -174
4. *DELEO, Frank; OTTO, Michael; KREISWIRTH, Barry y col.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. Vol. 375; 2010: pag. 1557-1768.
5. *DELEO, Frank; OTTO, Michael; KREISWIRTH, Barry y col.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. Vol. 375; 2010: pag. 1557-1768.
6. *TEIXEIRA, Lenise; RESENDE, CA; ORMONDE, LR y col.* Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33; 1995: pag. 2400–2404.

7. OLIVEIRA, Duarte; TOMASZ, Alexander; LENCASTRE, Herminia. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *International Journal of Infectious Diseases*. Vol. 7; 2001: pag. 349–361.
8. VOYICH, Jovanka; BRAUGHTON, Kevin; STURDEVANT, Daniel y col. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *Journal of Immunology*. Vol. 175; 2005: pag: 3907–3919.
9. LI, Min; DIEP, Binh, VILLARUZ, Amer, y col. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PNAS USA*. Vol. 106; 2009: pag. 5883–5888.
10. BOUCHER, Helen; COREY, Ralph. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infection disease*. Vol. 45; 2008. pag. 5344-5349.
11. PRAY, Leslie. Antibiotic resistance, mutation rates and MRSA. *Nature Education* Vol 1:2008. Recurso online
12. STEFANI, Stefania; CHUNG Doo. Ryeon; LINDSAY, Jodi y col. *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*: global epidemiology and harmonization of typing models. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag 273 – 282

13. *GOMES, A; SANTOS, S; SOUSA M y col.* Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microbial Drug Resistance*. Vol. 1; 2001: pag. 23 – 32

14. *CRUZ, Cesar; MORENO, Jaime; RENZONI, Adriana y col.* Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): emergence of a new dominant clone. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 26; 2005: pag.457-462

15. *ARIAS Cesar; REYES, Jinnethe; ZÚÑIGA, Matías y col.* Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Vol. 51; 2003: pag. 59-68.

16. *ESPINOSA, Carmelo; CASTILLO, Juan; CORTES, Jorge y col.* Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. *Biomédica*. Vol. 31; 2011: pag. 27-34.

17. *GRUNDMANN, Hayo; AIRES-DE-SOUSA, Marta; BOYCE, John y col.* Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. Vol. 2; 2006: pag. 874 – 885

18. *MENG, Jianghong; ZHAO, Shaohua; DOYLE Michael, y col.* Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157: NM isolated from animals, food, and humans. *Journal of Food Protection*. Vol. 6; 1998: pag. 1511-1514.

19. *WILKERSON, Chris; SAMADPOUR, Mansour.* Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Humans and Bovines. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Vol. 48; 2004: pag. 1066–1067.
20. *RANGEL, Josefa; SPARLING, Phyllis, CROWE, Collen y col.* Emerging infectious diseases Vol. 11; 2005: pag. 603 – 609.
21. *NORIS, Marina; REMUZZI, Giuseppe.* Atypical hemolytic-uremic syndrome. *New England Journal of Medicine* Vol. 22; 2009: pag. 1676-87.
22. *DOYLE, Ellin; ARCHER, John; KASPAR, Charles y col.* Human Illness Caused by *E. coli*O157:H7 from Food and Non-food Sources. *Food Research Institute Briefings*. CDC. 2006: pag. 1-37.
23. *FUKUSHIMA, Hisao; HASHIZUME, Takao; MORITA, Yoshiki.* Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli*O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatric International*. Vol. 41; 1999: pag. 213–217.
24. *RELLER, M; GRIFFIN, P.* *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin–producing *E. coli*. *Infectious Diseases*, 3rd ed; Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia. 2004
25. *RIVAS, M; MILIWEBSKY, E; CHINEN, I y col.* Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 3; 2006: pag. 88-96.

26. *MATTAR; Salim, VÁSQUEZ Elizabeth*. *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 4; 1998: pag. 126–127.

27. *RÚGELES Laura Cristina, BAI Jing, MARTÍNEZ, Aida y col.* Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 3; 2010: pag. 282-286.

28. *GÓMEZ-DUARTE, Oscar; ARZUZA, Octavio; URBINA, Delfina, y col.* Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 7; 2010: pag. 199-206.

29. *REALPE, María Helena; MUÑOZ, Ángela; CHÁVEZ, José Antonio*. Manual de procedimientos para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de materia fecal. Instituto Nacional de Salud. Versión 00; 2011: pag 1 -16

30. *HANCOCK, Robert; SAHL, Hans Georg*. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. Vol. 24; 2006: pag. 1551–1557.

31. *STEINBERG, D; HURST, M; FUJII C y col.* Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 41; 1997: pag. 1738–1742.

32. *GIULIANI Andrea; PIRRI, Giovanna; NICOLETTO; Silvia*. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. Vol. 2; 2007: pag. 1 – 33.
33. *FEDDERS, Henning; PODSCHUN, Rainer; LEIPPE, Mathias*. The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 36; 2010: pag 264-266
34. *BROGDEN, Nicole; BROGDEN, Kim*. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 38; 2011: pag. 217-225.
35. *DESLOUCHES, Berthony; STECKBECK, Janathan; CRAIGO, Jodi y col.* Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 57; 2013: pag. 2511-2521.
36. *PUSHPANATHAN, Muthuirulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Rajendhran*. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides*. 2013; pag. 1-15.
37. *SHAI, Y.* From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Current Pharmaceutical Design*. Vol. 8; 2002: pag. 715-725.
38. *MANGONI, Maria; SAUGAR, Jose; DELLISANTI, Maria y col.* Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280; 2005: pag. 984- 990

39. *RIVAS L, LUQUE-ORTEGA J, ANDREU D.* Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *Biochimica et Biophysica. Acta – Biomembranes*, Vol. 1788; 2009: pag. 1570–1581
40. *DOSS, Monna; RUCHALA, Piotr; TECLE, Tesfadel y col.* Hapivirins and diprovirins: novel theta-defensin analogs with potent activity against influenza A virus. *Journal of Immunology* Vol. 188; 2012: pag. 2759–2768.
41. *LEE, Tzong; HALL Kristopher; AGUILAR Maria Isabel.* Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics Medicinal Chemistry*. Vol. 16; 2016: pag. 25-39.
42. *OPPENHEIM, Joost; YANG, De.* Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 17; 2005: pag. 359–365.
43. *BOWDISH, Dawn; DAVIDSON Donald; LAU, Elaine, y col.* Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 77; 2005: pag. 451–459
44. *BOWDISH, Dawn; DAVIDSON, Donald; Hancock Robert y col R.* A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Current Protein & Peptide Science*. Vol. 6; 2005: pag. 35–51.
45. *STEINSTRÄESSER, Lars; KRANEBURG, Ursula; Jacobsen, Frank y col.* Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, Vol. 216; 2011: pag. 322–333.
46. *SEMPLE, Fiona; DORIN, Julia.* Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more. *Journal of Innate Immunity* Vol. 4: 2012: pag. 337–348.

47. *SEMPLÉ, Fiona; DORIN, Julia*. Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more. *Journal of Innate Immunity* Vol. 4: 2012: pag. 337–348
48. *MARSHALL, Neil; ANDRUSZKIEWICZ, Ryszard; GUPTA Sona y col.* Structure activity relationships for a series of peptidomimetic antimicrobial prodrugs containing glutamine analogues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 51; 2003: pag. 821–831.
49. *FJELL, Christopher; HISS, Jan; HANCOCK, Robert y col.* Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 11; 2012: pag. 37-51
50. *SCUDIÉRO Olga; GALDIÉRO, Stefania; CANTISANI, Marco y col.* Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 54; 2010: pag. 2312-2322
51. *SCUDIÉRO Olga; GALDIÉRO Stefania; NIGRO Ersilia y col.* Chimeric beta-defensin analogs, including the novel 3NI analog, display salt-resistant antimicrobial activity and lack toxicity in human epithelial cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 57; 2013: pag. 1701-1708.
52. *SALMASO, Stefano; ELVASSORE, Nicola; BERTUCCO, Alberio y col.* Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 287; 2004: pag. 163–173.

53. *LIHONG, Lihong; KAIJIN Xu, HUAYING, Wang y col.* Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nature nanotechnology*. Vol. 4; 2009: pag. 457 – 463.
54. *URBÁN, Patricia; VALLE-DELGADO, José; MOLES, Ernest y col.* Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Current Drug Targets*. Vol 13; 2012: pag. 1158-1172.
55. *BRANDELLI, Adriano.* Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 12; 2012: pag. 731-739.
56. *GAZIT, Ehud.* Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews*. Vol. 36; 2007: pag. 1263–1269
57. *NORDSTRÖMA, Randi; MALMSTENA, Martin.* Delivery systems for antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 242; 2017: pag. 17–34
58. *ZASLOFF, Micheal.* Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. Vol. 415; 2002: pag. 389–395.
59. *HANCOCK, Robert; Scott Monisha.* The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS USA* Vol. 97; 2000: pag. 8856 – 8861.
60. *WANG, Zhe; WANG, G Guangshun.* APD: The antimicrobial Peptide database. *Nucleic Acids Research*. Vol. 32; 2004: pag. 590 – 592.

61. *JENSSEN, Havard; HAMILL, Pamela; HANCOCK, Robert*. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19; 2006: pag. 491-511
62. *LEE, Darin; HODGES, Robert*. Structure - activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. *Biopolymers*. Vol. 71; 2003: pag. 28 –48.
63. *MANT, C, Chen Y, HODGES R*. Temperature profiling of polypeptides in reversed - phase liquid chromatography. I. Monitoring of dimerization and unfolding of amphipathic alpha - helical peptides. *Journal of Chromatography. A*. Vol. 1009; 2003: pag 29 – 43
64. *SHAINI, Thomas; SHREYAS, Kamik; RAM, Shankar y col*. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*. Vol. 38; 2010: pag. D774-D780.
65. *PIOTTO, Stefano; SESSA, Lucia; CONCILIO, Simona y col*. YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag. 346-351
66. *XIAOWEI Zhao; HONGYU W, Wu; HAIRONG, Lu y col*. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *Plos One*. Vol.8; 2013: 1-6.
67. *WANG, Huaying; XU, Kaijin; LIU, Lihong y col*. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. *Biomaterials*. Vol. 31; 2010: pag. 2874-81

68. *YOUNT, Nannette; YEAMAN, Michael*. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *PNAS USA*. Vol. 11; 2004: pag. 101-119.
69. *YEAMAN, Michael; YOUNT, Nannette*. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacology Reviews*. Vol. 55; 2003: pag. 27 – 55.
70. *MATSUZAKI, Katsumi*. Why and how are peptide - lipid interactions utilized for self - defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica Biophysica. Acta*. 1462; 1999: pag. 1 – 10
71. *MATSUZAKI, Katsumi; MURASE Osumu; FUJII, Nobataka y col.* An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*. Vol. 35; 1996: pag. 11361–11368.
72. *TYTLER, Ewan; ANANTHARAMAIAH, G; WALKER, Donald y col.* Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry*. Vol. 34; 1995: pag. 4393–4401.
73. *TOSSI, Alessandro; SANDRI, Luca; GIANGASPERO, Anna*. Amphipathic, alpha - helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. Vol. 55; 2000: pag. 4 – 30.
74. *BROGDEN, Kim*. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 3; 2005: pag. 238–250.
75. *EHRENSTEIN, Gerald; LECAR, Harold*. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*. Vol. 10; 1977: pag. 1–34.

76. LEITGEB, Balataz; SZEKERES, Andras; MANCZINGER, Laszlo y col. The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 4; 2007: pag. 1027–1051.
77. MARSH, Derek. Orientation and peptide-lipid interactions of alamethicin incorporated in phospholipid membranes: polarized infrared and spin-label EPR spectroscopy. *Biochemistry*. Vol. 48; 2009: pag. 729–737.
78. DUCLOHIER, Herve. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Current Pharmaceutical Design* Vol. 16; 2010: pag. 3212–3223.
79. HENDERSON Michael y LEE Ka. Promising antimicrobial agents designed from natural peptide templates. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. Vol 17, 2013: pag 175 – 192.
80. LOHNER, Karl. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics*. Vol. 28; 2009: pag. 105–116.
81. ZASLOFF, Michael. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *PNAS USA*. Vol. 84; 1987: pag. 5449–5453.
82. LUDTKE, Steve; HE, Ke; HELLER, William y col. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*. Vol. 35; 1996: pag. 13723–13728.
83. ENGLER, Amanda; WIRADHARMA, Nikken; ONG, Zhan Yuin y col. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections. *Nano Today*. Vol. 7(3); 2012: pag 201–222.

84. *MOR, Amram; NGUYEN, Van; DELFOUR, Antoine y col.* Isolation, amino-acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* Vol. 30; 1991: pag. 8824–8830.
85. *POUNY, Yehinathan; RAPAPORT, Doron; MOR, Amram y col.* Interaction of antimicrobial Dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*. Vol. 31; 1992: pag. 12416–12423.
86. *HUANG, Huey.* Action of antimicrobial peptides: Two - state model. *Biochemistry*. Vol. 39; 2000: pag. 8347 – 8352.
87. *FATTAL, Elías; NIR, Shlomo; PARENTE, Roberta y col.* Pore -forming peptides induce rapid phospholipid flip - flop in membranes. *Biochemistry*. Vol. 33; 1994: pag. 6721 – 6731
88. *BRÖTZ, Hieke; BIERBAUM, Gabrielle; REYNOLDS, Peter y col.* The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 246; 1997, pag. 193-199
89. *SASS, Peter; JANSEN, Andrea; SZEKAT, Christiane y col.* The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Biomed Central (BMC) Microbiology*. Vol. 8 N°186; 2008. pag 1 – 11.
90. *MULLER, Anna; ULM, Hannah; REDER-CHRIST, Katrin y col.* Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. *Microbiology drug resistance*. Vol 18; 2012. Pag.261–270.

91. KRAGOL, Goran; LOVAS, Sandor; VARADI, Gyorgyi y col. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*. Vol. 40; 2001: pag. 3016-3026.
92. PESCHEL, Andreas; OTTO, Michael; JACK, Ralph y col. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 274 N°13: pag. 8405-8410.
93. PARK, Chan; KIM, Hun; KIM, Sun. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 244; 1998: pag 253–257.
94. CHO, Ju Hyun; SUNG, Bong; KIM Sun. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Acta 1788; 2009. pag 1564–1569.
95. YONEZAWA, Atsuo; KUWAHARA, Jun; FUJII, Nobutaka y col. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprint analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry*. Vol. 31; 1992. Pag: 2998 -3004.
96. MATHAVAN, Indran; BEIS, Konstantinos. The role of bacterial membrane proteins in the internalization of microcin MccJ25 and MccB17. *Biochemical society transactions*. Vol. 40; 2012: pag 1539–1543
97. GUSMAN, Heloisa; TRAVIS, James; HELMERHORST, Eva y col. Salivary Histatin 5 Is an Inhibitor of Both Host and Bacterial Enzymes Implicated in

Periodontal Disease. Infection and Immunity. Vol 69 N°3, 2001: pag 1402-1408.

98. *CONLON, J Michael; SONNEVEND, Agnes; DAVIDSON, Carlos, y col.* The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog *Ascaphus truei*. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 320; 2004: pag. 170-175.
99. *LEQUIN, Oiliver; LADRAM, Ali; CHABBERT, Ludovic y col.* Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. Biochemistry. Vol. 45; 2006: pag. 468-80
100. *BOMMINENI, Yugendar; DAI, Huaien; GONG, Yu-xi y col.* Fowlicidin-3 is an alpha-helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities. FEBS Journal. Vol. 274; 2007: pag. 418-28.
101. *LAI, Ren; ZHENG Young; SHEN Ji, y col.* Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. Peptides. Vol. 23; 2002: pag.427-35.
102. *CONLON, J Michael; SONNEVEND, Agnes; PATEL, Mahendra, y col.* A melittin - related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 306; 2003: pag. 496 – 500
103. *CORZO, G; ESCOUBAS, P; VILLEGAS, E, y col.* Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochemical Journal. Vol. 359; 2001: pag 35 – 45.

104. *SILPHADUANG, Umaporn; NOGA, Edward.* Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*. Vol. 414; 2001: pag. 268 – 269
105. *ORIVEL, Jerome; REDEKER, Virginia; LE CAER, Jean-Pierre, y col.* Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276; 2001: pag. 17823 – 17829
106. *GE, Yigong; MACDONALD, Dorothy; HOLROYD, Kenneth y col.* In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 43; 1999: pag. 782-788.
107. *ZHANG, Lijuan; PARENTE, Jody; Harris, Scott y col.* Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. Vol. 49; 2005: pag. 2921–2927.
108. *ZHENHUAN, Zhao; YIBAO, Ma, CHAO, Dai y col.* *Imcroporin*, a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 53; 2009: pag. 3472-3477.
109. *MENOUSEK, Joseph; MISHRA, Biswajit; HANKE, Mark, y col.* Database screening and in vivo efficacy of antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag. 402-406
110. *SARAVOLATZ, Louis; PAWLAK, Joan; JOHNSON, Leonard y col.* In vitro activities of LTX-109, a synthetic antimicrobial peptide, against methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, daptomycin-nonsusceptible, and linezolid-nonsusceptible *Staphylococcus*

- aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 56; 2012: pag. 4478-4482.
111. ANNAMALAI, Thirunavukkarasu; VENKITANARAYANAN, Kumar, HOAGLAND, Thomas y col. *Inactivation of Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes by PR-26, a synthetic antibacterial peptide. Journal of Food Protection*. Vol. 12; 2001: pag. 1929-1934.
112. CHROMEK, Milan; ARVIDSSON, Ida; KARPMAN, Diana. The antimicrobial peptide cathelicidin protects mice from Escherichia coli O157:H7-mediated disease. *PLoS One*. Vol. 7; 2012; pag. 1-8
113. CRUZ, Jennifer; ORTIZ, Claudia; TORRES, Rodrigo. Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic Escherichia coli. *Biopolymers*. Vol. 22; 2013: pag 1 – 30.
114. Zhang
115. BLAZYK, Jack; WIEGAND, Russell; KLEIN, Jason y col. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276; 2001; pag. 27899 – 27906.
116. ONG, Zhan; CHENG, Junchi; HUANG, Yuan y col. Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles. *Biomaterials*. Vol. 35; 2013: pag. 1315-1325.

117. WU, Hong; ONG ZHAN, Yuin; LIU, Shaoqiong y col. Synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles for treatment of fungal keratitis. *Biomaterials*. Vol. 43; 2015: Pages 44-49
118. BAHAR, Ali Adem; REN, Dacheng. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. Vol. 6; 2013: pag. 1543-1575.
119. JIN, Yi; HAMMER, Janet; PATE, Michelle y col. Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 49; 2005: pag. 4957 - 4964.
120. KIMMERLIN, T, SEEBACH D. '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies. *The Journal of Peptide Research*. Vol. 65; 2005: pag. 229 – 260.
121. GUZMÁN, Fanny. Síntesis de péptidos. *Genómica funcional y aplicaciones*. USM editorial. Capítulo 7; 2013: pag.121 – 138.
122. AMBLARD, Muriel; FEHRENTZ, Jean-Alain; MARTINEZ, Jean y col. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology*. Vol. 33; 2006: pag. 239-254.
123. FIELDS, Gregg; GUY, Cynthia. Cleavage and deprotection after Fmoc SPPS. *Journal of Peptide Research*. Vol. 67: (1997). ; pag, 1–3.
124. BARANY, George; ALBERICIO, Fernando. A three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 107; 1985: pag. 4936-4942.

125. NAVARRETE, Erandi Lira. Síntesis de péptidos. Manual de curso; Universidad Autonoma de Mexico. Instituto de Biotecnología. Cuernava; 2007: pag. 1-61.
126. SUBIRÓS-FUNOSAS, Ramon; PROHENS, Rafel; BARBAS, Rafael y col. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. Chemistry. Vol.15; 2009: pag.9394-9403.
127. EL-Faham; ALBERICIO, Fernando. COMU: a third generation of uranium type coupling reagents. Journal of Peptide Science Vol 16; 2010: pag 6-9.
128. GUZMÁN, Fanny; BARBERIS, Sonia; ILLANES, Aandres. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 10; 2007: pag. 279 – 314.
129. KRCHNAK, Victor; WÁGNER, Josef; LEBL, Michal, y col. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid–base indicator. Collection of Czechoslovak Chemical Communications. Vol. 53; 1988: pag. 2542–2548.
130. CHOI, H; ALDRICH, J. Comparison of methods of the Fmoc solid-phase synthesis and cleavage of a peptide containing both tryptophan and arginine. International Journal of Peptide and Protein Research. Vol. 42; 1993: pag. 58-63.

131. LUNA, Omar; Gómez, Johana; GUZMÁN, Fanny y col. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine?. *Molecules*. Vol. 15; pag. 1-12.
132. LÓPEZ, Alba. Desarrollo de nuevos péptidos sintéticos nanoestructurados basados en lactoferrina con potencial antibiótico frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). 2014: pag 7-96.
133. MAKOVITZKI, Arik, BARAM, Jonathan; SHAI, Yechiel. Antimicrobial lipopolypeptides composed of palmitoyl Di- and tricationic peptides: in vitro and in vivo activities, self-assembly to nanostructures, and a plausible mode of action. *Biochemistry*. Vol. 47; 2008; pag 10630 -10636.
134. CHEN, Cuixia, PAN Fang, ZHANG Shengzhong, y col. Antibacterial activities of short designer peptides: a link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization. *Biomacromolecules*. Vol. 11; 2010: pag. 402 -411
135. LUENGO, J; WEISS, B; SCHNEIDER M y col. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology*. Vol. 19; 2006: pag. 190-197.
136. NAGARWAL, Ramesh C; KANT, Shri; SINGH, PN y col. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. Vol. 136; 2009: pag. 2-13.

137. RYTTING, Erik; NGUYEN, Juliane; WANG, Xiaoying y col. Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. Vol. 5; 2008: pag. 629- 639
138. SHARMA, Shweta; PARMAR, Ankush; Kori, Shivpoojan y col. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015: pag. 1-27.
139. MAKADIA, HirenKumr; SIEGEL, Steven. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. Vol. 3; 2011: pag. 1377-1397.
140. WATER, Jorrit Jeroen; SMART, Simon; FRANZYK, Henrik; y col. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. Vol. 92; 2015, pag. 65-73.
141. CÁCERES, Marlon. Tesis: Síntesis de péptidos sintéticos con posible actividad antimicrobiana y estudio de su mecanismo de acción frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). 2015, pag. 7 – 133.
142. LI, Lili; WANG Qifeng; Li, HONGLI y col. Preparation, Characterization, *In Vitro* Release and Degradation of Cathelicidin-BF-30-PLGA Microspheres. *PLoS ONE*. Vol. 9; 2014: pag 1-7.
143. CHEREDDY, Kiran Kumar; HER, Charles-Henry; MOIA, Claudia y col. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *Journal of Controlled Release*. Vol. 194; 2014: pag. 138-147.

144. BALCÃO, Victor M; COSTA, Carla I. MATOS, Carla y col. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. *Food Hydrocolloids*. Vol. 32; 2013: Pag. 425-431.
145. PROMBUTARA, Pinitphon Kulwatthanasal; YOKRUETHAI; Supaka, SRAMALA, Nuttapun y col. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*. Vol. 24; 2012: pag. 184-190.
146. KUMAR, Amit; KOLAR, Satya; ZAO, Meriong y col. Localization of antimicrobial peptides on polymerized liposomes leading to their enhanced efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular bioSystems*. Vol 7; 2011: pag. 711–713.
147. RICCI, Maurizio; BLASI, Paolo; GIOVAGNOLI, Stefano y col. Leucinostatin-A loaded nanospheres: characterization and in vivo toxicity and efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutic*. Vol. 275; 2004, Pages 61-72.
148. RONDÓN, Paola; SIERRA, Daniel; TORRES, Rodrigo. Classification of Antimicrobial Peptides by Using the p-spectrum Kernel and Support Vector Machines. *Advances in Computational Biology. Proceedings of the 2nd Colombian Congress on Computational Biology and Bioinformatics (CCBCOL)*. Vol. 232; 2014: pag. 155-160.
149. SIEVERS, Fabian; WILM, Andreas, Dineen, David y col. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. Vol 11; 2011: pag. 1-6.

150. WALKER, J. M., Protocols, P. S., & Pennington, M. W. *Peptide Synthesis Protocols Methods in Molecular Biology* .Vol. 35; 1994: pag. 17–63.
151. GÓNGORA-BENÍTEZ, Miriam;TULLA-PUCHE Judit; PARADIS-BAS Marta y col Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclotide. *Biopolymers*. Vol. 96; 2011: pag. 69-80.
152. SANTANA, Paula; ÁLVAREZ, Claudio; GUZMÁN, Fanny y col. Development of a sandwich ELISA for quantifying hepcidin in Rainbow trout.*Fish Shellfish Immunology*. Vol 35; 2013: pag. 748-755.
153. ÁLVAREZ, Claudio; GUZMÁN, Fanny; CÁRDENAS, Constanza y col. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 3; 2014: pag 1-9.
154. DAVE, Keyur; HEADLAM, Madeleine; WALLIS, Tristan. y col. Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 16*(February), Unit 13.
155. KOCOURKOVÁ, Lucie; NOVOTNÁ Pavlina; ŠTOVÍČKOVÁ-HABARTOVÁ, Lucie y col. Vibrational and electronic circular dichroism as powerful tools for the conformational analysis of cationic antimicrobial peptides. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. Vol. 147; 2016: pag. 1439 - 1445.
156. WAYNE, P. (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993.

157. *ESPINEL-Ingroff, A; BARCHIESI, F; CUENCA-Estrella, M y col.* International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida spp.* to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43; 2005: pag. 3884-3889.
158. FOTHERGILL, Annette. Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents. Chapter 1. 2012: pag. 65–75.
159. PAREDES, Daissy; ORTIZ, Claudia; TORRES, Rodrigo. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*. Vol 9; 2014; 1717–1729.
160. *BELOKONEVA, Olga S; VILLEGAS, Elba; DAI, Li y col.* The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. Vol 1617; 2003: pag 22-30.
161. SOLANAS, Concepción, DE LA TORRE, Beatriz., FERNANDEZ-REYES, María y col. Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *Journal of medicinal chemistry*. Vol 52; 2009: pag. 664-674.
162. *EVANS, Brian C; NELSON, Christopher E; BEAVERS, Kelsey R y col.* Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of

- biomacromolecular drugs. Vol. 73; 2013: Journal of Visualized Experiments. Pag 1-5.
163. COHEN-SELA, Einat; CHORNY, Michael; KOROUKHOV, Nicholay y col. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 133; 2010 : pag. 90–95.
164. SHVERO, Dana; DAVIDI, Michael Perez; WEISS, Ervin y col. Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Materials Research*. Vol. 94B; 2010: pag. 367 – 371.
165. HOO, Christopher; STAROSTIN, Natasha; WEST, Pail.y col. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. Vol 10; 2008: pag. 89–96.
166. MATTISON, Kevin; MORFESIS, Anastasia; KASZUBA, Michael. *A Primer on Particle Sizing Using Dynamic Light Scattering*. American Biotechnology Laboratory. 2003: pag. 1-3.
167. XU, Renliang. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology* Vol. 18; 2015: pag. 11-21.
168. WIEBER, Alena, SELZER, Torsten; KREUTER, Jorg. Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug

delivery systems: a comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol 421; 2011: pag. 151–9.

169. AGUILAR, Maria Isabel. *HPLC of Peptides and proteins: Methods and protocols*. Vol. 251; 2004: pag. 3–10.

170. SILVA, Ana Luisa.; ROSALIA, Rodeny; SAZAK, A y col.. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: low-burst release is crucial for efficient CD8(+) T cell activation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e*. Vol. 83; 2012: pag. 338–345.

171. CRUZ, Jennifer; JAIR, Alexander, ORTIZ, Claudia y col. Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*. IOPSCIENCE. Vol 28; 2017: pag. 1-11.

172. CHEN, Yuxin; MANT, Colin, FARMER Susan, y col. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 13; 2005: pag. 12316-12329.

173. ZELEZETSKY, Igor; TOSSI, Alejandro. Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship

studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Vol 1758; 2006: pag.1436 – 1449.

174. HUH, Ae Jung; KWON, Young Jik. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. Vol. 156; 2011: pag. 128–145.
175. HERR, A; MOLHO, J; SANTIAGO, J y col. (2000). Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential. *Analytical Chemistry*. Vol 72; 2000: pag. 1053–1057.
176. WU, Libo; ZHANG, Jian; WATANABE, Wiwik. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 63; 2011: pag. 456–469.
177. MCPHEE, Joseph B; TAMBER, Sandeep; BRAZAS, Michelle y col. Antibiotic Resistance Due to Reduced Uptake. *Antimicrobial Drug Resistance*. Capítulo 9; 2009: pag.97-110.
178. BALMERT, Stephen C; ZMOLEK, Andrew C; GLOWACKI, Andrew J y col. Positive Charge of "Sticky" Peptides and Proteins Impedes Release From Negatively Charged PLGA Matrices. *Journal Materials Chemistry B*. Vol. 23; 2015: 4723-4734.
179. LUO, Rongcong; NEU, Björn; VENKATRAMAN, Subbu. Surface Functionalization of Nanoparticles to Control Cell Interactions and Drug Release. *Small*. Vol. 16; 2012: pag. 2585 - 2594

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, Maria Isabel. *HPLC of Peptides and proteins: Methods and protocols*. Vol. 251; 2004: pag. 3–10.

ALBERICIO, Fernando; KNEIB-CORDONIER, Nancy; BIANCALANA, Sara, y col. Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl) aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 55; 1990: pag. 3730-3743.

ÁLVAREZ, Claudio; GUZMÁN, Fanny; CÁRDENAS, Constanza y col. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 3; 2014: pag 1-9

AMBLARD, Muriel; FEHRENTZ, Jean-Alain; MARTINEZ, Jean y col. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology*. Vol. 33; 2006: pag. 239-254.

ANNAMALAI, Thirunavukkarasu; VENKITANARAYANAN, Kumar, HOAGLAND, Thomas y col. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by PR-26, a synthetic antibacterial peptide. *Journal of Food Protection*. Vol. 12; 2001: pag. 1929-1934.

ARIAS Cesar; REYES, Jinnethe; ZÚÑIGA, Matías y col. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Vol. 51; 2003: pag. 59-68.

BAHAR, Ali Adem; REN, Dacheng. Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals. Vol. 6; 2013: pag. 1543-1575.

BALCÃO, Victor M; COSTA, Carla I. MATOS, Carla y col. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. Food Hydrocolloids. Vol. 32; 2013: pag. 425-431.

BALMERT, Stephen C; ZMOLEK, Andrew C; GLOWACKI, Andrew J y col. Positive Charge of "Sticky" Peptides and Proteins Impedes Release From Negatively Charged PLGA Matrices. Journal Materials Chemistry B. Vol. 23; 2015: 4723-4734.

BARANY, George; ALBERICIO, Fernando. A three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. Journal of the American Chemical Society. Vol. 107; 1985: pag. 4936-4942.

BELOKONEVA, Olga S; VILLEGAS, Elba; DAI, Li y col. The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes. Vol 1617; 2003: pag 22-30.

BENÍTEZ, Miriam Góngora; TULLA-PUCHE, Julia; PARADÍS-BAS, Marta y col. Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclotide. Biopolymers. Vol 96; 2011: pag. 69-80.

BLAZYK, Jack; WIEGAND, Russell; KLEIN, Jason y col. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. Journal of Biological Chemistry. Vol. 276; 2001; pag. 27899 – 27906.

BOMMINENI, Yugendar; DAI, Huaien; GONG, Yu-xi y col. Fowlicidin-3 is an alpha-helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities. *FEBS Journal*. Vol. 274; 2007: pag. 418-28.

BOUCHER, Helen; COREY, Ralph. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infection disease*. Vol. 45; 2008. pag. 5344-5349.

BOWDISH, Dawn; DAVIDSON Donald; LAU, Elaine, y col. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 77; 2005: pag. 451–459

BOWDISH, Dawn; DAVIDSON, Donald; Hancock Robert y col R. A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Current Protein & Peptide Science*. Vol. 6; 2005: pag. 35–51.

BRANDELLI, Adriano. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 12; 2012: pag. 731-739.

BROGDEN, Nicole; BROGDEN, Kim. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 38; 2011: pag. 217-225

BROGDEN, Kim. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 3; 2005: pag. 238–250.

BRÖTZ, Hieke; BIERBAUM, Gabrielle; REYNOLDS, Peter y col. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 246; 1997, pag. 193-199.

CÁCERES, Marlon. Tesis: Síntesis de péptidos sintéticos con posible actividad antimicrobiana y estudio de su mecanismo de acción frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). 2015, pag. 7 - 133

CHASTRE, Jean. Evolving problems with resistant pathogens. *Clinical Microbiology Infections*. Vol. 3; 2008: pag 3-14.

CHEN, Cuixia, PAN Fang, ZHANG Shengzhong, y col. Antibacterial activities of short designer peptides: a link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization. *Biomacromolecules*. Vol. 11; 2010: pag. 402 -411

CHEN, Yuxin; MANT, Colin, FARMER Susan, y col. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 13; 2005: pag. 12316-12329.

CHEREDDY, Kiran Kumar; HER, Charles-Henry; MOIA, Claudia y col. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *Journal of Controlled Release*. Vol. 194; 2014: pag. 138-147

CHO, Ju Hyun; SUNG, Bong; KIM Sun. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Acta 1788; 2009. pag 1564–1569.

CHOI, H; ALDRICH, J. Comparison of methods of the Fmoc solid-phase synthesis and cleavage of a peptide containing both tryptophan and arginine. *International Journal of Peptide and Protein Research*. Vol. 42; 1993: pag. 58-63.

CHROMEK, Milan; ARVIDSSON, Ida; KARPMAN, Diana. The antimicrobial peptide cathelicidin protects mice from *Escherichia coli* O157:H7-mediated disease. *PLoS One*. Vol. 7; 2012; pag. 1-8

COHEN-SELA, Einat; CHORNY, Michael; KOROUKHOV, Nicholay y col. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 133; 2010 : pag. 90–95.

CONLON, J Michael; SONNEVEND, Agnes; PATEL, Mahendra, y col. A melittin - related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 306; 2003: pag. 496 – 500

CONLON, J Michael; SONNEVEND, Agnes; DAVIDSON, Carlos, y col. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog *Ascaphus truei*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 320; 2004: pag. 170-175.

CORZO, G; ESCOUBAS, P; VILLEGAS, E, y col. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*. Vol. 359; 2001: pag 35 – 45.

COSGROVE, Sara; SAKOULAS, George; PERENCEVICH, Eli y col. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 36; 2003: pag. 53-59

COSGROVE, Sara; Qi, Youlin; KAYE, Keith y col. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hospital Epidemiology*. Vol. 26; 2005: pag. 166 -174

CRUZ, Cesar; MORENO, Jaime; RENZONI, Adriana y col. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996-2003): emergence of a new dominant clone. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 26; 2005: pag.457-462.

CRUZ, Jennifer; ORTIZ, Claudia; TORRES, Rodrigo. Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biopolymers*. Vol. 22; 2013: pag 1 – 30.

DAVE, Keyur; HEADLAM, Madeleine; WALLIS, Tristan. y col. Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 16(February), Unit 13.

DELEO, Frank; OTTO, Michael; KREISWIRTH, Barry y col. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. Vol. 375; 2010: pag. 1557-1768.

DESLOUCHES, Berthony; STECKBECK, Janathan; CRAIGO, Jodi y col. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 57; 2013: pag. 2511-2521.

DOSS, Monna; RUCHALA, Piotr; TECLE, Tesfadel y col. Hapivirins and diprovirins: novel theta-defensin analogs with potent activity against influenza A virus. *Journal of Immunology* Vol. 188; 2012: pag. 2759–2768.

DOYLE, Ellin; ARCHER, John; KASPAR, Charles y col. Human Illness Caused by *E. coli*O157:H7 from Food and Non-food Sources. *Food Research Institute Briefings*. CDC. 2006: pag. 1-37.

DUCLOHIER, Herve. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Current Pharmaceutical Design* Vol. 16; 2010: pag. 3212–3223.

EL-Faham; ALBERICIO, Fernando. COMU: a third generation of uranium type coupling reagents. *Journal of Peptide Science* Vol 16; 2010: pag 6-9.

EHRENSTEIN; Gerald; LECAR, Harold. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*. Vol. 10; 1977: pag. 1–34.

ENGEMANN, John; CARMELI, Yehuda; COSGROVE, Sara y col. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 36; 2003: pag. 592-598.

ENGLER, Amanda; WIRADHARMA, Nikken; ONG, Zhan Yuin y col. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections. *Nano Today*. Vol. 7(3); 2012: pag 201–222.

ESPINEL-Ingroff, A; BARCHIESI, F; CUENCA-Estrella, M y col. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida spp.* to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43; 2005: pag. 3884-3889.

ESPINOSA, Carmelo; CASTILLO, Juan; CORTES, Jorge y col. Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. *Biomédica*. Vol. 31; 2011: pag. 27-34.

EVANS, Brian C; NELSON, Christopher E; BEAVERS, Kelsey R y col. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. Vol. 73; 2013: Journal of Visualized Experiments. Pag 1-5.

FAIRMAN, Robert; AKERFELDT, Karin. Peptides as novel smart materials. Current Opinion in structural biology. Vol. 15; 2004: pag 453-463

FATTAL, Elías; NIR, Shlomo; PARENTE, Roberta y col. Pore -forming peptides induce rapid phospholipid flip - flop in membranes. Biochemistry. Vol. 33; 1994: pag. 6721 – 6731

FEDDERS, Henning; PODSCHUN, Rainer; LEIPPE, Mathias. The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans. Internation Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 36; 2010: pag 264-266

FESSI, H; PUISIEUX, F; DEVISSAGUET, J y col. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Internacional Journal of Pharmaceutics. Vol. 55; 1989: pag. 1 – 4

FIELDS, Gregg; GUY, Cynthia. Cleavage and deprotection after Fmoc SPPS. Vol. 67: (1997). ; pag, 1–3.

FISCHBACH, Michael; WALSH, Christopher. Antibiotics for emerging pathogens. Science. Vol. 325; 2009: pag. 1089-1093.

FJELL, Christopher; HISS, Jan; HANCOCK, Robert y col. Designing antimicrobial peptides: form follows function. Nature Reviews Drug Discovery. Vol. 11; 2012: pag. 37-51

FUKUSHIMA, Hisao; HASHIZUME, Takao; MORITA, Yoshiki. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli*O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatric International*. Vol. 41; 1999: pag. 213–217

GAZIT, Ehud. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews*. Vol. 36; 2007: pag. 1263–1269

GE, Yigong; MACDONALD, Dorothy; HOLROYD, Kennethy col. In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 43; 1999: pag. 782-788.

GILES, Francis; RODRÍGUEZ, Roberto; WEISDORF Daniel y col. A phase III, randomized, double-blind, placebo controlled, study of iseganan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy. *Leukemia Research* Vol. 28; 2004: pag. 559–565

GUIHELMELLI, Fernanda; VILELA, Nathalia; ALBURQUENQUE, Patricia y col. Antibiotic development challenges: the various mechanism of action of antimicrobial peptides and bacterial resistance. *Frontiers in immunology*. Vol. 4; 2013. Pag 1-12

GIULIANI Andrea; PIRRI, Giovanna; NICOLETTO; Silvia. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. Vol. 2; 2007: pag. 1 – 33.

GOLDMAN, Mitchel; ANDERSON, G Mark; STOLZENBERG Ethan y col. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. Vol. 88; 1997: pag. 553–560.

GOMES, A; SANTOS, S; SOUSA M y col. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microbial Drug Resistance*. Vol. 1; 2001: pag. 23 – 32.

GÓMEZ-DUARTE, Oscar; ARZUZA, Octavio; URBINA, Delfina, y col. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 7; 2010: pag. 199-206.

GÓNGORA-BENÍTEZ, Miriam; TULLA-PUCHE Judit; PARADIS-BAS Marta y col. Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclootide. *Biopolymers*. Vol. 96; 2011: pag. 69-80.

Grundmann, Hayo; AIRES-DE-SOUSA, Marta; BOYCE, John y col. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. Vol. 2; 2006: pag. 874 – 885

GUSMAN, Heloisa; TRAVIS, James; HELMERHORST, Eva y col. Salivary Histatin 5 Is an Inhibitor of Both Host and Bacterial Enzymes Implicated in Periodontal Disease. *Infection and Immunity*. Vol 69 N°3, 2001: pag 1402-1408.

GUZMÁN, Fanny. Síntesis de péptidos. *Genómica funcional y aplicaciones*. USM editorial. Capítulo 7; 2013: pag.121 – 138.

GUZMÁN, Fanny; BARBERIS, Sonia; ILLANES, Aandres. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 10; 2007: pag. 279 - 314

HANCOCK, Robert; DIAMOND, Gill. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology*. Vol. 8; 2000: pag. 402 – 410.

HANCOCK, Robert; SAHL, Hans Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. Vol. 24; 2006: pag. 1551–1557.

HANCOCK, Robert; Scott Monisha. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS USA* Vol. 97; 2000: pag. 8856 – 8861.

HELMERHORST, Eva; REIJNDERS, Ingrid; HOF, Wilm y col. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*. Vol. 449; 1999: pag. 105–110.

HENDERSON Michael y LEE Ka. Promising antimicrobial agents designed from natural peptide templates. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. Vol 17, 2013: pag 175 – 192.

HERR, A; MOLHO, J; SANTIAGO, J y col. (2000). Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential. *Analytical Chemistry*. Vol 72; 2000: pag. 1053–1057.

HUANG, Huey. Action of antimicrobial peptides: Two - state model. *Biochemistry*. Vol. 39; 2000: pag. 8347 – 8352.

HUH, Ae Jung; KWON, Young Jik. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. Vol. 156; 2011: pag. 128–145.

ISHIHARA Tsutomu, KUBOTA Tetsushi, CHOI Tesu y col. Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 375; 2009b: pag. 148-154

ISHIHARA, Tsutomu; TAKAHASHI, Miyuki; HIGAKI Megumu y col. Efficient encapsulation of a water soluble corticosteroid in biodegradable nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 365; 2009: pag. 200-205.

JENSEN, Knud; PERNILLE, Pedersen; TOFTENG, Soren y col. Peptide synthesis and application. 2° Edition. *Methods in Molecular Biology*. Springer. Vol 1047; 2013: pag. 23-36.

JENSSEN, Havard; HAMILL, Pamela; HANCOCK, Robert. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19; 2006: pag. 491-511

JIN, Yi; HAMMER, Janet; PATE, Michelle y col. Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 49; 2005: pag. 4957 - 4964.

KELLY, Sharon; JESS, Thomas; PRICE, Nicholas y col. How to study proteins by circular dichroism?. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1751: 2005: pag. 119–139.

KIMMERLIN, T, SEEBACH D. '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies. *The Journal of Peptide Research*. Vol. 65; 2005: pag. 229 – 260.

KOCOURKOVÁ, Lucie; NOVOTNÁ Pavlina; ŠŤOVÍČKOVÁ-HABARTOVÁ, Lucie y col. Vibrational and electronic circular dichroism as powerful tools for the

conformational analysis of cationic antimicrobial peptides. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly. Vol. 147; 2016: pag. 1439 - 1445.

KRAGOL, Goran; LOVAS, Sandor; VARADI, Gyorgyi y col. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. Biochemistry. Vol. 40; 2001: pag. 3016-3026.

KRCHNAK, Victor; WÁGNER, Josef; LEBL, Michal, y col. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid–base indicator. Collection of Czechoslovak Chemical Communications. Vol. 53; 1988: pag. 2542–2548.

KUMAR, Amit; KOLAR, Satya; ZAO, Meriong y col. Localization of antimicrobial peptides on polymerized liposomes leading to their enhanced efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular bioSystems. Vol 7; 2011: pag. 711–713.

LAI, Ren; ZHENG Young; SHEN Ji, y col. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. Peptides. Vol. 23; 2002: pag.427-35.

LEE, Darin; HODGES, Robert. Structure - activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. Biopolymers. Vol. 71; 2003: pag. 28 –48

LEE, In; CHO, Yoon; LEHRER, RI. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. Infection and Immunity. Vol. 65; 1997: pag. 2898–2903.

LEE, Tzong; HALL Kristopher; AGUILAR Maria Isabel. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. Current Topics Medicinal Chemistry. Vol. 16; 2016: pag. 25-39.

LEITGEB, Balataz; SZEKERES, Andras; MANCZINGER, Laszlo y col. The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 4; 2007: pag. 1027–1051

LEQUIN, Oiliver; LADRAM, Ali; CHABBERT, Ludovic y col. Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. *Biochemistry*. Vol. 45; 2006: pag. 468-80

LEVIN, Michael;, QUINT, Peter; GOLDSTEIN, Bbrahm y col. Recombinant bacterial/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: A randomized trial. *Lancet*. Vol. 356; 2000: pag. 961–967

LI, Lili; WANG Qifeng; Li, HONGLI y col. Preparation, Characterization, *In Vitro* Release and Degradation of Cathelicidin-BF-30-PLGA Microspheres. *PLoS ONE*. Vol. 9; 2014: pag 1-7.

LI, Min; DIEP, Binh, VILLARUZ, Amer, y col. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PNAS USA*. Vol. 106; 2009: pag. 5883–5888

LIHONG, Lihong; KAIJIN Xu, HUAYING, Wang y col. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nature nanotechnology*. Vol. 4; 2009: pag. 457 – 463

LOHNER, Karl. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics*. Vol. 28; 2009: pag. 105–116.

LÓPEZ, Alba. Tesis: Desarrollo de nuevos péptidos sintéticos nanoestructurados basados en lactoferrina con potencial antibiótico frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). 2014: pag 7-96

LUDTKE, Steve; HE, Ke; HELLER, William y col. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*. Vol. 35; 1996: pag. 13723–13728.

LUENGO, J; WEISS, B; SCHNEIDER M y col. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology*. Vol. 19; 2006: pag. 190-197.

LUNA, Omar; Gómez, Johana; GUZMÁN, Fanny y col. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine?. *Molecules*. Vol. 15; pag. 1-12.

LUO, Rongcong; NEU; Björn; VENKATRAMAN, Subbu. Surface Functionalization of Nanoparticles to Control Cell Interactions and Drug Release. *Small*. Vol. 16; 2012: pag. 2585 - 2594

MAISETTA, Giuseppantonio; DI LUCA, Mariagrazia; ESIN, Semih y col. Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. *Peptides*. Vol. 29; 2008: pag. 1–6.

MANGONI, Maria; SAUGAR, Jose; DELLISANTI, Maria y col. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280; 2005: pag. 984- 990

MAPLE P; HAMILTON - Miller J; BRUMFITT W. World - wide antibiotic resistance in methicillin -resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. Vol. 1; 1989: pag. 537 – 540

MANT, C, Chen Y, HODGES R. Temperature profiling of polypeptides in reversed - phase liquid chromatography. I. Monitoring of dimerization and unfolding of amphipathic alpha - helical peptides. *Journal of Chromatography. A.* Vol. 1009; 2003: pag 29 - 43.

MANT, Colin; KONDEJEWSKI, Leslie; CACHIA, Paul y col. Analysis of synthetic peptides by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology.* 1997; Vol. 289: pag. 426-469

MANT, C; TRIPET, B; HODGES R. Temperature profiling of polypeptides in reversed - phase liquid chromatography. II. Monitoring of folding and stability of two - stranded alpha - helical coiled - coils. *Journal of Chromatography A.* Vol. 1009; 2003: pag 45 – 59.

MAKADIA, HirenKumr; SIEGEL, Steven. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* Vol. 3; 2011: pag. 1377-1397.

MAKOVITZKI, Arik, BARAM, Jonathan; SHAI, Yechiel. Antimicrobial lipopolypeptides composed of palmitoyl Di- and tricationic peptides: in vitro and in vivo activities, self-assembly to nanostructures, and a plausible mode of action. *Biochemistry.* Vol. 47; 2008; pag 10630 -10636.

MARSH, Derek. Orientation and peptide-lipid interactions of alamethicin incorporated in phospholipid membranes: polarized infrared and spin-label EPR spectroscopy. *Biochemistry.* Vol. 48;2009: pag. 729–737

MARSHALL, Neil; ANDRUSZKIEWICZ, Ryszard; GUPTA Sona y col. Structure activity relationships for a series of peptidomimetic antimicrobial prodrugs

containing glutamine analogues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 51; 2003: pag. 821–831.

MATHAVAN, Indran; BEIS, Konstantinos. The role of bacterial membrane proteins in the internalization of microcin MccJ25 and MccB17. *Biochemical society transactions*. Vol. 40; 2012: pag 1539–1543

MATSUZAKI, Katsumi. Why and how are peptide - lipid interactions utilized for self - defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica Biophysica. Acta*. 1462; 1999: pag. 1 – 10

MATSUZAKI, Katsumi; MURASE Osumu; FUJII, Nobataka y col. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*. Vol. 35; 1996: pag. 11361–11368

MATTAR; Salim, VÁSQUEZ Elizabeth. *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 4; 1998: pag. 126–127.

MCPHEE, Joseph B; TAMBER, Sandeep; BRAZAS, Michelle y col. Antibiotic Resistance Due to Reduced Uptake. *Antimicrobial Drug Resistance*. Capítulo 9; 2009: pag.97-110.

MENG, Jianghong; ZHAO, Shaohua; DOYLE Michael, y col. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157: NM isolated from animals, food, and humans. *Journal of Food Protection*. Vol. 6; 1998: pag. 1511-1514.

MENOUSEK, Joseph,; MISHRA, Biswajit; HANKE, Mark, y col. Database screening and in vivo efficacy of antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag. 402-406

MERRIFIELD, Bruce R. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 85; 1963: pag. 2149-2154.

MOR, Amram; NGUYEN, Van; DELFOUR, Antoine y col. Isolation, amino-acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* Vol. 30; 1991: pag. 8824–8830.

MOORE, Andrew. The big and small of drug discovery. Biotech versus pharma: Advantages and drawbacks in drug development. *EMBO Reports*. Vol. 4; 2003: pag. 114–117

MULLER, Anna; ULM, Hannah; REDER-CHRIST, Katrin y col. Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. *Microbiology drug resistance*. Vol 18; 2012. Pag.261–270.

NAGARWAL, Ramesh C; KANT, Shri; SINGH, PN y col. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. Vol. 136; 2009: pag. 2-13.

NAVARRETE, Erandi Lira. Síntesis de péptidos. Manual de curso; Universidad Autonoma de Mexico. Instituto de Biotecnología. Cuernava; 2007: pag. 1-61

NORDSTRÖMA, Randi; MALMSTENA, Martin. Delivery systems for antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 242; 2017: pag. 17–34

NORIS, Marina; REMUZZI, Giuseppe. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *New England Journal of Medicine* Vol. 22; 2009: pag. 1676-87.

OLIVEIRA, Duarte; TOMASZ, Alexander; LENCASTRE, Herminia. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *International Journal of Infectious Diseases*. Vol. 7; 2001: pag. 349–361.

ONG, Zhan; CHENG, Junchi; HUANG, Yuan y col. Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles. *Biomaterials*. Vol. 35; 2013: pag. 1315-1325.

OPPENHEIM, Joost; YANG, De. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 17; 2005: pag. 359–365.

ORIVEL, Jerome; REDEKER, Virginia; LE CAER, Jean-Pierre, y col. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276; 2001: pag. 17823 – 17829

PARK, Chan; KIM, Hun; KIM, Sun. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 244; 1998: pag 253–257.

PESCHEL, Andreas; OTTO, Michael; JACK, Ralph y col. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 274 N°13: pag. 8405-8410

PIOTTO, Stefano; SESSA, Lucia; CONCILIO, Simona y col. YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag. 346-351

POUNY, Yehinathan; RAPAPORT, Doron; MOR, Amram y col. Interaction of antimicrobial Dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*. Vol. 31; 1992: pag. 12416–12423.

POWERS, Jon; MARTIN, Morgan; GOOSNEY, Danika; y col. The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 50; 2006. pag. 1522 – 1524.

PRAY, Leslie. Antibiotic resistance, mutation rates and MRSA. *Nature Education* Vol 1:2008. Recurso online

PUSHPANATHAN, Muthuirulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Rajendhran. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides*. 2013; pag. 1-15

RAJAGONAL, Karthikan; SCHNEIDER, Joel. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Current Opinion in structural biology*. Vol. 14; 2004: pag 480 – 486.

RANGEL, Josefa; SPARLING, Phyllis, CROWE, Collen y col. Emerging infectious diseases Vol. 11; 2005: pag. 603 – 609.

REALPE, María Helena; MUÑOZ, Ángela; CHÁVEZ, José Antonio. Manual de procedimientos para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de materia fecal. Instituto Nacional de Salud. Versión 00; 2011: pag 1 -16

RELLER, M; GRIFFIN, P. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Infectious Diseases*, 3rd ed; Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia. 2004.

RICCI, Maurizio; BLASI, Paolo; GIOVAGNOLI, Stefano y col. Leucinostatin-A loaded nanospheres: characterization and in vivo toxicity and efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutic*. Vol. 275; 2004, Pages 61-72.

RIVAS L, LUQUE-ORTEGA J, ANDREU D. Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *Biochimica et Biophysica. Acta – Biomembranes*, Vol. 1788; 2009: pag. 1570–1581

RIVAS, M; MILIWEBSKY, E; CHINEN, I y col. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 3; 2006: pag. 88-96.

RONDÓN, Paola; SIERRA, Daniel; TORRES, Rodrigo. Classification of Antimicrobial Peptides by Using the p-spectrum Kernel and Support Vector Machines. *Advances in Computational Biology. Proceedings of the 2nd Colombian Congress on Computational Biology and Bioinformatics (CCBCOL)*. Vol. 232; 2014: pag. 155-160.

RÚGELES Laura Cristina, BAI Jing, MARTÍNEZ, Aida y col. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 3; 2010: pag. 282-286.

RYTTING, Erik; NGUYEN, Juliane; WANG, Xiaoying y col. Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. Vol. 5; 2008: pag. 629- 639.

SANTANA, Paula; ÁLVAREZ, Claudio; GUZMÁN, Fanny y col. Development of a sandwich ELISA for quantifying hepcidin in Rainbow trout. *Fish Shellfish Immunology*. Vol 35; 2013: pag. 748-755.

SAHL, Hans; BIERBAUM, Gabriele. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram - positive bacteria. Annual Reviews Microbiology. Vol. 52; 1998: pag. 41 – 79.

SASS, Peter; JANSEN, Andrea; SZEKAT, Christiane y col. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. Biomed Central (BMC) Microbiology. Vol. 8 N°186; 2008. pag 1 – 11.

SALMASO, Stefano; ELVASSORE, Nicola; BERTUCCO, Albero y col. Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 287; 2004: pag. 163–173.

SARAVOLATZ, Louis; PAWLAK, Joan; JOHNSON, Leonard y col. In vitro activities of LTX-109, a synthetic antimicrobial peptide, against methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, daptomycin-nonsusceptible, and linezolid-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 56; 2012: pag. 4478-4482.

SCUDIERO Olga; GALDIERO, Stefania; CANTISANI, Marco y col. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 54; 2010: pag. 2312-2322

SCUDIERO Olga; GALDIERO Stefania; NIGRO Ersilia y col. Chimeric beta-defensin analogs, including the novel 3NI analog, display salt-resistant antimicrobial activity and lack toxicity in human epithelial cell lines. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 57; 2013: pag. 1701-1708.

SEMPLE, Fiona; DORIN, Julia. Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more. *Journal of Innate Immunity* Vol. 4: 2012: pag. 337–348

SIEVERS, Fabian; WILM, Andreas, Dineen, David y col. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. Vol 11; 2011: pag. 1-6.

SHAI, Y. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Current Pharmaceutical Design*. Vol. 8; 2002: pag. 715-725.

SHAINI, Thomas; SHREYAS, Kamik; RAM, Shankar y col. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*. Vol. 38; 2010: pag. D774-D780.

SHARMA, Shweta; PARMAR, Ankush; Kori, Shivpoojan y col. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015: pag. 1-27.

SHVERO, Dana; DAVIDI, Michael Perez; WEISS, Ervin y col. Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Materials Research*. Vol. 94B; 2010: pag. 367 – 371.

SHIN, Song; Lee, Myung; HAHM, Kyung, y col. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *Journal of peptide research*. Vol. 53; 1999: pag. 82-90

SHIN, S; LEE, Seung; YANG, Sung y col. Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of alpha - helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. *Journal Peptide Research*. Vol. 58; 2001: pag. 504 – 514.

SILPHADUANG, Umaporn; NOGA, Edward. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*. Vol. 414; 2001: pag. 268 – 269

SOLONAS, Concepción; de la TORRE Beatriz G; FERNÁNDEZ – REYES, María Fernanda y col. Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by Dphenylalanine analogues at the β -turn. *Journal of medicinal chemistry*. Vol. 52; 2009: pag. 664 – 674.

SPLITH, Katrin; NEUNDORF, Ines. Antimicrobial peptides with cell penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal*. Vol. 40; 2011: pag. 387- 397

STANDING, Kenneth. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*. Vol. 13: 2003: pag. 595–601

STEFANI, Stefania; CHUNG Doo. Ryeon; LINDSAY, Jodi y col. *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*: global epidemiology and harmonization of typing models. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 39; 2012: pag 273 – 282

STEINBERG, D; HURST, M; FUJII C y col. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 41; 1997: pag. 1738–1742.

SUBIRÓS-FUNOSAS, Ramon; PROHENS, Rafel; BARBAS, Rafael y col. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBT and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry*. Vol.15; 2009: pag.9394-9403.

STEINSTRÆSSER, Lars; KRANEBURG, Ursula; Jacobsen, Frank y col. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, Vol. 216; 2011: pag. 322–333.

TEIXEIRA, Lenise; RESENDE, CA; ORMONDE, LR y col. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33; 1995: pag. 2400–2404.

TOSSI, Alessandro; SANDRI, Luca; GIANGASPERO, Anna. Amphipathic, alpha - helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. Vol. 55; 2000: pag. 4 – 30.

TYTLER, Ewan; ANANTHARAMAIAH, G; WALKER, Donald y col. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry*. Vol. 34; 1995: pag. 4393–4401

URBÁN, Patricia; VALLE-DELGADO, José; MOLES, Ernest y col. Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Current Drug Targets*. Vol 13; 2012: pag. 1158-1172

VOYICH, Jovanka; BRAUGHTON, Kevin; STURDEVANT, Daniel y col. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *Journal of Immunology*. Vol. 175; 2005: pag: 3907–3919.

WANG, Guangshun; Li, Xia; ZASLOFF, Michael. A database View of Naturally Occurring Antimicrobial Peptides: Nomenclature, Classification and Amino Acid Sequence Analysis. pag. 1-21 from Wang G. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies Advances in Molecular and Cellular Microbiology*. CABI; 2010: pag: 1- 420

WANG, Huaying; XU, Kaijin; LIU, Lihong y col. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. *Biomaterials*. Vol. 31; 2010: pag. 2874-81

WANG, Zhe; WANG, G Guangshun. APD: The antimicrobial Peptide database. *Nucleic Acids Research*. Vol. 32; 2004: pag. 590 – 592.

WATER, Jorrit Jeroen; SMART, Simon; FRANZYK, Henrik; y col. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. Vol. 92; 2015, pag. 65-73.

WAYNE, P. (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993.

WILKERSON, Chris; SAMADPOUR. Mansour. Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Humans and Bovines. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Vol. 48; 2004: pag. 1066–1067.

WU, Hong; ONG ZHAN, Yulin; LIU, Shaoqiong y col. Synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles for treatment of fungal keratitis. *Biomaterials*. Vol. 43; 2015: Pages 44-49

WU, Mahong; MAIER, Elke; BENZ, Roland, y col. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. Vol. 38; 1999: pag. 7235 – 7242.

WU, Libo; ZHANG, Jian; WATANABE, Wiyik. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 63; 2011: pag. 456–469.

XIAOWEI Zhao; HONGYU W, Wu; HAIRONG, Lu y col. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. Plos One. Vol.8; 2013: 1-6.

XU, Renliang. Light scattering: A review of particle characterization applications. Particuology Vol. 18; 2015: pag. 11-21.

YEAMAN, Michael; YOUNT, Nannette. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacology Reviews. Vol. 55; 2003: pag. 27 – 55.

YOMAYUSA, N; ÁLVAREZ, C; HERNANDEZ, P y col. Las infecciones por Staphylococcus aureus resistente a meticilina son un problema de salud pública. Revista Sanitas. Vol. 12; 2009: pag. 8-16

YONEZAWA, Atsuo; KUWAHARA, Jun; FUJII, Nobutaka y col. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprint analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. Biochemistry. Vol. 31; 1992. Pag: 2998 -3004.

YOUNT, Nannette; YEAMAN, Michael. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. PNAS USA. Vol. 11; 2004: pag. 101-119

ZASLOFF, Micheal. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. Vol. 415; 2002: pag. 389–395.

ZASLOFF, Michael. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. PNAS USA. Vol. 84; 1987: pag. 5449–5453.

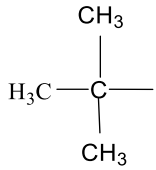
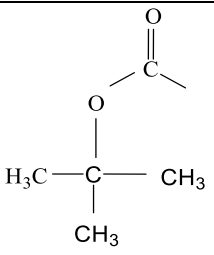
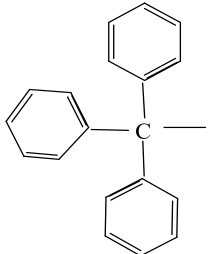
ZELEZETSKY, Igor; TOSSI, Alejandro. Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. Vol 1758; 2006: pag.1436 – 1449.

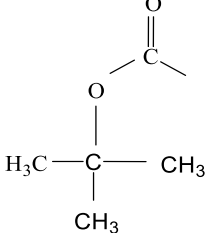
ZHANG, Lijuan; PARENTE, Jody; Harris, Scott y col. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. Antimicrobial Agents of Chemotherapy. Vol. 49; 2005: pag. 2921–2927.

*ZHENHUAN, Zhao; YIBAO, Ma, CHAO, Dai y col. Imcroporin, a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 53; 2009: pag. 3472-3477.*

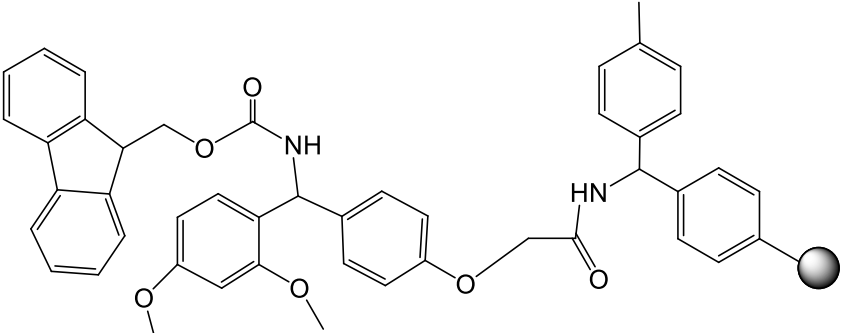
LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu. Todos los aminoácidos presente el grupo Fmoc en el grupo amino terminal. NP: no presenta.

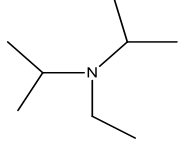
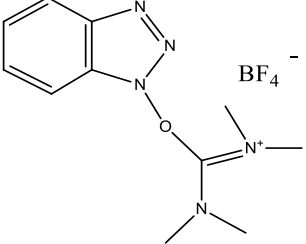
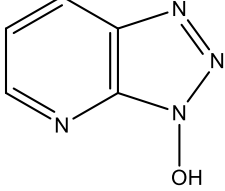
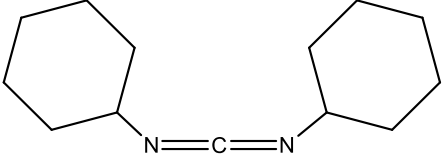
Protector	Aminoácido	Estructura
NP	Glicina, Gly, G Fmoc-Gly-OH	
tBu	Tirosina, Tyr, Y Fmoc-Tyr(tBu)-OH	
NP	Isoleucina, Ile, I Fmoc-Ile-OH	
NP	Alanina, Ala, A Fmoc-Ala-OH	
Boc	Triptófano, Trp, W Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Trt	Cisteína, Cys, C Fmoc-Cys(Trt)-OH	
NP	Leucina, Leu, L Fmoc-Leu-OH	

Boc	Lisina, Lys, K Fmoc-Lys(Boc)-OH	
NP	Valina, Val, V. Fmoc-Val-OH	
NP	Prolina, Prol, P Fmoc-Pro-OH	

Anexo B. Soporte sólido utilizado en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Nombre	Estructura
Resina Rink amida MBHA	

Anexo C. Agente de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc.

Nombre	Abreviación	Estructura
N,N'-diisopropiletilamina	DIPEA	
Tetrafluorobato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio	TBTU	
1-Hidroxi-7-azabenzotriazol	HOAt	
N, N'-díciclohexilcarbodiimida	DCC	

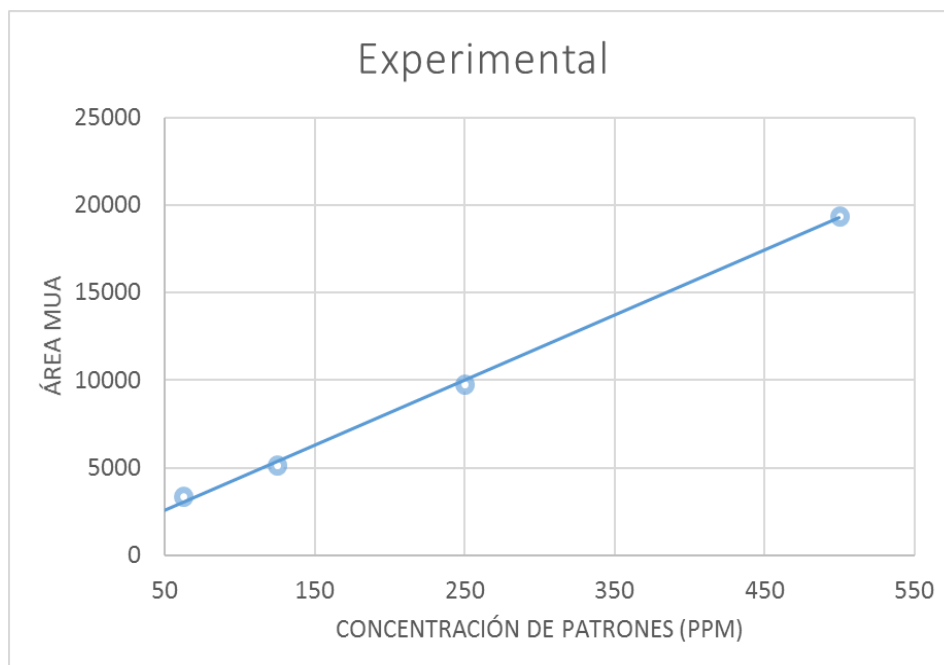
Anexo D. Tabla del número de acceso de las secuencias para los péptidos B y C, con identidad por encima del 85% de la base de datos de la NCBI.

Nº de acceso	Péptido	Origen
ABB05511.1	Salivaricina A (Lantibiotico)	<i>Streptococcus salivarium</i>
P0DJ03.1	Peptido HP1035	<i>Heterometrus petersii</i>
AAB27599.1	Protegrina -1	<i>Leucocito de porcino</i>
AAB27600	Protegrina -2	<i>Leucocito de porcino</i>
AAB27601	Protegrina -3	Leucocito de porcino
P49933	Protegrina -4	Leucocito de porcino
P49934.1	Protegrina -5	Leucocito de porcino

Fuente: NCBI Y UNIPROT

Anexo E. Patrón de 50 ppm de la curva de calibración del péptido B2. Fase estacionaria: Columna C- 18 Agilent y Fase móvil Isocrática: 70:30, ACN:H₂O con 0.01% (V/V) TFA a 220 nm.

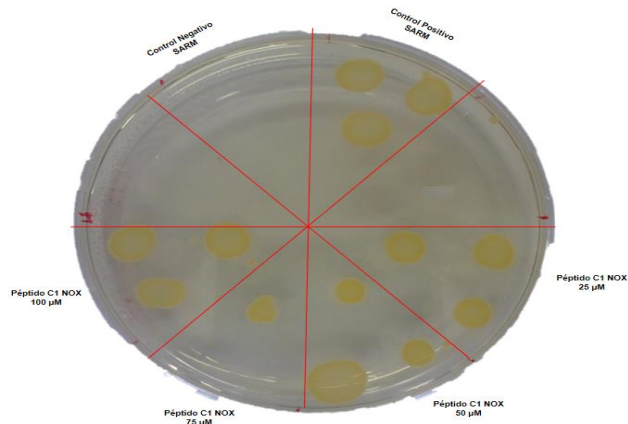
Curva de calibración



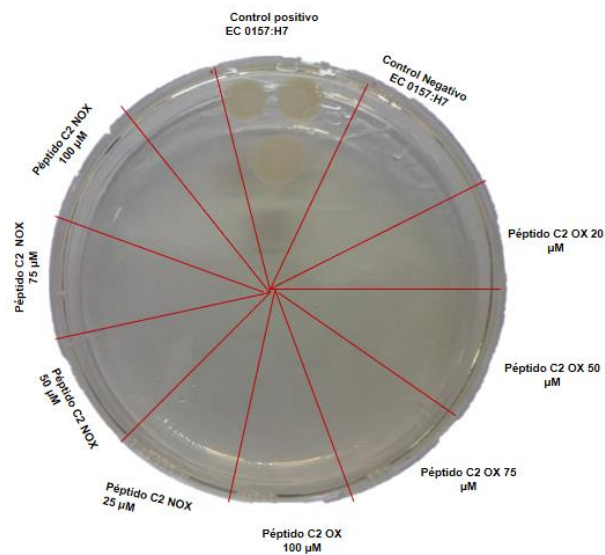
Ecuación: $y = 37.11 x + 716,5$ Regresión Lineal: $R^2 = 0.998$.

Nombre	Área (mAu*s)	Concentración (PPM)
Extracción	726.8	93.43

Anexo F. Determinación de la concentración mínima bactericida de C1 en cepas de SARM.

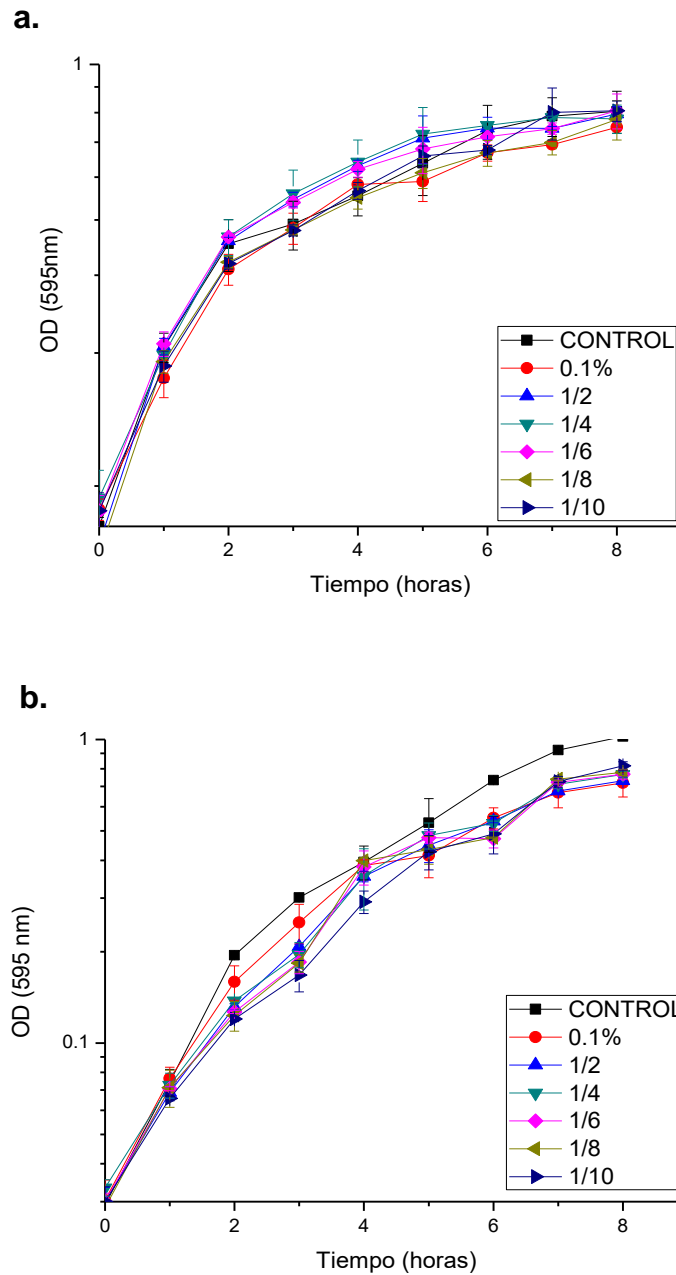


(a) Concentración mínima bactericida de C1 NOX en agar BHI. Actividad bacteriostática del péptido con respecto al control positivo y negativo.



(b) Concentración mínima bactericida de C2 NOX / C2 OX en agar BHI. Ambos estados del péptido presentaron actividad bactericida del péptido con respecto al control positivo y negativo.

Anexo G. Actividad antimicrobiana de Poloxamer a diferentes diluciones frente a:
a. *Escherichia coli* O157:H7, **b.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.
(Concentración inicial de poloxamer: 0.1% P/V).



Fuente: Tesis de pregrado Alba López (2014).

Anexo H. Cálculos del porcentaje de eficiencia de encapsulación del péptido B2 en polímero biodegradable de PLGA.

Concentración de péptido B2 en 100 del sobrenadante de las nanopartículas de PLGA

$$0.094 \frac{mg}{mL} * \frac{0.7mL}{0.1mL} = 0.66 mg/mL$$

Miligramos de péptido B2 encapsulado en las nanopartículas de PLGA.

$$0.66 \frac{mg}{mL} * 0.1 mL = 0.066 mg$$

Porcentaje de la eficiencia de encapsulación (% EE) del péptido B2 dentro de las nanopartículas de PLGA.

$$\% EE = 0.066 mg * \frac{100 \%}{1 mg} = 6.6 \%$$

Cantidad de péptido B2 cargado (PC) en las nanopartículas de PLGA

$$\% PC = \frac{0.066 mg \text{ peptido B2}}{25mg PLGA} = 2.64 \times 10^{-3} \text{ B2/PLGA}$$

Anexo I. Cálculo de porcentaje de inhibición de la población bacteriana de los PAM y nanopartículas de PLGA-B2.

Para determinar el porcentaje de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los péptidos libres y encapsulado frente a las cepas de estudio, se realizaron los cálculos del porcentaje de inhibición bacteriana (% IB) con la siguiente ecuación.

$$\% IB = 100 - \frac{(A_f - A_0) * 100}{A_{cf} - A_{co}}$$

Siendo,

A_f= Absorbancia final, tiempo de incubación donde la población bacteriana se encuentra en fase exponencial en presencia de los péptidos libres o encapsulado.

A₀= Absorbancia inicial, tiempo al comienzo de la incubación de la población bacteriana en presencia de los péptidos libres o encapsulado.

A_{cf}= Absorbancia control final, tiempo de incubación en el cual la población bacteriana se encuentra en fase exponencial en ausencia de péptidos libres o encapsulado.

A_{co}= Absorbancia control inicial, tiempo de incubación de la población bacteriana en ausencia de péptidos libres o encapsulado. .