

Estudio Proteómico De *Staphylococcus Aureus* Resistente
A Meticilina (Sarm) Y *Escherichia coli* O157:H7 Frente
A La Acción Del Péptido Sintético Antimicrobiano P19
En Forma Libre Y Nanoencapsulado

Nicolás Sebastián Emilio Gómez

Trabajo De Grado Para Optar El Título De
Magíster En Ciencias Básicas Biomédicas

Directora

Claudia Ortiz López
PhD Biocatálisis
Universidad Autonoma De Madrid

Codirector

Mauricio Urquiza Martínez
PhD Ciencias Química
Universidad Nacional De Colombia Oficial

Universidad Industrial De Santander
Facultad De Salud
Departamento De Ciencias Básicas
Maestría En Ciencias Básicas Biomédicas
Bucaramanga
2018

Dedicatoria

A mi madre, Martha Gómez, a Nathaly y a mi familia, quienes con su infinito amor y constante apoyo me permitieron alcanzar esta meta.

Agradecimientos

A mi madre, Martha Gomez, que con su apoyo, colaboración e infinito amor me acompaño durante el camino. A Nathaly Hernández, por su maravillosa compañía, motivación, aportes y colaboración en la conquista de este último paso, hacia la meta. A mi familia y amigos por todo su apoyo y valiosa ayuda.

A la profesora Claudia, que desde el primer día me brindo todo su apoyo y confio en mis capacidades, gracias por sus consejos, disposición, paciencia y por enriquecer mi proceso de formación como profesional.

A la Universidad Industrial de Santander por mi formación académica y por rodearme de gente grandiosa.

A la gran familia del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), son personas maravillosas.

Tabla de Contenido

Introducción	18
1. Marco Conceptual Y Antecedentes	21
1.1. <i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente A Meticilina (Sarm).....	21
1.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	23
1.3. Mecanismos De Resistencia Bacteriana A Los Antibióticos.....	25
1.4. Péptidos Antimicrobianos (Pams)	32
1.5. Sistemas De Transporte De Péptidos	36
1.6. Inducción De Resistencia Bacteriana Frente A Los Pams	40
1.7. Análisis Proteómico En <i>E. coli</i> Y <i>S. Aureus</i>	41
2. Pregunta De Investigacion	45
3. Objetivos	45
3.1. Objetivo General	45
3.2. Objetivos Específicos	45
4. Materiales Y Métodos	46
4.1. Características, Síntesis Y Purificación Del Péptido P19	48
4.2. Caracterización Del Péptido P19.....	50
4.3. Síntesis Del Péptido P19 Nanoestructurado	51
4.4. Caracterización Fisicoquímica Del Péptido P19 Nanoestructurado	52
4.5. Determinación De La Cmi Y Cmb Del P19 Libre Y Nanoencapsulado.....	53
4.6. Obtención De Cepas Patógenas Resistentes Al Péptido P19.....	55
4.7. Determinación De Cambios En El Perfil Proteómico De <i>E. coli</i> O157:H7 Y Sarm Sensibles Y Resistentes Al Péptido P19	55
5. Resultados Y Discusión	61
5.1. Síntesis Y Purificación Del Péptido P19.....	61
5.2. Caracterización Del Péptido P19.....	61
5.3. Síntesis Del Péptido P19 Nanoestructurado	64

5.4. Caracterización Físicoquímica Del Péptido P19 Nanoestructurado Con Plga.....	65
5.5. Determinación De La Cmi Y La Cmb Del P19 Libre Y Nanoencapsulado.....	72
5.6. Obtención De Cepas Resistentes Al Péptido P19.....	75
5.7. Determinación De Cambios En El Perfil Proteómico De <i>E. coli</i> O157:H7 Y Sarm Sensibles Y Resistentes Al Péptido P19.....	77
6. Conclusiones.....	129
7. Recomendaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
Bibliografía	131
Anexos	160

Lista de figuras

<i>Figura 1. Proceso de A/E de <i>E. coli</i> O157:H7 que consiste en la inducción de la adherencia íntima bacteriana, polimerización de actina, formación de pedestales en la superficie. Modificado de Kaper et al. 2004.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2 La exposición a antibióticos favorece la frecuencia del fenotipo resistente a los antibióticos, en un proceso de selección artificial, modificado de Smith et al. 2014.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 3 Mecanismos de adquisición de genes de resistencia. Tomado de Furuya y Lowy 2006.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 4 Mecanismos de resistencia comunes en bacterias. Tomado de (Bbosa et al. 2014).</i>	<i>29</i>
<i>Figura 5 Diversidad conformacional de los AMPs, α-hélice (a), β-plegados (b) y péptidos extendidos (c). Tomado de Nguyen et al. 2011.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 6 Los acontecimientos que ocurren en la membrana citoplasmática bacteriana después de la adsorción inicial de los PAMs. Los modelos clásicos de la destrucción de la membrana son: (A) de ruptura por barril, (B) de alfombra y (C) poro toroidal. Tomado de Bahar y Ren 2013.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 7 Sistemas de transporte que pueden ser utilizados para el transporte de múltiples sustancias activas como: fármacos, péptidos, proteínas, RNA y DNA. La hebra de RNA representa la forma en la que la nanopartícula puede transportar el principio activo. Tomado de Gavrillov y Saltzman 2012.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8 Composición de las nanopartículas poliméricas en aplicaciones biomédicas. (a). Marcador, son grupos que direccionan la nanopartículas hacia la diana terapéutica, pueden estar compuestos por anticuerpos, proteínas, azúcares y péptidos entre otros. (b). Cubierta, generalmente compuesto por polímeros capaces de mejorar su estabilidad y enmascarar la nanopartículas, permitiéndole aumentar el tiempo de circulación en sangre. (c). El núcleo, su naturaleza dicta el tipo de principio activo a encapsular con el objetivo de retener y estabilizar su carga. (d). La carga, que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y fármacos. Tomado de Elsabahy y Wooley 2012.</i>	<i>39</i>

<i>Figura 9</i> Análisis cromatográfico del péptido P19 por RP-HPLC utilizando una columna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB C18 equilibrada utilizando dos sistemas de solventes: H ₂ O con 0.1% TFA y ACN con 0.1% TFA. La detección se llevó a cabo por medición en UV ($\lambda=280$ nm).....	62
<i>Figura 10</i> Espectro de masas del péptido P19, utilizando una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), El péptido fue depositado en el target por el método de doble capa, es decir, una base de matriz saturada, seguida de la muestra y finalmente una segunda capa de matriz.....	63
<i>Figura 11</i> Espectro de dicroísmo circular del péptido P19 bajo condiciones simuladas de membrana en solución de TFE al 30% (v/v).	64
<i>Figura 12</i> Efecto del potencial zeta sobre el tamaño de la nanopartícula a diferentes concentraciones de P19/PLGA.	66
<i>Figura 13</i> Distribución de tamaño y carga superficial de las NPP19 caracterizadas en la relación de 8 μ g P19/ μ g PLGA por DLS y LDE. A) muestra el tamaño hidrodinámico, B) Muestra el potencial zeta.	67
<i>Figura 14</i> Micrografía de las NPP19 obtenida por micrografía electrónica de barrido (SEM), (A) Imagen general de la población de NPP19, (B) Muestra la morfología de las nanopartículas obtenidas.	68
<i>Figura 15</i> Efecto del potencial zeta sobre el tamaño de la nanopartícula a diferentes concentraciones de P19/PLGA.	69
<i>Figura 16</i> Posible distribución del péptido en la nanopartícula, es probable que la nanopartícula posea un centro acuoso con la capacidad de albergar una mayor cantidad de péptido.	70
<i>Figura 17</i> Relación de la eficiencia de encapsulamiento y la capacidad de carga del polímero.....	71
<i>Figura 18</i> Perfil de liberación acumulativo de NPP19, se tomaron muestras a diferentes tiempos hasta 48 horas.....	72
<i>Figura 19</i> Porcentaje de viabilidad de <i>E. coli</i> expuesta a diferentes concentraciones del péptido P19 libre y Nanoencapsulado (NPP19) durante 8h a 37°C con agitación de 200 rpm.....	73

<i>Figura 20</i> Porcentaje de viabilidad de SARM expuesta a diferentes concentraciones del péptido P19 libre y Nanoencapsulado(NPP19)-durante 8h a 37°C con agitación de 200 rpm.	74
<i>Figura 21</i> Cinética del aumento de la resistencia de <i>E. coli</i> a la exposición continua a concentraciones sub-inhedoras del péptido P19 por 50 generaciones.....	76
<i>Figura 22</i> Cinética del aumento de la resistencia de SARM a la exposición continua a concentraciones sub-inhedoras del péptido P19 por 50 generaciones.....	77
<i>Figura 23</i> Porcentaje de proteínas que alteraron su expresión en los diferentes experimentos en <i>E. coli</i> O157:H7 y SARM.....	79
<i>Figura 24</i> Volcano plot de los spots del Experimento 1: Control vs Tratamiento P19 <i>E. coli</i> O157H7. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.	80
<i>Figura 25</i> Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por <i>E. coli</i> O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software “Panther Classification System”.	84
<i>Figura 26</i> Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente <i>E. coli</i> O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19 (Tabla 6, Exp. 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. La línea punteada azul muestra las proteínas involucrada en la traducción y replicación. Los círculos en color amarillo punteado muestran las proteínas involucradas en los procesos de síntesis de componentes de pared celular.	85
<i>Figura 27</i> Volcano plot de los spots del Experimento 2: <i>E. coli</i> O157H7 Control vs Resistente al P19. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.	88

<i>Figura 28 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por E. coli O157:H7 resistente al péptido P19, clasificadas por el software “Panther Classification System”.</i>	92
<i>Figura 29 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente E. coli O157:H7 resistente al péptido P19 (Experimento 2) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Los círculos con líneas punteadas amarillas son proteínas de transporte.</i>	93
<i>Figura 30 Volcano plot de los spots del Experimento 3: NP Control vs NPP19 en E. coli O157H7. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.</i>	96
<i>Figura 31 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por E. coli O157:H7 al ser tratadas con NPP19, clasificadas por el software “Panther Classification System”.</i>	100
<i>Figura 32 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente E. coli O157:H7 al ser tratadas con NPP19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Las líneas punteadas con rojo se muestran las proteínas involucradas en procesos energéticos.</i>	101
<i>Figura 33 Volcano plot de los spots del Experimento 4: Control vs Tratamiento con P19 en SARM. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.</i>	104
<i>Figura 34 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por SARM al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software “Panther Classification System”.</i>	108

Figura 35 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en SARM al ser tratadas con el péptido P19 (Experimento 4) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Las zonas delimitadas por la línea punteada roja corresponden a proteínas involucradas en los procesos de replicación, transcripción y traducción. 109

Figura 36 Volcano plot de los spots del Experimento 5: SARM Control vs Resistente a P19. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda. 112

Figura 37 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por E. coli O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software "Panther Classification System". 116

Figura 38 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente E. coli O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. En las zonas delimitadas con la línea punteada azul y verde corresponden a proteínas involucradas en procesos de replicación, transcripción, y procesos de metabolismo energético, respectivamente...... 117

Figura 39 Volcano plot de los spots del Experimento 6: NP Control vs NPP19 en SARM. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda...... 121

Figura 40 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por SARM al ser tratadas con NPP19, clasificadas por el software "Panther Classification System". 126

Figura 41 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en SARM al ser tratadas con NPP19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha,

las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. La zona delimitada con azul corresponde a proteínas involucradas en procesos de reparación de ADN y traducción. Las proteínas en la zona delimitada con la línea verde corresponden a proteínas responsables de procesos de síntesis de componentes de membrana y pared celular. 127

Lista de tablas

<i>Tabla 1 Mecanismos de resistencia de E. coli y SARM frente a diferentes antibióticos. Tomado (Bbosa et al. 2014).</i>	30
<i>Tabla 2 Formulaciones comerciales basadas en sistemas de transporte poliméricos utilizando PLGA. Tomado de Van Der Walle 2011.</i>	40
<i>Tabla 3 Características general del péptido de los PAMs GIBIM-P5S9K y P19 ...</i>	48
<i>Tabla 4 Índice terapéutico del PAM P19 frente a E. coli O157:H7 y SARM, el CC₅₀ fue determinado en la línea celular COS-7 (ATCC ® CRL-1651™) de riñón de mono verde africano.</i>	51
<i>Tabla 5 Distribución de geles en los diferentes experimentos realizados con el péptido P19 frente a E. coli O157:H7 y SARM, cada imagen corresponde a un gel analizado.</i>	56
<i>Tabla 6 Resumen valores CMI₅₀, CMI₉₀ y CMB para E. coli y SARM expuestas al péptido P19 libre y nanoencapsulado.</i>	74
<i>Tabla 7 Resultados de generación de resistencia del PAM P19 en comparación con el fármaco Ciprofloxacina. Los resultados de la ciprofloxacina fueron extraídos de Charrier et al. 2016.</i>	77
<i>Tabla 8 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 1, Identificadas a partir de su huella peptídica obtenida mediante “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”.</i>	81
<i>Tabla 9 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 2, Identificadas a partir de su huella peptídica por “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”.</i>	89
<i>Tabla 10 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 3, Identificadas a partir de su huella peptídica por “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”.</i>	97
<i>Tabla 11 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 4, Identificadas a partir de su huella peptídica por “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”.</i>	105

Tabla 12 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 5, Identificadas a partir de su huella peptídica por “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”..... 113

Tabla 13 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 6, Identificadas a partir de su huella peptídica por “MASCOT Peptide Mass Fingerprint”..... 122

Resumen

Título: Estudio Proteómico De Staphylococcus Aureus Resistente A Meticilina (Sarm) Y *Escherichia coli* O157:H7 Frente A La Acción Del Péptido Sintético Antibacteriano P19 En Forma Libre Y Nanoencapsulado.

Autor: Nicolás Gómez Sequeda**

Palabras Clave: Proteomica, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, Nanopartículas, Péptidos Antimicrobianos, Resistencia Antibiótica.

Descripción:

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina (SARM) están entre las bacterias con las tasas más altas de resistencia antibiotica, que representan la mayor amenaza para la salud pública mundial según la OMS. En este sentido, los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) son una opción terapéutica prometedora frente a la proliferación de patógenos resistentes, debido a su acción antibacterial rápida y directa. En este trabajo se estudió el perfil proteómico de *E. coli* O157:H7 y SARM sensible y resistente al péptido sintético P19 libre y nanoencapsulado, el cual fue escogido como péptido modelo debido a su gran actividad antibacteriana frente a SARM y *E. coli*. El péptido P19 fue diseñado y sintetizado en fase sólida empleando la estrategia Fmoc/tBu. Posteriormente, fue encapsulado en PLGA (NPP19) por el método de DES-D, las NPP19 fueron caracterizadas por DLS, se encontraron tamaños hidrodinámicos de $292,3 \pm 3,67\text{nm}$ y porcentaje de encapsulamiento superior al $90,5 \pm 0,9\%$. La CMI_{50} del péptido P19 libre contra *E. coli* O157:H7 y SARM fue de 12.5 y 1.5 μM respectivamente, mientras que para el NPP19 fue 4 veces superior (3.13 μM) en *E. coli* y 2 veces superior (0.7 μM) para SARM. Finalmente, se analizaron los cambios en el perfil proteómico por medio de 2D-PAGE y MALDI-TOF en *E. coli* O157:H7 y SARM tratadas con el PAM libre y nanoencapsulado. Por medio de esta metodología, se logró identificar un posible blanco de acción del P19 a nivel celular, inhibiendo la proteína murG, la cual es una glucosiltransferasa bacteriana que está involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano. Esta enzima está presente en todos los organismos que sintetizan peptidoglicano y es uno de los principales objetivos para el diseño de nuevos antibióticos. Sin embargo, estos resultados deben corroborarse por medio de técnicas moleculares complementarias.

*Trabajo de grado Msc. Ciencias Básicas Biomédicas UIS

**Universidad Industrial de Santander, Facultad de medicina, Departamento de Ciencias Basicas.
Directora PhD Claudia Ortiz López, Codirector PhD Mauricio Urquiza Martínez.

Abstract

Title: Proteomic Study Of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (Mrsa) And *Escherichia coli* O157:H7 Against The Antibacterial Synthetic Peptide P19 Free And Nanoencapsulated.

Authors: Nicolás Gómez Sequeda**.

Keywords: Proteomics, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, Nanoparticles, Antimicrobial Peptides, Antibiotic Resistance.

Description:

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin (MRSA) are among the bacteria with the highest rates of antibiotic resistance, and represent a serious threat to global public health according to WHO. In this sense, Antimicrobial Peptides (PAMs) are a promising therapeutic option against the proliferation of resistant pathogens, due to their fast and direct antibacterial action. In this work we studied the proteomic profile of *E. coli* O157: H7 and MRSA sensitive and resistant to the synthetic peptide P19 free and nanoencapsulated, which was chosen as a model peptide due to its high antibacterial activity against MRSA and *E. coli*. P19 was designed and synthesized in solid phase using the Fmoc / tBu strategy. After it was encapsulated in PLGA (NPP19) by the DES-D method, NPP19 were characterized by DLS and HPLC. The hydrodynamic size was $292.3 \pm 3.67\text{nm}$ and the encapsulation efficiency was higher than $90.5 \pm 0.9\%$. The MIC_{50} of the free P19 peptide against *E. coli* O157: H7 and MRSA was 12.5 and 1.5 μM respectively, while NPP19 was 4 times higher (3.13 μM) in *E. coli* and 2 times higher (0.7 μM) for MRSA. Finally, changes in the proteomic profile were analyzed by 2D-PAGE and MALDI-TOF in *E. coli* O157: H7 and MRSA treated with P19 in free and nanoencapsulated form. By this methodology, it was possible to identify a possible cellular target of P19 at the cellular level, by inhibiting the murG protein, which is a bacterial glucosyltransferase that is involved in the biosynthesis of peptidoglycan. This enzyme is present in all organisms that synthesize peptidoglycan and is one of the main targets for the design of new antibiotics. However, these results must be corroborated by means of complementary molecular techniques.

*Msc. Student in Basic Biomedical Sciences UIS

**Universidad Industrial de Santander, School of Medicine, Department of Basic Sciences
Thesis Director Claudia Ortiz López PhD, Co-director Mauricio Urquiza Martínez PhD.

Introducción

El descubrimiento y desarrollo de los antibióticos constituyó un punto de inflexión en la historia de la humanidad, mejorando la calidad de vida de formas antes inimaginables (Davies y Davies 2010). Además de su uso en enfermedades infecciosas, los antibióticos permitieron el desarrollo de procedimientos quirúrgicos avanzados como trasplantes de órganos o implantes prostéticos, logrando disminuir del 40 al 2% las infecciones relacionadas con el tratamiento (Wallace *et al.* 2000). Sin embargo, el abuso de estos medicamentos no solo en el ámbito médico (Wang *et al.* 2017) sino también en la cría industrial de animales (Phillips *et al.* 2004; Hoelzer *et al.* 2017), ha conducido al surgimiento de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos que son uno de los problemas de salud pública más graves de este siglo, a pesar de los continuos esfuerzos en la lucha contra su propagación (Smith *et al.* 2014; Leonard *et al.* 2015).

A partir de los datos proporcionados por 114 países, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lista a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina (SARM) entre las bacterias con las tasas más altas de resistencia que representan la mayor amenaza para la salud pública mundial (Kang *et al.* 2014). Estos patógenos son responsables de la mayoría de infecciones nosocomiales y asociadas a la comunidad (CDC 2013; Bauer y Sampathkumar 2017), ocupando el primer y segundo lugar entre los patógenos farmacorresistentes más comunes con el 15 y 12% del total de casos respectivamente (Weiner *et al.* 2016).

E. coli O157:H7 es reconocida como la mayor causante de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) la cual tiene altas tasas de mortalidad y afecta principalmente a niños menores de 5 años, siendo esta la segunda causa única de muerte después de las infecciones respiratorias (Black *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015). Por otra parte, SARM es responsable del 50% de las infecciones del tracto urinario asociadas al catéter, el 52% de las bacteriemias asociadas a la vía central, el 42% de las neumonías asociadas a respirador y el 43% de las infecciones quirúrgicas (Weiner *et al.* 2016).

Por lo tanto, resulta de gran relevancia la búsqueda y desarrollo de compuestos antibióticos alternativos que actúen sobre nuevas dianas microbiológicas (Gordon *et al.* 2005). En este sentido, ha surgido un gran interés en los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) los cuales representan una opción terapéutica prometedora frente a la proliferación de patógenos resistentes a los antibióticos (Hof *et al.* 2001; Marr *et al.* 2006; Huang *et al.* 2010). Los PAMs hacen parte esencial del mecanismo de defensa primitivo presente en animales, insectos y plantas. Entre las principales ventajas que ofrecen los PAMs son: (i) actividad amplia e inespecífica actuando sobre una gran variedad de microorganismos como bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y virus (Andreu y Rivas 1998; Jenssen *et al.* 2006; Moghaddam *et al.* 2015). (ii) Su acción rápida y directa permite eliminar los microorganismos segundos después del contacto inicial con la membrana bacteriana (Loeffler *et al.* 2001; Jenssen *et al.* 2006; Aoki *et al.* 2012; Kang *et al.* 2014). (iii) La estructura de bicapa lipídica de las membranas bacterianas limitan el desarrollo de una resistencia completa contra los PAMs como si sucede con los antibióticos convencionales (Bahar y Ren 2013).

Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas la utilización de los PAMs en clínica se ha limitado debido a: la baja estabilidad en sangre (Jenssen y Aspino 2008), alta actividad hemolítica (Helmerhorst *et al.* 1999), desactivación por altas concentraciones de sal (Bals *et al.* 1998), su amplio espectro de acción puede resultar contraproducente al eliminar sin distinción tanto bacterias patógenas como benéficas (Aoki *et al.* 2012), y finalmente a pesar de la dificultad de las bacterias para desarrollar resistencia a los PAMs, se encuentran múltiples ejemplos de PAMs a los que patógenos como *E. coli* y SARM han desarrollado resistencia (Gänzle *et al.* 1999; Ouhara *et al.* 2008; Sun *et al.* 2009; Sakoulas *et al.* 2014); entre ellos los péptidos LL-37, la lactoferrina y la nisina, que han sido los PAMs naturales más estudiados (Mahlpuu *et al.* 2016).

Por lo tanto, se han explorado alternativas como la nanoencapsulación en polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico coglicólico (PLGA), de los cuales se ha demostrado la capacidad de protección del principio activo, aumento de la estabilidad en sangre, disminución de la citotoxicidad e incluso aumento de la actividad

antimicrobiana (Brandelli 2012; Ron-Doitch *et al.* 2016; Cruz *et al.* 2017). Además de la nanoencapsulación, también se ha planteado un nuevo enfoque el cual contrasta con el de aislar y/o modificar PAMs naturales. Este enfoque plantea el diseño de nuevas secuencias, utilizando como base las características comunes de PAMs conocidos, su mecanismo de acción y posibles mecanismos de resistencia. De este modo, la modificación de las secuencias aminoacídicas, ha permitido ampliar su acción sobre nuevos blancos moleculares (Aoki *et al.* 2012; Cruz *et al.* 2013; Steckbeck *et al.* 2014).

Por lo tanto, conocer el mecanismo de resistencia bacteriano y el mecanismo de acción de los PAMs es crucial para el diseño de nuevas series de péptidos (Pérez-Llarena y Bou 2016). En este aspecto, la proteómica permite detectar cambios globales en los perfiles proteicos asociados al mecanismo de acción de los PAMs mediante el uso de técnicas de alta resolución como la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas (Jungblut *et al.* 2008). De esta manera, permite comprender mejor la biología de patógenos que no podrían ser investigados mediante estudios reduccionistas o incluso genómicos (por ejemplo, modificaciones proteicas postraduccionales, localización de proteínas subcelulares y tasas de renovación de proteínas) (Chao y Hansmeier 2012).

El PAM P19 fue diseñado por investigadores del GIBIM mediante herramientas bioinformáticas y de biología estructural (Rondon-Villarreal *et al.* 2014). Este péptido surge a partir de la modificación de la secuencia aminoacídica del péptido GIBIM-P5S9K (Cruz *et al.* 2017), el cual ha sido caracterizado como uno de los mejores en relación con sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Su actividad antimicrobiana fue probada frente *in vitro* frente a *E. coli* y SARM y la secuencia está en curso de patente.

Debido a lo anterior, en este proyecto se estudió el perfil proteómico de *E. coli* O157:H7 y SARM sensible y resistente al péptido sintético P19, el cual fue escogido como péptido modelo debido a su gran actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomona aureginosa*. Este PAM fue diseñado por investigadores del GIBIM

mediante herramientas bioinformáticas y de biología estructural a partir de la secuencia aminoácidica del péptido GIBIM-P5S9K (Cruz et al. 2017), con sustituciones en aminoácidos clave con el objetivo de mejorar su estabilidad y actividad. También se analizó el efecto de la nanoencapsulación en PLGA sobre el perfil proteómico bacteriano, el cual ha sido muy poco estudiado en este campo. Los resultados obtenidos brindan información valiosa que puede ser útil para mejorar el diseño de nuevas series de péptidos sintéticos antimicrobianos que sean más estables y activos; y a su vez, sugerir posibles nuevos blancos bacterianos con potencial terapéutico contra estas cepas patógenas.

1. Marco conceptual y antecedentes

1.1. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

S. aureus es una bacteria Gram positiva que ha colonizado de manera estable las fosas nasales, piel y pirineo de aproximadamente un tercio de la población humana, mientras que el otro tercio es colonizado de forma intermitente (Vanbelkum et al. 2009). Fue inicialmente aislado por Alexander Ogston del quien se refirió a esta bacteria como *Micrococcus* (Ogston 1881). Sin embargo, su apariencia esférica y agrupaciones en forma de racimo de uvas (*Staphyle* en Griego) fueron determinantes para su nombre final “*Staphy-lococcus*”, distinguiéndolo de esta manera de otras bacterias que infectan heridas quirúrgicas como el *Streptococcus* (Ogston 1882). Posteriormente, Rosenbach diferenció los aislados humanos por la coloración de sus colonias, y propuso la nomenclatura actual, *Staphylococcus aureus* para las colonias amarillas y *Staphylococcus albus* para las blancas (Rosenbach 1884).

Las enfermedades causadas por *S. aureus* van desde infecciones menores de la piel y tejidos blandos hasta enfermedades invasivas que amenazan la vida, tales como endocarditis, osteomielitis, neumonía y septicemia (Leng et al. 2011). Esto se debe a una amplia gama de factores de virulencia como hemolisinas, leucocidinas, proteasas, enterotoxinas, toxinas exfoliativas y factores inmunomoduladores que le permiten

adherirse a la superficie, invadir, o evitar el sistema inmune y causar efectos tóxicos nocivos para el huésped (Bien *et al.* 2011).

Las infecciones causadas por *S. aureus* se pueden dividir en tres tipos: lesiones superficiales; toxinosis como intoxicación por alimentos, síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock tóxico; y finalmente condiciones sistémicas potencialmente mortales como endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemia (Aires De Sousa y De Lencastre 2004).

La infección con cepas patógenas de *S. aureus* es difícil de prevenir o tratar de manera efectiva, debido a la aparición y propagación de cepas resistentes a diferentes medicamentos (Kurlenda y Grinholc 2012). De esta manera, *S. aureus* y específicamente SARM se ha convertido en una de las mayores causas de infecciones nosocomiales a nivel mundial (Khan *et al.* 2017; Busl 2017), representando altos costos hospitalarios, largos periodos de hospitalización, y elevada morbilidad y mortalidad (Shalini *et al.* 2015).

SARM fue descubierto en Gran Bretaña a comienzos de los 60s, justo después de que los β -lactámicos fueran introducidos para uso clínico contra *Staphylococcus* (Çetin y Ang 1962). Sin embargo, los problemas asociados con las infecciones por SARM no son sólo la resistencia a los β -lactámicos, sino también en algunos casos su falta de susceptibilidad frente a otros fármacos antibacterianos como gentamicina, clindamicina, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, fluoroquinolonas (Kurlenda y Grinholc 2012). Recientemente con la aparición de cepas resistentes a la vancomicina (fármaco actual de elección para el tratamiento de SARM), se limitan aún más los tratamientos efectivos para combatir este patógeno (Al-Mebairik *et al.* 2016).

SARM ha incrementado su incidencia en todo el mundo durante los últimos veinte años (Mahmood *et al.* 2010), convirtiéndose en el microorganismo resistente a los antibióticos más frecuentemente identificado y la principal causa de infecciones nosocomiales y comunitarias a nivel mundial (Diekema *et al.* 1999; Grundmann *et al.* 2006; Jenkins 2017; Choo 2017). Esto se debe a la facilidad con la que puede desarrollar

mecanismos eficientes para neutralizar nuevos antibióticos y circular en el entorno (Lowy 2003; Spellberg *et al.* 2008).

En Colombia SARM también presenta alta incidencia. Al menos una cuarta parte del total de las infecciones registradas en el país corresponde a esta cepa patógena, llegando a ser mortal en poblaciones vulnerables y pacientes de unidades de cuidados intensivos (DeLeo *et al.* 2010). Asimismo, cabe resaltar que en el año 2010 se observó una mayor proporción de aislamientos de SARM multiresistentes frente a fármacos como la ciprofloxacina, tetraciclina, trimetropim sulfametoxazol y gentamicina en Bucaramanga, en comparación con los resultados obtenidos en estudios realizados en otras ciudades de latinoamericanas (Paganini *et al.* 2009; Rozenbaum *et al.* 2009; Sosa Ávila *et al.* 2010).

1.2. *Escherichia coli* O157:H7

Theodor Escherich informó por primera vez el aislamiento y la caracterización de bacilos cortos y delgados en las heces de bebé, a los que denominó “*Bacterium coli commune*” en su publicación de 1885 (Escherich 1885). Más de 125 años después, en 1954, el nombre de *Escherichia coli* fue completamente reconocido (Cowan 1954). *E. coli* es una bacteria Gram negativa presente en la capa mucosa del colon de mamíferos, donde es un competidor altamente exitoso, convirtiéndose en la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la microflora intestinal humana (Kaper *et al.* 2004). Normalmente coloniza el tracto gastrointestinal de los bebés a las pocas horas de nacidos, coexistiendo y representando un beneficio mutuo por décadas (Salayers y Whitt 2002).

La mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas en el tracto gastrointestinal humano no son patógenas. No obstante, en casos especiales donde el hospedero está inmunocomprometido o cuando las barreras gastrointestinales se rompen, como en la peritonitis por ejemplo, incluso estas cepas “no patógenas” pueden causar infecciones serias (Salayers y Whitt 2002). *E. coli* se puede convertir en un patógeno altamente

diverso y adaptable a través de la ganancia y pérdida de genes (atributos de virulencia), causando una amplia gama de enfermedades humanas, clasificables en tres síndromes clínicos generales: Infecciones del tracto urinario, sepsis / meningitis, y enfermedades entéricas / diarreicas (Croxen y Finlay 2010).

Los atributos de virulencia son frecuentemente codificados en elementos genéticos transferibles a diferentes cepas, creando nuevas combinaciones de factores de virulencia, que a su vez pueden ser transferidos o insertados en el ADN bacteriano. Solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia son las que han persistido hasta convertirse en “patotipos” de *E. coli* capaces de causar enfermedades en individuos sanos (Croxen *et al.* 2013).

Uno de los patotipos más importantes es el *E. coli* productor de Toxinas Shiga (ECTS) denominado así por la relación cercana de sus toxinas con las producidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Karmali *et al.* 2010). Esta toxina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en células eucariotas. Los genes que codifican la Toxina Shiga (ST) hacen parte de un bacteriófago lisogénico insertado en el cromosoma de las ECTS (Creuzburg y Schmidt 2007). Dos tipos de toxinas Shiga (STx1 y STx2) han sido descritas en ECTS en base a diferencias en su secuencia de ADN, aunque el mecanismo de acción es el mismo para las dos toxinas, las cepas de ECTS que expresan STX2 son más virulentas que las que solo expresan STX1 (Neupane *et al.* 2011). El efecto microtrombótico de la toxina Shiga se manifiesta clínicamente como el síndrome hemolítico urémico que consiste en hemólisis, azotemia, trombocitopenia, encefalopatía y gastroenteritis disintérica (Tarr 2005; Zoja *et al.* 2010).

La ECTS del serotipo O157:H7 posee generalmente una fracción de ADN llamada locus de eliminación de microvellosidades intestinales (Kaper 1998), lo que la faculta para causar lesiones del tipo adherencia/destrucción (A/E por sus siglas en inglés) que consisten en la inducción de la adherencia íntima bacteriana, polimerización de actina y formación de pedestales en la superficie apical de las células intestinales que culmina con la destrucción de microvellosidades (Jerse *et al.* 1990), esto junto con la expresión

de la toxina Shiga, puede contribuir al aumento de la virulencia de estas cepas (Figura 1) (Gómez-Duarte 2014).

E. coli O157:H7 es la cepa de ECTS más importante desde su reconocimiento como patógeno en 1982. Se ha identificado como responsable de múltiples brotes infecciosos a mundial con casos esporádicos de CH y SUH (Croxen *et al.* 2013; Ethelberg *et al.* 2004), siendo más notorio el ocurrido en Escocia en 1996 con casos reportados que concluyeron con la muerte de 17 personas (Pennington 2000). Aunque los estudios sobre la ECTS son limitados en Colombia, dos investigaciones dedicadas a la detección de cepas de *E. coli* intestinales patógenas permitieron reconocer la presencia de

estos patógenos en niños con diarrea. El primero fue un estudio de prevalencia en Sincelejo y Cartagena donde se reportó que 7% de los niños menores de 5 años con diarrea dieron positivo para cepas *E. coli* patógenas intestinales (Gómez-Duarte *et al.* 2010). Un estudio similar en niños en Bogotá y otras poblaciones en el interior del país reconoció la presencia de cepas patógenas de *E. coli* (Máttar *et al.* 1997). Además, se han reportado varios casos de contaminación por *E. coli* O157:H7 en productos para el consumo humano en Colombia (Piedrahita *et al.* 2001; Anaya *et al.* 2013).

1.3. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas que inhiben o detienen el crecimiento de las bacterias; en su mayoría son producidos de forma natural por hongos y otros microorganismos. Por otra parte, un fármaco antibiótico se refiere a la medicina sintetizada que se utiliza para tratar infecciones bacterianas (Smith *et al.* 2014). Durante el siglo pasado, los avances científicos sobre microorganismos patógenos y antibióticos

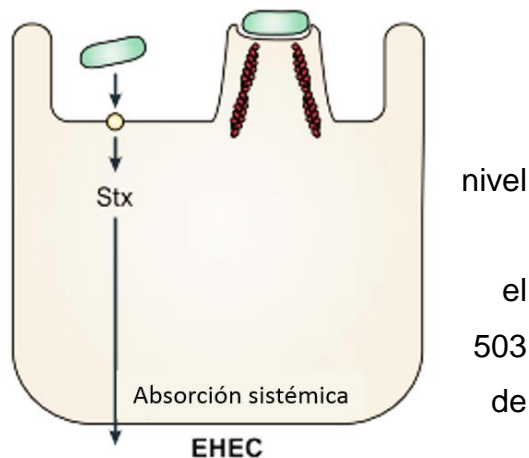


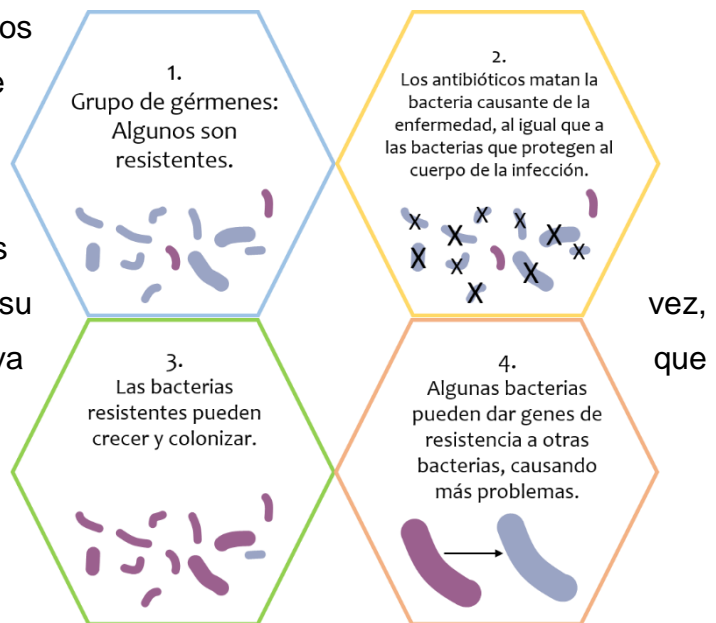
Figura 1. Proceso de A/E de *E. coli* O157:H7 que consiste en la inducción de la adherencia íntima bacteriana, polimerización de actina, formación de pedestales en la superficie. Modificado de Kaper *et al.* 2004.

como agentes terapéuticos eficaces, han contribuido en la disminución de grandes problemas de salud pública (Davies y Davies 2010). El primer antibiótico ampliamente distribuido en los Estados Unidos fue la penicilina a mediados de la década de los 40s (Miller 1947). Seguido por 20 clases nuevas de antibióticos que fueron descubiertos y aprobados para la venta al público general durante los 30 años siguientes (Coates *et al.* 2011), los antibióticos se habían convertido en la " panacea " de la medicina, llegando a ser utilizados para tratar las infecciones más triviales, muchas de ellas de naturaleza no bacteriana (Alanis 2005).

Basado en el trabajo que había desarrollado en el laboratorio, Alexander Fleming advirtió que el uso inadecuado de la penicilina podría conducir a la selección de cepas resistentes a las que denominó " formas mutantes " de *S. aureus*, capaces de causar infecciones más graves en el huésped y las personas que estuvieran en contacto con él (Ainsa 2002). Poco después de las advertencias de Fleming, un aislado clínico de bacterias resistentes a la penicilina fue documentado (Miller 1947). De igual forma fueron apareciendo cepas resistentes para las nuevas generaciones de antibióticos (CDC 2013). Aunque en la década de 1960 se estancó la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos en la industria farmacéutica (Davies y Davies 2010); su uso y distribución siguió aumentando (Coates *et al.* 2011).

En los Estados Unidos se formulan más de 250 millones de prescripciones de antibióticos cada año (Rosi-Marshall y Kelly 2015), y se estima que el 50% de estos medicamentos son innecesarios (Smith *et al.* 2014). En la agricultura, los antibióticos se usan como medicina veterinaria, como biocidas en la producción de frutas y cultivos, y como aditivos para el alimento del ganado y las aves de corral (Silbergeld *et al.* 2008). En China, el 46% de las 210.000 toneladas de antibióticos producidos cada año se utilizan para la cría de animales (Su *et al.* 2014). La aplicación intensiva de antibióticos en la agricultura en todo el mundo ha dado lugar a la liberación de grandes cantidades de antibióticos sin metabolizar que entran en el medio ambiente a través del estiércol animal y desechos humanos, en concentraciones importantes (Silbergeld *et al.* 2008; Berendonk *et al.* 2015).

Los antibióticos no metabolizados persisten en el medio ambiente representando un riesgo para la salud humana, seleccionando bacterias y genes de resistencia a los mismos (Figura 2) (Berendonk *et al.* 2015). A su vez, son un potencial peligro ecológico, ya pueden alterar la delicada estructura bacteriana ecosistémica (Bouki *et al.* 2013; Berendonk *et al.* 2015).



Los genes de resistencia pueden ser adquiridos por conjugación, transfección o transformación (**¡Error!**

Figura 2 La exposición a antibióticos favorece la frecuencia del fenotipo resistente a los antibióticos, en un proceso de selección artificial, modificado de Smith et al. 2014.

La autoreferencia al marcador no es válida.). La conjugación es el proceso de fusión e intercambio de plásmidos y algunos fragmentos cromosomales. Este es uno de los mecanismos más estudiados e importantes debido a que los plásmidos tienen una amplia gama de huéspedes y pueden pasar de una especie a otra (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.a**); la transfección o transducción consiste en la transferencia de material genético utilizando un vector vírico de un organismo a otro (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.b**); y por último, la transformación es el proceso de alteración genética bacteriana resultante de la incorporación de ADN exógeno proveniente del medio circundante (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.c**) (Furuya y Lowy 2006; Baquero *et al.* 2008; Bbosa *et al.* 2014).

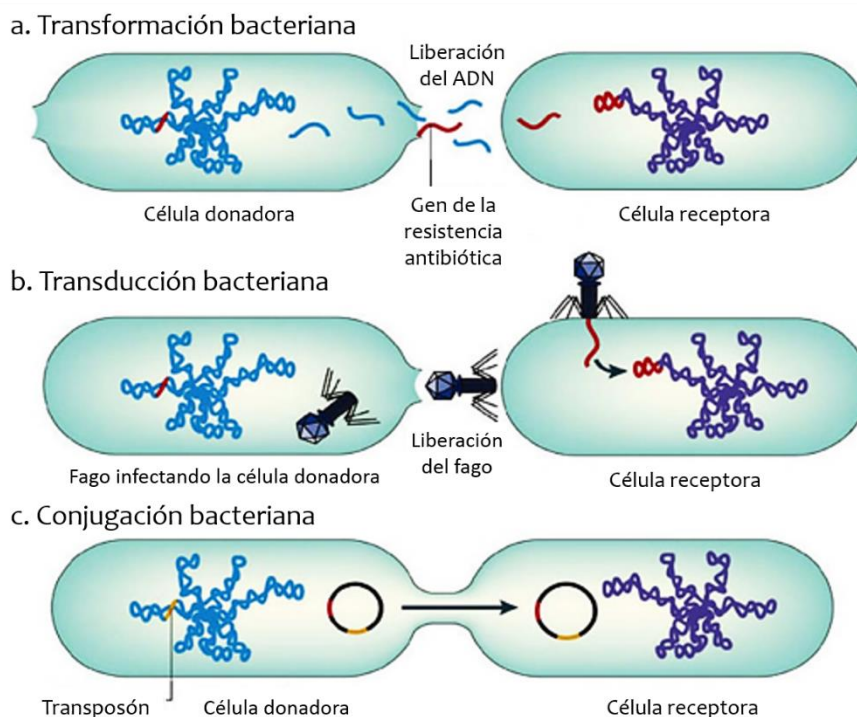


Figura 3 Mecanismos de adquisición de genes de resistencia. Tomado de Furuya y Lowy 2006

Las bacterias con genes de resistencia pueden expresar diferentes mecanismos para evitar la acción de los antibióticos que incluyen: eliminación o alteración enzimática del fármaco, modificación de la ruta metabólica inhibida por el agente antimicrobiano, mutación de la enzima diana del antibiótico, síntesis de proteínas que se unen al agente antimicrobiano inactivándolo, modificación de la pared celular para impedir la entrada del fármaco, bombeo activo del agente antimicrobiano hacia el exterior de la célula y sobreproducción de la enzima diana del fármaco (Tabla 1, Figura 4) (Keyes *et al.* 2008; Bbosa *et al.* 2014).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

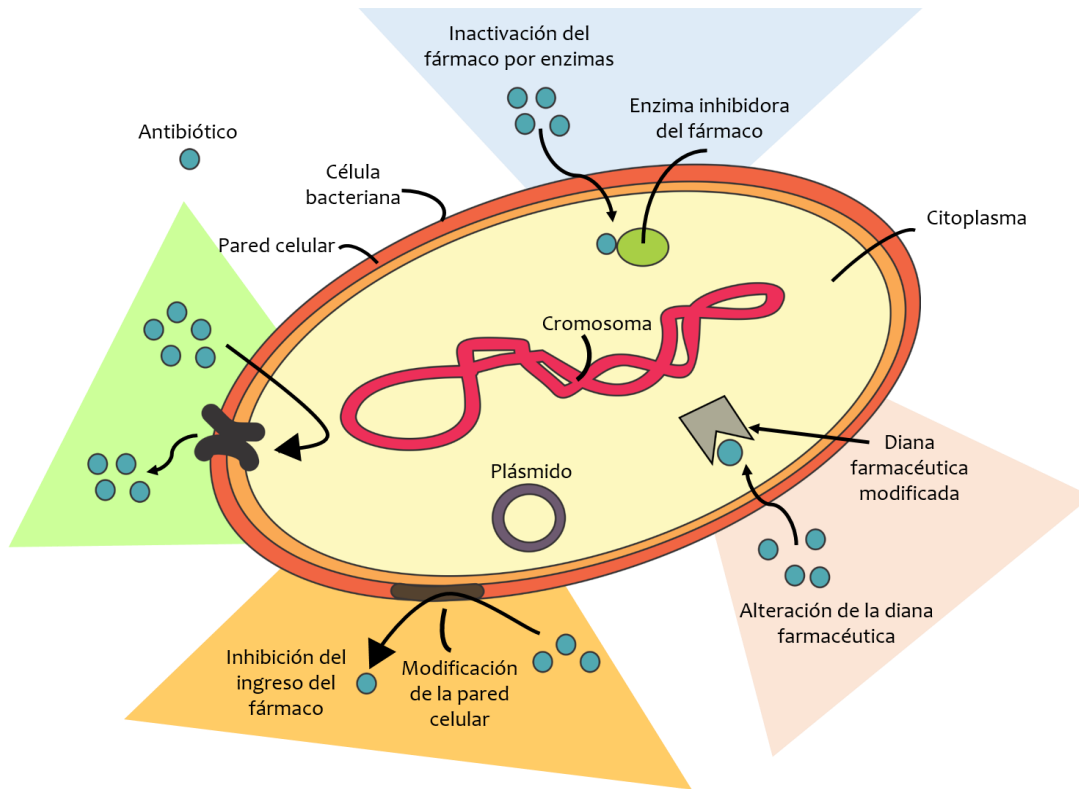


Figura 4 Mecanismos de resistencia comunes en bacterias. Tomado de (Bbosa et al. 2014).

Tabla 1 Mecanismos de resistencia de *E. coli* y SARM frente a diferentes antibióticos. Tomado (Bbosa et al. 2014).

Clase de antibiótico	Mecanismo de resistencia	Medio específico para alcanzar la resistencia	Microorganismo
B-lactámicos	Destrucción enzimática por: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cefalosporinasas ➤ Penicilasas ➤ Metallo-β-lactamasas ➤ Acetilación 	Destrucción del anillo β-lactámicos, causando la pérdida de la actividad del fármaco.	<i>S. aureus</i>
	Baja afinidad de la enzima diana al fármaco	Cambios mutacionales en la secuencia aminoacídica de la enzima diana causan una baja afinidad del fármaco.	
Aminoglicósidos	Disminución de la captación	Cambio en el número o función de las porinas de membrana.	
Fluoroquinolonas	Bomba de eflujo de fármaco	Activación de bombas de eflujo, que remueven el fármaco antes que la concentración celular sea suficiente para inhibir el metabolismo de ADN	
Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	Metilación de ARNr	Las modificaciones post-transcripcionales y alteración del ARNr 23S	<i>E. coli</i>
	Bomba de eflujo	El antibiótico es bombeado fuera de la célula, manteniendo a los ribosomas libres del fármaco	
	Enzimas hidrolíticas	Enzimas modifican el fármaco, eliminando su actividad	

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO
ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tetraciclinas	Modificación del Antibiótico	Modificación enzimática del fármaco eliminando su actividad	
Trimetroprima	Sobreproducción enzimática	Se produce una sobre expresión de la enzima diana, compensando el efecto del fármaco.	

1.4. Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son pequeñas péptidos (<10 kDa) compuestas por aminoácidos que pueden variar en número desde 5 a más de 100 (Powers y Hancock 2003). Constituyen un mecanismo de defensa inmunológico primitivo, desempeñando un papel importante en los sistemas de defensa inespecíficos (Lehrer y Ganz 1999; Reddy *et al.* 2004); incluso han sido propuestos como "armas de defensa" evolutivas eficaces frente a las infecciones de patógenos (Zhang *et al.* 2001; Zasloff 2002; Brazas y Hancock 2005; Efird *et al.* 2005; Cruz *et al.* 2013).

El primer PAM en ser reconocido fue aislado de la bacteria *Bacillus brevis* en 1939, la Gramicidina exhibía actividad antimicrobiana frente a una amplia variedad de bacterias Gram-positivas *in vitro* e *in vivo* (Dubos 1939a; Dubos 1939b), de esta manera se evidenció su potencial clínico y se convirtió en el primer PAM en ser producido a escala industrial (Gause y Brazhnikova 1944; Van Epps 2006).

En 1940 Fleming junto con Howard Florey y Ernst Chain, demostraron el uso terapéutico de la penicilina, lo que les permitió obtener el Premio Nobel de Medicina en 1945 (Fleming 1929; Brown 2004) y marcar el inicio de la "Era dorada de los antibióticos". Esto condujo a una rápida pérdida de interés en el potencial terapéutico de los PAMs y su importancia en la estrategia de defensa inmune (Bentley 2009; Zaffiri *et al.* 2012). Sin embargo, con el aumento de microorganismos patógenos resistentes a múltiples fármacos a principios de 1960, se despertó de nuevo el interés por los PAMs como una alternativa terapéutica.

Hasta la fecha, más de 2.000 PAMs han sido identificados a partir de una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, insectos, plantas, anfibios, aves, reptiles, y mamíferos (Di Francesco *et al.* 2013; Steckbeck *et al.* 2014). Los PAMs producidos por los organismos superiores tienen funciones de defensa inmune (Nizet y Cole 2016), mientras que los PAMs bacterianos son utilizados como estrategia competitiva para

facilitar el consumo de nutrientes y promover la colonización de nicho (Anaya-López *et al.* 2013).

Los PAMs son producidos en respuesta a un daño tisular o a estímulos infecciosos en humanos, se encuentran en los fluidos corporales y secreciones incluyendo saliva, orina, sudor y leche materna (Nizet y Cole 2016). Además, presentan un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, hongos, parásitos, protozoarios, y ciertos envolturas víricas (Jenssen *et al.* 2006; Nakatsuji y Gallo 2012). Se dividen en tres grupos estructurales principales: α -hélice, β -plegados (usualmente presentan 2 o más enlaces disulfuro) y péptidos extendidos (Figura 5) (Nguyen *et al.* 2011).

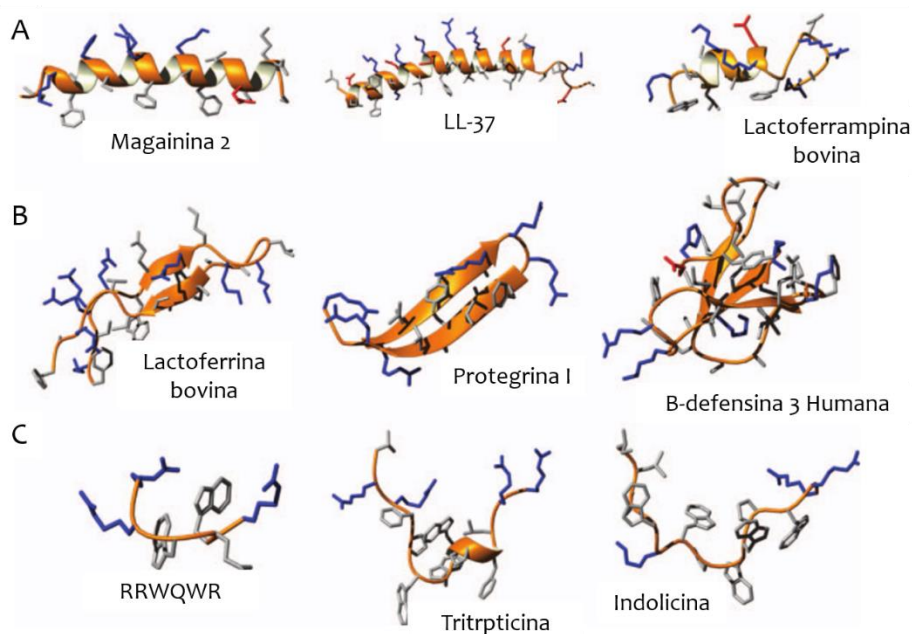


Figura 5 Diversidad conformacional de los AMPs, α -hélice (a), β -plegados (b) y péptidos extendidos (c). Tomado de Nguyen *et al.* 2011.

Muchos PAMs lineales no presentan estructura en solución acuosa y requieren un entorno como el de la membrana bacteriana para adoptar una conformación estable (Hwang y Vogel 1998). La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y

lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas (Dang *et al.* 2009). Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa (Campos *et al.* 2004). Para explicar estos mecanismos de acción se han propuesto múltiples modelos (Figura 6) descritos brevemente (Maróti *et al.* 2011). Los mecanismos de acción de los tres modelos clásicos son:

Modelo de ruptura por barril: Cuando se alcanza la concentración crítica de PAMs estos se reorientan de forma perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales apolares, interactuando con el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares hacia el interior creando un poro hidrofílico. Estos poros son irregulares en tamaño y duración, generando finalmente, la pérdida del potencial de membrana y equilibrio osmótico (Figura 6, A) (Thevissen *et al.* 2007).

Modelo de alfombra: El PAM no se inserta en la membrana, sino que permanece asociado con la cara externa, al alcanzar una concentración crítica, formando una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y crear micelas. La muerte celular se produce por pérdida del citoplasma (Figura 6, B) (Jean-François *et al.* 2008).

Modelo toroidal: En este caso al alcanzar una concentración límite de PAMs unidos a la membrana, se induce la formación de una invaginación de lípidos que conduce al desarrollo de un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos. Este es un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana. Fue descrito para péptidos como magainina y mellitina (Figura 6, C) (Pandey *et al.* 2011).

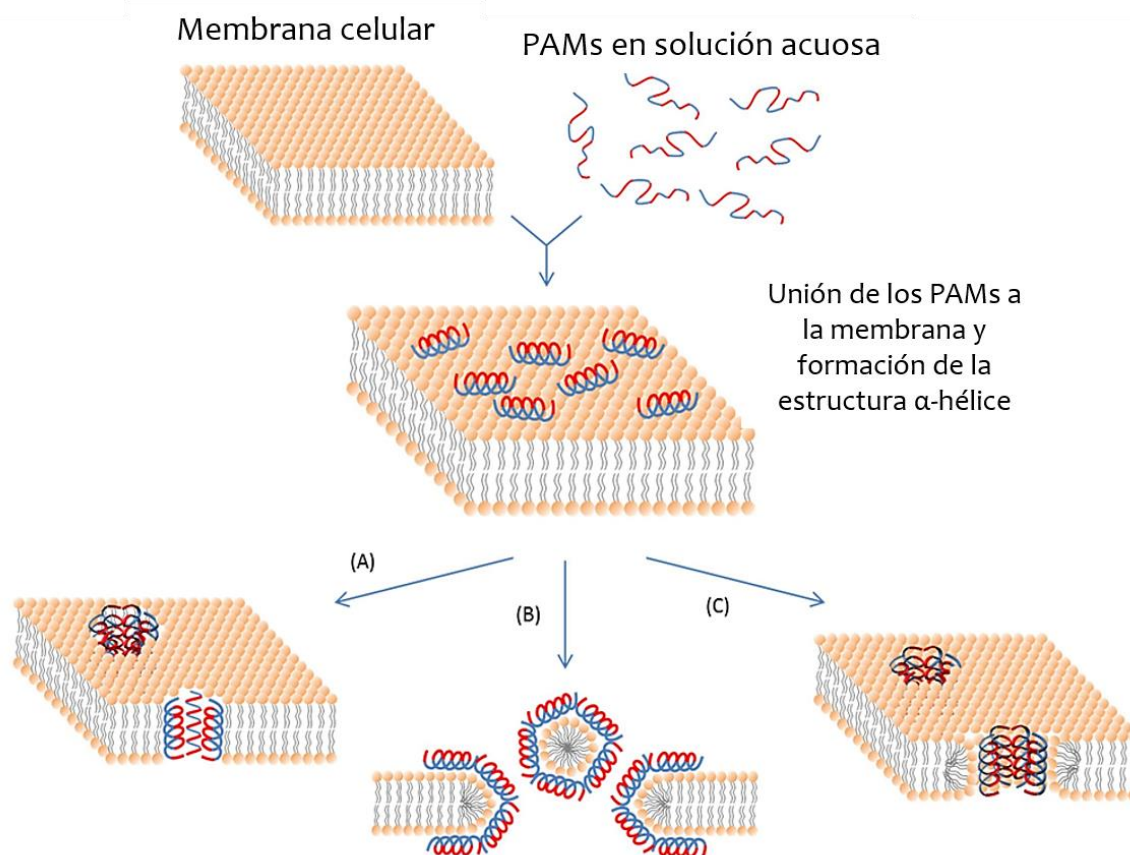


Figura 6 Los acontecimientos que ocurren en la membrana citoplasmática bacteriana después de la adsorción inicial de los PAMs. Los modelos clásicos de la destrucción de la membrana son: (A) de ruptura por barril, (B) de alfombra y (C) poro toroidal. Tomado de Bahar y Ren 2013.

En relación con el diseño de péptidos, resulta bastante complejo definir una secuencia patrón unificada que pueda servir como una plantilla ideal para el diseño de PAMs eficaces. No obstante, es posible señalar varias características estructurales que son cruciales para la actividad antimicrobiana. En primer lugar, la mayoría de los PAMs caracterizados hasta la fecha muestran una carga neta positiva confiriéndole cierto grado de especificidad, al facilitar las interacciones electrostáticas con las membranas celulares aniónicas de los microorganismos, mientras que por el contrario las células eucariotas no poseen carga superficial (Yeaman y Yount 2003; Jenssen *et al.* 2006).

Otra característica específica de los PAMs es su hidrofobicidad global que le permite actividad lisogénica y propiedades de penetración celular (Aoki y Ueda 2013). Sin embargo, también hay que señalar que el aumento de contenido hidrófobo dentro de la secuencia de aminoácidos está fuertemente correlacionada con la baja selectividad y citotoxicidad de estos compuestos hacia células eucariotas (Kosikowska y Lesner 2016).

A pesar de las múltiples ventajas que ofrecen los PAMs, estos se ven limitados en comparación con las moléculas terapéuticas convencionales debido a que tienen una vida media corta y son altamente propensos a la proteólisis, desnaturalización y pérdida de su actividad (Sohani *et al.* 2013). En este particular caso la nanoencapsulación basada en sistemas de transporte en nanopartículas poliméricas representa una alternativa viable y altamente versátil para la protección del principio activo de la degradación, permitiendo conservar su actividad biológica e identidad estructural (Van Der Walle 2011).

1.5. Sistemas de transporte de péptidos

La nanotecnología es el campo de las ciencias aplicadas al entendimiento y el control de los materiales a escala nanométrica, en la cual adquieren propiedades fisicoquímicas especiales, que incluyen una mayor área superficial, alta reactividad y posibilidad de interactuar con sistemas biológicos (Bheemidi 2011). Durante las últimas décadas, se ha implementado el uso de la nanotecnología en diferentes áreas médicas, siendo el desarrollo de nuevos mecanismos de transporte de principios activos una de las aplicaciones más prometedoras (Pandey *et al.* 2005).

Asimismo, la nanoestructuración de los PAMs ofrece múltiples ventajas entre las que destacan: la protección del principio activo en relación con la degradación química o enzimática causada por las condiciones del entorno; prolongación de la circulación sistémica; liberación sostenida y controlada; entrega a tejidos de interés específicos y la posibilidad de cargar varios principios activos en una misma nanocápsula (Zhang *et al.* 2008). En otras palabras la encapsulación puede mejorar significativamente la

farmacocinética, eficiencia y seguridad en contraste con los agentes activos libres (Verma y Garg 2001; Bheemidi 2011).

Se han investigado múltiples A sistemas de transporte para la administración de varios principios activos, dentro de los cuales cabe resaltar los cuatro más prometedores (Figura 7): liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas y dendrímeros.

Los **Liposomas** son vesículas esféricas compuestas por una bicapa de lípidos anfifílicos; actualmente es el sistema de administración de fármacos antimicrobianos mayormente utilizado. Esto se debe a que su estructura imita la bicapa lipídica de las membranas celulares, permitiéndole fusionarse con la membrana y liberar su carga en el interior de la célula (Figura 7, A) (Zhang y Granick 2006).

Los **Dendrímeros** son macromoléculas globulares altamente ordenadas y ramificadas que constan de tres regiones: núcleo, capas de unidades repetitivas que emergen desde el núcleo y grupos terminales funcionales en la capa externa. Muchos medicamentos antimicrobianos se han cargado correctamente en dendrímeros, mejorando solubilidad y eficacia terapéutica (Figura 7, B) (Grayson y Fréchet 2001).

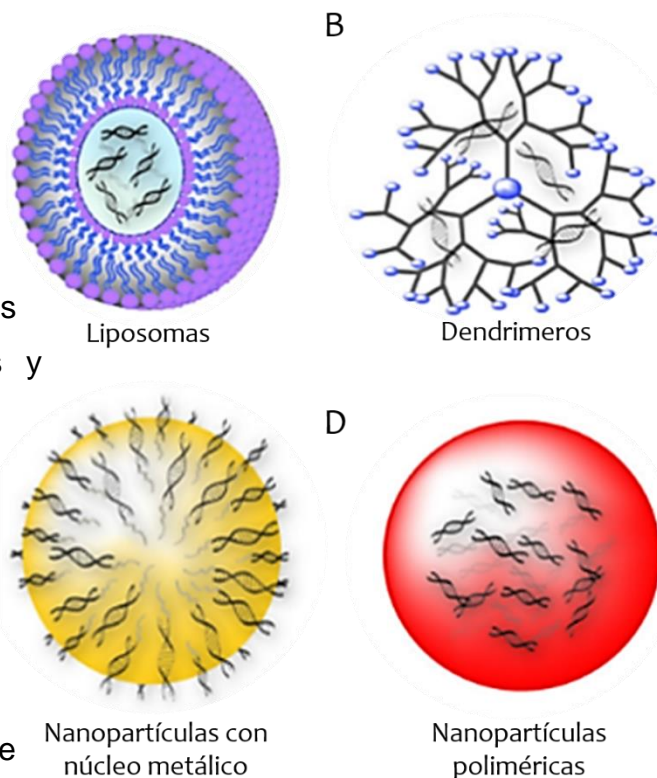


Figura 7 Sistemas de transporte que pueden ser utilizados para el transporte de múltiples sustancias activas como: fármacos, péptidos, proteínas, RNA y DNA. La hebra de RNA representa la forma en la que la nanopartícula puede transportar el principio activo. Tomado de Gavrilov y Saltzman 2012.

Las **Nanopartículas metálicas** están formadas por núcleos metálicos de óxido de hierro, cobalto hierro, oro hierro, o níquel hierro que se revisten con una capa de azúcares u otros polímeros generando una estructura de núcleo-carcasa a la que se pueden conjugar externamente múltiples agentes terapéuticos. Dependiendo del metal usado, el núcleo de estas partículas permite estudiar la biodistribución después de la inyección utilizando imágenes de resonancia magnética, e incluso es posible orientarlos a tejidos específicos mediante la aplicación de imanes externos (Figura 7, C) (Jin *et al.* 2009; Gavrilov y Saltzman 2012).

Por último, las **nanopartículas poliméricas** son el sistema más versátil. Pueden ser sintetizadas a partir de varios materiales, como polímeros, lípidos y metales. Los cuales son generalmente escogidos por sus cualidades biocompatibles y biodegradables. Además por la posibilidad de alojar una amplia gama de componentes activos, que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y fármacos, con utilidad en diversas aplicaciones médicas (Figura 7, D) (Elsabahy y Wooley 2012).

Los sistemas de transporte a base de nanopartículas poliméricas, fueron desarrollados en 1976 para entrega de macromoléculas, pero su pobre eficacia terapéutica, y rápida eliminación por el organismo después de ser administrados vía intravenosa fueron sus principales desventajas (Langer y Folkman 1976). Solo con el descubrimiento de polímeros de larga circulación en 1994, este mecanismo se convirtió en uno de los más utilizados (Gref *et al.* 1994), principalmente por características únicas como: estabilidad estructural, ajuste de propiedades físico-químicas (tamaño y potencial zeta), superficie modificable para la entrega del medicamento a objetivos celulares específicos (Figura 8) (Umamaheshwari y Jain 2003).

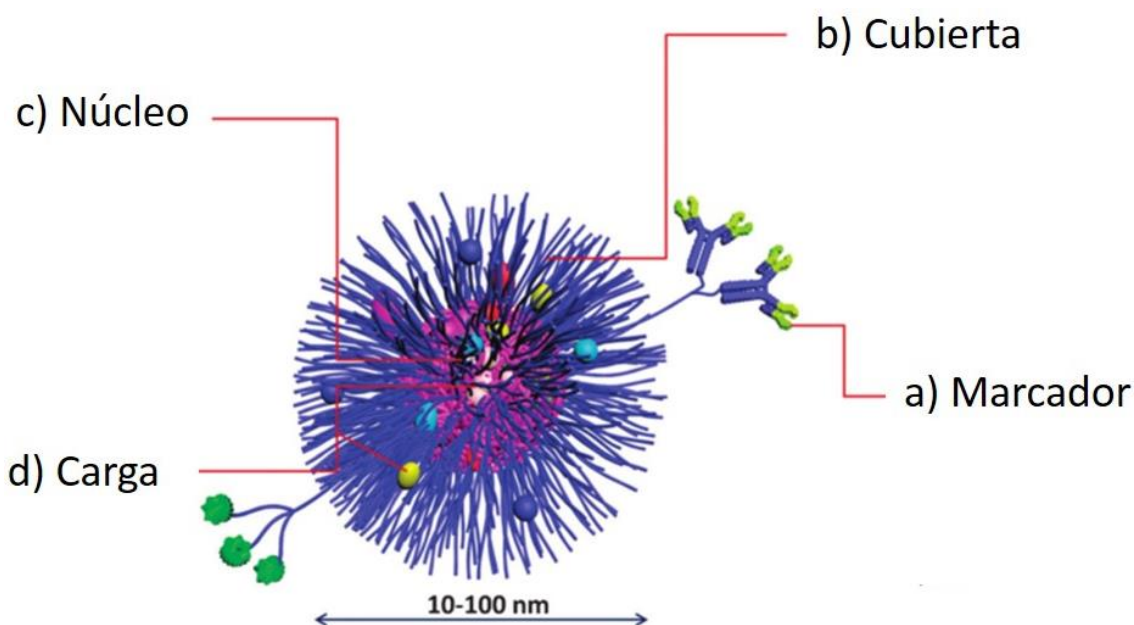


Figura 8 Composición de las nanopartículas poliméricas en aplicaciones biomédicas. (a). Marcador, son grupos que direccionan la nanopartículas hacia la diana terapéutica, pueden estar compuestos por anticuerpos, proteínas, azúcares y péptidos entre otros. (b). Cubierta, generalmente compuesto por polímeros capaces de mejorar su estabilidad y enmascarar la nanopartículas, permitiéndole aumentar el tiempo de circulación en sangre. (c). El núcleo, su naturaleza dicta el tipo de principio activo a encapsular con el objetivo de retener y estabilizar su carga. (d). La carga, que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y fármacos. Tomado de Elsabahy y Wooley 2012.

Adicionalmente las nanopartículas poliméricas se pueden modificar para que respondan a estímulos fisiológicos o externos específicos; esta funcionalidad se basa en la capacidad de respuesta de desmontaje de las nanopartículas y liberación del principio activo en ambientes biológicos bajo diferentes valores de pH, enzimas, y condiciones reductoras u oxidativas, etc., en respuesta a estímulos externos, como la variación de la temperatura, irradiación con espectroscopia infrarroja (IR) o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-vis), activación por campos magnéticos, y la aplicación de vibraciones ultrasónicas, entre otros (Elsabahy y Wooley 2012).

Se han investigado una gran variedad de polímeros sintéticos y naturales para formar el núcleo polimérico de las nanopartículas, ya que este componente es crucial pues interactúa directamente con el péptido (Mathiowitz *et al.* 1997). Debido a su baja

inmunogenicidad y toxicidad, los poliésteres sintéticos como el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) constituyen un vehículo biocompatible cuyas propiedades fisicoquímicas y mecánicas se pueden adaptar a través de la selección del peso molecular, copolimerización, y funcionalización (Anderson y Shive 2012). Por esta razón, el número de formulaciones comerciales que emplean matrices de PLGA para la administración de agentes terapéuticos está creciendo (Tabla 2) en la medida que nuevos péptidos emergen del sector de la biotecnología (Mohamed y Van Der Walle 2008).

Tabla 2 Formulaciones comerciales basadas en sistemas de transporte poliméricos utilizando PLGA. Tomado de Van Der Walle 2011.

Nombre del producto	Ingrediente activo	Forma de dosificación	Polímero biodegradable
Lupron	Leuprolide	Microsfersas	PLGA
Sandostatin	Octreotide	Microsfersas	PLGA
Lar	Somatropin	Microsfersas	PLGA
Neutropin	Triptorelin	Microsfersas	PLGA
Trelstar	Triptorelin pamoate	Microsfersas	PLGA
Decapeptyl	Bromocriptine mesylate	Microsfersas	PLGA
Parlodel	Leuprolide	Microsfersas	PLGA
Enantone	Goselrelin	Barra	PLGA
Zoladex			

1.6. Inducción de resistencia bacteriana frente a los PAMs

Durante el tratamiento con concentraciones subinhibitorias de algunos antimicrobianos, se han evidenciado mutaciones que permiten a los microorganismos expresar características fisiológicas y moleculares que influyen en el desarrollo de resistencia microbiana (Valéria dos Santos *et al.* 2010). Después de la amplia utilización de los PAMs en la práctica clínica, se ha demostrado que las bacterias pueden desarrollar

resistencia a estos (Peschel y Sahl 2006; Cai *et al.* 2012; Anaya-López *et al.* 2013). Por ejemplo, la nisina, pexiganan, y colistina son PAMs cuyo uso ha sido restringido debido a la resistencia bacteriana que ha surgido a través de años de uso clínico indiscriminado (Mehla y Sood 2011; Habets y Brockhurst 2012).

La resistencia que se ha desarrollado frente a PAMs es preocupante, debido a la posibilidad de que, a partir de un tratamiento terapéutico, se pueda inducir resistencia cruzada hacia los PAMs constituyentes del sistema inmune innato. En otras palabras, la monoterapia con PAMs podría seleccionar bacterias resistentes que al mismo tiempo serían resistentes a los PAMs del sistema inmune innato, y este tipo de resistencia cruzada podría persistir en el huésped (Fleitas y Franco 2016).

La resistencia bacteriana a los PAMs catiónicos puede surgir a través del desarrollo de cepas resistentes mediante selección en el laboratorio (Perron *et al.* 2006). La evolución de la resistencia bacteriana a los PAMs podría finalmente llevar en gran medida a disminuir y restringir su uso (Samuelsen *et al.* 2005). Por lo tanto, es de gran importancia conocer los mecanismos potenciales de la resistencia bacteriana con el objetivo de mejorar el diseño de PAMs cada vez más eficientes, y con una reducción en la incidencia de la resistencia bacteriana (Valéria dos Santos *et al.* 2010; Cruz *et al.* 2014).

1.7. Análisis proteómico en *E. coli* y *S. aureus*

El proteoma representa un arreglo de proteínas que son expresadas en un compartimiento biológico (célula, tejido u órgano) en un tiempo y condiciones particulares (Beranova-Giorgianni 2003). Debido a que las proteínas son moléculas claves funcionales y estructurales, es de vital importancia su estudio a gran escala; en este sentido, la proteómica se presenta como una herramienta eficaz para analizar la expresión global proteica y sus cambios con respecto al contexto biológico, contribuyendo de esta manera a la caracterización de una gran diversidad de proteínas

presentes en los organismos, y lograr una mejor comprensión de los sistemas biológicos (Rogowska-Wrzesinska *et al.* 2013).

O'Farrel propuso una técnica clásica para la separación y análisis de complejos proteicos: la electroforesis de alta resolución en dos dimensiones (2D-PAGE) (O'Farrel 1975). Inicialmente esta técnica empleaba anfolitos; sin embargo, fue hasta 1988 que se estableció el uso de gradientes de pH inmovilizados (Immobilized pH gradient IPG-strips) (Görg *et al.* 1988b) que brindaron mejoras significativas como la resolución en paralelo de cientos o miles de proteínas (spots), y su caracterización por punto isoeléctrico, masa molecular, solubilidad y abundancia relativa (Görg *et al.* 2004). Actualmente, la estrategia más común para estudiar la expresión global proteica emplea el uso de electroforesis bidimensional (2-DE) con IPGs acoplado a espectrometría de masas (MS) (Rotilio *et al.* 2012), una combinación en la que se evidencia una alta reproducibilidad, viabilidad y eficiencia en la identificación y cuantificación de proteínas (Susnea *et al.* 2012).

Con el rápido avance de la tecnología y el surgimiento de nuevas técnicas aplicadas a la biología molecular se podría pensar que la proteómica obtenida a partir de 2-DE/MS, y su análisis bioinformático han disminuido su relevancia. Esta conclusión se aleja de la realidad, ya que se han agregado modificaciones a la técnica que permiten una detección más sensible de proteínas y su posterior identificación con un alto nivel de fidelidad. Algunas investigaciones recientes demuestran que aún estas técnicas siguen desempeñando un papel crucial al momento de estudiar diferentes respuestas en bacterianas (Rogowska-Wrzesinska *et al.* 2013).

En la última década los trabajos con enfoque proteómico implementando la técnica 2-DE/MS han aumentado considerablemente a raíz de las modificaciones anteriormente mencionadas, permitiendo identificar las alteraciones post-traduccionales, interacciones péptido-bacteria, la comparación de los niveles de expresión de una proteína en dos o más estados fisiológicos, la localización sub-celular de las proteínas y el desarrollo de biomarcadores (Beranova-Giorgianni 2003).

Esta técnica se ha utilizado para investigar las diferencias en los perfiles de expresión de proteínas de bacterias cultivadas en un amplio espectro de condiciones de crecimiento y con diferentes factores de estrés, como lo son los antibióticos y PAMs (Radhouani *et al.* 2012). Como resultado del análisis proteómico de la respuesta de bacterias frente a la exposición a los antibióticos, se han reportado datos inéditos con respecto a los mecanismos de resistencia desarrollados por *E. coli* y SARM (Beranova-Giorgianni 2003).

Los estudios proteómicos realizados con diferentes microorganismos han permitido identificar proteínas implicadas en la resistencia frente a diversos antibióticos, y los cambios en su expresión (inhibición o incremento). Por ejemplo, las proteínas TolC y OmpC presentes en la Membrana Externa (ME) de *E. coli*, son una respuesta crucial de regulación por parte de la bacteria cuando se encuentra expuesta al ácido nalidíxico, la ampicilina y la tetraciclina (Xu *et al.* 2006; Lin *et al.* 2008). Adicionalmente, se ha observado que su respuesta frente a kanamicina es similar a la reportado anteriormente, en este caso se destaca el rol de MipA, una proteína nueva de la membrana externa que podría cumplir una función de porina otorgándole resistencia a otros tipos de antibióticos, como: la estreptomina, cloranfenicol y aureomicina (Li *et al.* 2015). Otro mecanismo importante son las bombas de eflujo de antibióticos, expresadas en respuesta a antibióticos como la piperacilina/tazobactam, sugiriendo la multiplicidad de mecanismos utilizados por *E. coli* para responder a los antibióticos (Valéria dos Santos *et al.* 2010).

Tomazella *et al.*,(2012) destacan la gran plasticidad del proteoma de *E. coli*, demostrando que tanto la virulencia como la resistencia frente a los antibióticos se asocian a menudo con la presencia de grupos de genes específicos que se encuentran presentes en las denominadas “islas de patogenicidad”, las cuales pueden pasarse a otras cepas por transferencia horizontal de genes (Tomazella *et al.* 2012).

Por otra parte, *S. aureus* demuestra la rápida adaptación bacteriana a las defensas del huésped y a las nuevas terapias antimicrobianas; esta adaptación se puede dar ya sea a través de la modificación de genes existentes, o por transferencia horizontal de genes, haciendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones causadas por *Staphylococcus* (Otto *et al.* 2014). En este sentido, se han planteado posibles soluciones (Otto *et al.* 2014) frente a este tipo de infecciones que incluyen el desarrollo de vacunas (Weichhart *et al.* 2003; Ziebandt *et al.* 2010), anticuerpos protectores (van den Berg *et al.* 2011) y péptidos (Weichhart *et al.* 2003; Dean *et al.* 2011; Ryu *et al.* 2014).

Para cumplir con este objetivo se requiere la comprensión de los mecanismos de resistencia, fisiología, fisiopatología y función de los efectores de virulencia (Otto *et al.* 2014). Los estudios proteómicos en *S. aureus* han llevado al descubrimiento de múltiples mecanismos que le permiten hacer frente a los antibióticos y PAMs. Los mecanismos anteriormente mencionados incluyen adaptaciones en las funciones metabólicas, vías reguladoras y cambios en la biogénesis de la envoltura celular (Fischer *et al.* 2011).

La proteómica también ha brindado resultados relevantes acerca de los mecanismos de acción de los antibióticos sobre dianas de *S. aureus*, como es el caso de la proteína de unión al manganeso, la cual podría ser una potencial diana terapéutica para el desarrollo de antibióticos (Diep *et al.* 2014). Por otra parte la resistencia de *S. aureus* a los PAMs como las defensinas y catelicidinas, se da como resultado de cambios en la carga superficial de la pared celular, que disminuyen la afinidad del péptido hacia esta (Ryu *et al.* 2014).

2. Pregunta de Investigacion

¿Existen cambios proteómicos significativos en *E. coli* O157:H7 y SARM al ser expuestas al péptido P19 libre y nanoencapsulado?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar los patrones de expresión proteica de cepas infectivas de *E. coli* O157:H7 y SARM expuestas al péptido P19 libre y nanoencapsulado.

3.2. Objetivos específicos

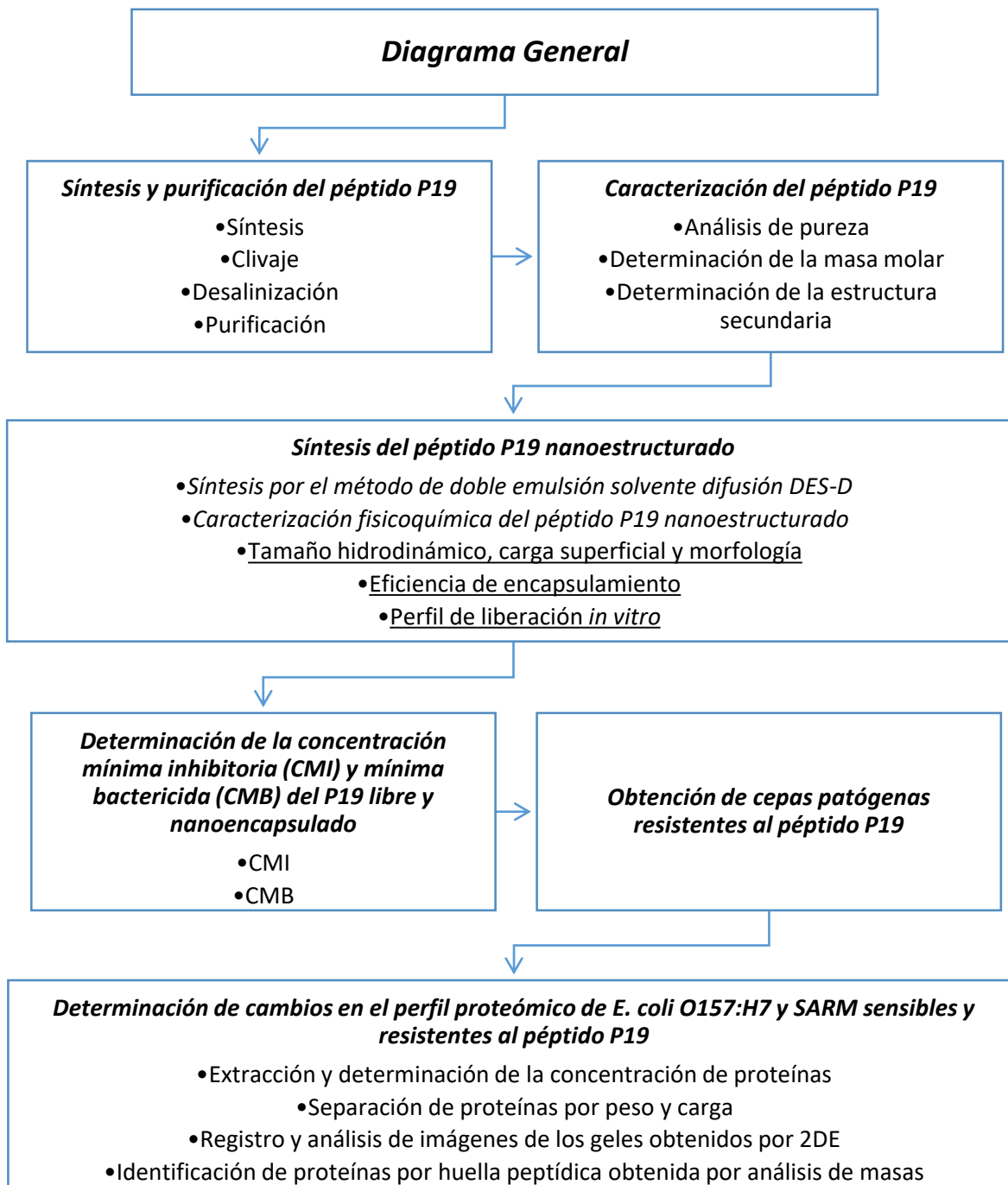
- Evaluar la actividad antibacteriana del PAM P19 en cepas infectivas de *Escherichia. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina.
- Determinar las propiedades físico-químicas (tamaño, carga, forma y perfil de liberación) del péptido P19 nanoencapsulado y evaluar su actividad antimicrobiana en cepas infectivas de *E. coli* O157:H7 y SARM.
- Inducir la resistencia al PAM P19 en las cepas patógenas de *E. coli* O157:H7 y SARM.
- Analizar la expresión del proteoma de SARM y *E. coli* O157:H7 sensibles y resistentes al PAM P19 al ser expuestas al péptido libre y nanoencapsulado.
- Identificar las proteínas involucradas en la resistencia al PAM P19 y correlacionar los patrones de expresión de las proteínas con los posibles mecanismos de acción del P19

4. Materiales y Métodos

Las cepas de *E. coli* O157:H7 ATCC y SARM fueron adquiridas del cepario de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia y la escuela de Bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander (UIS) respectivamente. El mantenimiento de estas cepas se realizó en medio infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C.

Los fmoc-L-aminoácidos fueron adquiridos de Chempep, la resina Rink-amida 4MBHA se obtuvo de Merck Novabiochem, los medios de cultivo fueron comprados a Oxoid. Todos los demás reactivos y solventes utilizados para la síntesis peptídica son de grado analítico. Para la encapsulación del péptido se utilizó PGLA de la casa comercial Sigma-Aldrich. Los ensayos proteómicos fueron llevados cabo en gradientes de pH inmovilizados (IPG-Strips) rango 3-10 no lineales (NL) de 17 cm (Bio-Rad). Se utilizó el 2D-SDS-PAGE Standards de Bio-Rad como marcador de punto isoelectrico y peso molecular. La digestión de los spots se realizó con tripsina modificada de grado analítico para secuenciación (Promega).

En el diagrama que se presenta a continuación, se describen las etapas de la metodología que se siguió para cumplir con los objetivos propuestos.



4.1. Características, síntesis y purificación del péptido P19

El PAM P19 fue diseñado mediante herramientas bioinformáticas y de biología estructural por investigadores del GIBIM, se utilizó como base la secuencia aminoácida del péptido GIBIM-P5S9K de Cruz et al. 2017, el cual también fue diseñado y sintetizado en el GIBIM. A esta secuencia se le realizaron modificaciones en aminoácidos clave con el objetivo de mejorar su estabilidad y actividad. A continuación, se muestra la tabla de características de ambos péptidos (Tabla 3).

Tabla 3 Características general del péptido de los PAMs GIBIM-P5S9K y P19

Péptido	GIBIM-P5S9K	P19
Secuencia	ATKKCGLFKILKGVGKI	Secuencia protegida
Numero de Aminoácidos	17	17
Carga Neta	4	4
Peso Molecular	1804.31	1864,16
PPAM(%)*	96	98
Punto Isoeléctrico	10.20	10.04
Índice de inestabilidad	-18.06	24.68
Promedio general de hidropatía (GRAVY)	0.38	0.735

*PPAM: es la probabilidad del péptido de ser antibacteriano, la cual se obtiene por medio del software "DEPRAMS", desarrollado en el GIBIM por Rondon-Villarreal et al. 2014.

4.1.1. **Síntesis:** El péptido P19 fue sintetizado en fase sólida empleando la estrategia Fmoc/tBu (Fields y Noble 1990). La síntesis se realizó en jeringas con un filtro de polipropileno empleando la resina Rink-amida MBHA (Millner 1995; Andreu et al. 1995). Los aminoácidos fueron acoplados con Oxima como principal agente anti-racémico,

acompañado de O-(Benzotriazol-1-il)-N, N, N', N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) como agente activador y anti-racémico y N, N-diisopropiletilamina (DIPEA), la cual actúa como base neutralizante *in situ*. Se emplearán Hidroxibenzotriazol y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) para acoplos más largos (Barlos et al. 2009; König y Geiger 1970). El indicador azul de bromofenol se añadió disuelto en cada paso del acoplamiento para el seguimiento de la reacción (König y Geiger 1970; Fields y Noble 1990). Se utilizó piperidina al 10% para la desprotección del grupo Fmoc (Guy y Fields 1997).

4.1.2. Clivaje: Con el fin de separar el péptido de la resina utilizada se realizó el clivaje de este (Guy y Fields 1997; Barlos et al. 2009). Para esto se agregó una mezcla de Ácido trifluoroacético/agua tipo 1/triispropilsilano/ácido 1, 4, 7, 10- tetraazaciclododecano- N, N', N'', N''' - tetraacético (TFA/H₂O/TIS/DOT). Finalmente, la resina fue retirada por filtración, centrifugada y el péptido fue precipitado con éter frío (Jiang et al. 2008).

4.1.3. Desalinización: El medio de filtración en gel Sephadex G-10 fue utilizado para eliminar sales y posibles contaminantes generados durante la síntesis y clivaje del P19 (Millner 1995). El gel fue hidratado previamente con agua tipo 1, posteriormente se adicionó el péptido. Se recolectaron los primeros mL de la elución con agua, en donde el péptido ha eludido completamente; esto fue corroborado con la medición de la concentración y el análisis de la purificación del P19 (Jofré et al. 2011).

4.1.4. Purificación de los péptidos sintéticos: El péptido disuelto en agua fue separado de las impurezas utilizando una columna Sepak C-18 con diferentes soluciones de acetonitrilo/H₂O de 0 a 100%. Es una técnica en la que los biocompuestos con peso molecular de 1 a 6 KDa (referidos a péptidos) son purificados con eluciones de Acetonitrilo (ACN). Se utilizaron diferentes porcentajes de ACN con el fin de lograr una óptima purificación del péptido. Estos resultados se verificaron por cromatografía líquida

de alta eficiencia en fase reversa RP-HPLC y espectrometría de masas (MS) (Rivera et al. 2002).

4.2. Caracterización del péptido P19

4.2.1. **Pureza:** El análisis de pureza del P19 fue realizado empleando RP-HPLC con el fin de analizar el grado de purificación del péptido mediante la separación de moléculas de acuerdo a su hidrofobicidad para lo cual se utilizó una columna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB C18 en fase reversa equilibrada por dos sistemas de solventes: (A) H₂O con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con 0.1% TFA. Se utilizó 70% B y 30% A, en 30 min; volumen de inyección de 40µL; la detección se llevó a cabo por medición en UV ($\lambda=280$ nm). (Sahoo et al. 2004).

4.2.2. **Determinación de la Masa Molar:** La identificación de la distribución de las moléculas en función de la masa molar del péptido se determinó utilizando un espectrómetro de masas (Bruker) en modo desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) con detector de tiempo de vuelo (TOF). Se utilizó una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), la cual favorece la ionización de la muestra (Standing 2003). El péptido fue depositado en el target empleando el método de doble capa, es decir, una base de matriz saturada, seguida de la muestra y finalmente una segunda capa de matriz.

4.2.3. **Determinación de la estructura secundaria:** El análisis por dicroísmo circular (DC) fue empleado con el objetivo de determinar la estructura secundaria del péptido. Para lo cual se utilizó un espectropolarímetro Jasco-J810. El espectro fue tomado en un intervalo de longitud entre 190-260 nm, con paso óptico de la celda de cuarzo rectangular de 1mm con un ancho de banda espectral de 1nm, la cual fue lavada previamente con nitrógeno. Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres escáneres tomados a una velocidad de 20 nm/min y respuesta de un segundo. El perfil de DC del péptido P19 fue obtenido de una disolución liofilizada en: (I) tampón fosfato de sodio 50mM (TFS), pH 7 una solución acuosa del 30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en un volumen final de 500µL

(Alvarez et al. 2014). Una concentración de 0.2 mM del péptido se estabilizó en una mezcla de TFE como se describe en Kelly et al. 2005. Los espectros fueron visualizados utilizando el software del equipo Spectra manager II. Los resultados obtenidos fueron expresados en grados de elepticidad molar (θ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde:

l= es la longitud del camino óptico (cm)

c= concentración del péptido

n=número de residuos de AA en la secuencia.

4.3. Síntesis del péptido P19 nanoestructurado

El péptido P19 fue seleccionado como candidato para nanoencapsulación debido a su bajo índice terapéutico (5.28, determinado en estudios previos, Tabla 4) frente a *E. coli* O157:H7, donde valores superiores a 10 son considerados seguros (Peña-Velázquez et al. 2017). El índice terapéutico fue definido como la concentración mínima del péptido que causa efecto terapéutico (MIC₅₀) frente a la concentración mínima de péptido que causa citotoxicidad (CC₅₀) (Tamargo et al. 2015), siguiendo la siguiente formula:

$$\text{Indice terapeutico} = \frac{CC_{50}}{MIC_{50}}$$

Donde:

CC₅₀= Es la concentración mínima del péptido que causa citotoxicidad.

MIC₅₀= Concentración mínima inhibitoria 50 del péptido.

Tabla 4 Índice terapéutico del PAM P19 frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, el CC₅₀ fue determinado en la línea celular COS-7 (ATCC ® CRL-1651™) de riñón de mono verde africano.

Microorganismo	Concentración μ M		Índice terapéutico
	MIC ₅₀	CC ₅₀	

<i>E. coli</i> O157:H7	12.5	66	5.28
SARM	1.5		44

Resultados suministrados por la estudiante de Química: Yenny Paola Bautista Garcés que hacen parte de su tesis de pregrado, bajo la dirección del Dr. Mauricio Urquiza Martínez.

4.3.1. **Síntesis mediante el método de Doble Emulsión Solvente Difusión DES-D:**

El péptido nanoestructurado fue sintetizado utilizando ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) como copolímero principal, empleando el método de DES-D propuesto por Cohen-Sela (Cohen-Sela et al. 2009) con algunas modificaciones. Se utilizó un sonicador de punto para obtener una emulsión del buffer fosfato 0,005M, pH=7,4, con el péptido en Acetato de etilo (EtAc) que contiene un 10% (w/v) de PLGA. La solución resultante fue emulsificada de nuevo con buffer fosfato 0,005M, pH=7,4, esta vez añadiendo un 10% (w/v) de Polaxamer 402 (POL). El EtAc fue eliminado mediante evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotativo (Heidolph Hei-VAP precisión). Las nanopartículas se centrifugaron (Thermo Scientific IEC CL31R multispeed) para eliminar el péptido libre remanente y los residuos propios de la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas NPP19.

4.4. Caracterización fisicoquímica del péptido P19 nanoestructurado

4.4.1. **Tamaño hidrodinámico, carga superficial y morfología:** Las mediciones de tamaño hidrodinámico y carga superficial de las nanopartículas cargadas con el péptido P19 (NPP19) fueron determinadas mediante dispersión de luz en modo dinámico (DLS), utilizando un analizador de tamaño de partícula basado en la difracción de laser (Malvern Zetasizer 1000HS, Malvern Instruments, UK). La morfología de las nanopartículas fue observada por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio FEI Quanta 650.

4.4.2. **Eficiencia de encapsulamiento:** Se siguió el protocolo propuesto por Rivera et al., (2004), donde un volumen de nanopartículas cargadas con el péptido fue secado en un evaporador rotativo (Heidolph Hei-VAP precisión), el pellet fue disuelto en diclorometano

(DCM) y agitado a temperatura ambiente. Se realizaron medidas espectrofotométricas a $\lambda=260\text{nm}$ (Shimadzu UV-1800), y se compararon con una curva de calibración del péptido en agua (Anexo 1), a diferentes concentraciones a partir de $3,125\mu\text{M}$ hasta $400\mu\text{M}$ (Rivera et al. 2004). La eficiencia de encapsulación fue definida como la relación entre la cantidad de péptido encapsulado y la cantidad total del péptido añadido al inicio de la preparación (Thomasin et al. 1996). Los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$).

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento} = \frac{\text{Peptido Encapsulado}}{\text{Peptido total}} * 100$$

4.4.3. Perfil de liberación in vitro: Una cantidad determinada de nanopartículas cargadas con péptido fue diluida en agua desionizada; La muestra fue puesta en una incubadora con agitación orbital (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 37°C , 50 rpm, periódicamente se tomaron muestras de la suspensión que fueron centrifugadas posteriormente en un tubo amicon (30,000 Da), y se analizaron en el espectrofotómetro a $\lambda=260\text{nm}$. El ensayo se realizó por triplicado bajo condiciones sink (10% de la concentración de saturación en el medio después de la liberación del 100%) (Gibaldi y Feldman 1967).

4.5. Determinación de la CMI y CMB del P19 libre y nanoencapsulado: La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las bacterias patógenas *E. coli* O157:H7 y SARM, se realizó siguiendo el protocolo del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) documento M100 S20 (CLSI 2017) y el protocolo de microdilución en caldo estandarizado en el GIBIM (Paredes et al. 2014; Espinel-ingroff 2004). La CMI fue definida como la menor concentración de antibiótico (péptido libre y nanoencapsulado) que produce una inhibición en el crecimiento de bacteriano. Los valores de CMI_{50} y CMI_{90} corresponden a las dosis capaces de inhibir el 50 y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente. La CMB fue definida como la concentración mínima capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano (Cruz et al. 2013). Finalmente, se determinó si la actividad del péptido es

bacteriostática o bactericida. Se considera bacteriostático si el valor del CMB es 4 veces superior al valor del CMI₉₀ (CMB/CMI >4) (Pankey & Sabath 2004) .

4.5.1. **Determinación de la CMI:** Se preparó un preinóculo a partir de un cultivo en placa fresco de cada una de las cepas. Se utilizó caldo Luria–Bertani (LB; Merck) para *E. coli* O157:H7 y caldo Mueller-Hinton (MH; Merck) para SARM, los preinóculos fueron incubados durante un periodo de 12 horas a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una concentración bacteriana de 4.6×10^8 Unidades Formadoras de Colonia por mL(UFC/mL), utilizando como referente la escala de Mcfarland. El inóculo se preparó a partir del preinóculo llevándolo a un volumen final de 30 mL con medio estéril, hasta obtener una absorbancia entre 0,07 y 0,1 (equivalente a $\sim 5 \times 10^5$ UFC) (Espinel-ingroff 2004).

Posteriormente se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100µL del inóculo bacteriano en microplacas Elisa de 96 pozos y se evaluaron concentraciones seriadas del péptido sintetizado libre y nanoencapsulado desde 0,2 hasta 100 µM para las dos cepas. Las placas se incubaron a 37°C con agitación constante y se procedió a medir la absorbancia periódicamente cada hora en un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA (Bio-rad, Imarck) a 595 nm.

4.5.2. **Determinación de la CMB:** Una vez evaluada la cinética de crecimiento de las cepas patógenas, se tomó una alícuota de 100 µL de cada pozo que contuviera las diferentes concentraciones del P19 y NPP19. En tubos eppendorf de 2mL se añadieron 900µL de agar infusión cerebro corazón (BHI) y se incubo a 37°C durante 24 horas. Se tomó una alícuota de 10µL de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellos tubos eppendorf donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de la CMB se definió como la concentración mínima capaz de inhibir el 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo (sin tratamiento) (Espinel-ingroff 2004).

4.6. Obtención de cepas patógenas resistentes al péptido P19

Se expusieron las cepas de *E. coli* O157:H7 y SARM a concentraciones sub-inhedoras del P19, el pase inicial se realizó en un tubo eppendorf conteniendo el P19 disuelto a la mitad del MIC₅₀, las bacterias sobrevivientes fueron transferidas a otro tubo eppendorf con el doble de la concentración anterior a lo largo de 50 de pases (selección positiva). Como grupo control se utilizaron las mismas bacterias del pase inicial y se realizaron igualmente 50 pases en ausencia de P19 (control de selección) (Perron *et al.* 2006; Shireen *et al.* 2013; Ulvatne 2002; Peng *et al.* 2005). Finalmente, se comprobó la actividad antimicrobiana utilizando el protocolo de microdilución en caldo (Carone *et al.* 2014).

4.7. Determinación de cambios en el perfil proteómico de *E. coli* O157:H7 y SARM sensibles y resistentes al péptido P19

Las muestras biológicas fueron separadas utilizando electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE), para lo cual se requirió de un tratamiento previo con el fin de obtener proteínas libres de otras moléculas y contaminantes sin modificar sus características fisicoquímicas (Weiner y Li 2008).

La mayoría de los estudios proteómicos sobre resistencia a antibióticos se dividen en dos amplias categorías: la comparación entre bacterias sensibles y tratadas, o la comparación de bacterias resistentes contra sensibles (Renzzone *et al.* 2005). En este trabajo ambas aproximaciones son estudiadas, además de analizar el efecto de la nanoencapsulación sobre el perfil proteómico de *E. coli* y SARM. En la Tabla 5 se enumeran los experimentos realizados tanto en *E. coli* como en SARM. Se llevaron a cabo 6 experimentos cada uno por triplicado (n=3), para un total de 36 geles analizados. Posteriormente se hizo un análisis de correlación entre las intensidades de las manchas detectadas en los diferentes geles con el fin de determinar la variación en términos del

grupo experimental; se calculó el coeficiente de correlación entre las comparaciones que se realizaron.

Tabla 5 Distribución de geles en los diferentes experimentos realizados con el péptido P19 frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, cada imagen corresponde a un gel analizado.

Microorganismo	# Exp.	Grupos	Nº Geles
<i>E. coli</i> O157H7	1	Control vs Tratamiento P19	6
	2	Control* vs Resistente	6
	3	Control NP** vs NPP19	6
SARM	4	Control vs Tratamiento P19	6
	5	Control* vs Resistente	6
	6	Control NP** vs NPP19	6
Imágenes analizadas totales:			36

*La bacteria del grupo control de los experimentos 2 y 5 fue sometida a la misma cantidad de pases (50) que la bacteria que se le indujo resistencia, con el objetivo de eliminar las diferencias producto de los múltiples pases.

**La bacteria del grupo control de los experimentos 3 y 6 recibió tratamiento con nanopartículas vacías, con el objetivo de eliminar posibles diferencias producto de las nanopartículas.

4.7.1. Extracción y determinación de la concentración de proteínas: Inicialmente se reactivaron las cepas de *E. coli* O157:H7 y SARM cultivando en medio líquido LB a 37 °C durante 16 a 24 h. Posteriormente, se sembraron por aislamiento en agar BHI y se incubaron a 37°C durante 16-24 horas. Nuevamente se sembraron en caldo LB, utilizando una colonia pura en cada caso y se dejó crecer durante 12 a 14 H a 37°C (hasta alcanzar la fase media exponencial, de acuerdo con cinéticas de crecimiento previamente realizadas). Estos cultivos fueron utilizados como preinóculos, los cuales fueron añadidos, utilizando un 10% del volumen final (100 ml en Erlenmeyer de 500 ml), de medio LB o MH para *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a 50 rpm durante 4 horas a 37 °C (Espinel-ingroff 2004).

Posteriormente se centrifugaron 200 mL del cultivo obtenido anteriormente, a 10.000 rpm y 4 °C, durante 15 minutos. Se efectuaron tres lavados del pellet, utilizando buffer Tris 20 mM, para eliminar sales. El pellet obtenido de *E. coli* O157:H7 fue resuspendido en buffer de lisis (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Ditiotreitól DTT 100 mM, Tris 40 mM, Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo PMSF 1 mM, Ácido Etildiaminotetraacético EDTA 1 mM,

Ortovanadato de Sodio 1 mM, Chaps 4%, Anfolitos 1%) con el fin de controlar la proteólisis indeseable de las muestras y mantener en una solución estable las moléculas obtenidas; posteriormente el pellet fue resuspendido en vortex hasta obtener una suspensión homogénea (Linders *et al.* 2009). En el caso de SARM, la pared bacteriana es más gruesa, por lo que fue necesario incluir un paso adicional de lisis enzimática de la pared celular; se utilizó el buffer de lisis suplementado con lisozima y lisostafina, enzimas que poseen afinidad para degradar el peptidoglicano presente en la pared celular de esta bacteria Gram positiva (Attia *et al.* 2013; Bonar *et al.* 2015).

Con el objetivo de romper las membranas celulares y liberar la mayor cantidad de moléculas proteicas, las muestras fueron homogeneizadas con un procesador ultrasónico (Cole-Parmer U.S.A). Se hizo en frío, para evitar la desnaturalización de proteínas provocada por el calentamiento. A continuación, las proteínas fueron precipitadas con un disolvente orgánico (éter) para eliminar compuestos no deseados, el pellet obtenido se resuspendió en buffer de lisis y se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bradford 1976) con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón estándar, y buffer de lisis como blanco y medio de dilución.

4.7.2. Electroforesis bidimensional Las proteínas obtenidas en la etapa anterior fueron analizadas empleando electroforesis bidimensional (2D-PAGE), técnica descrita por O'Farrell (1975) y modificada por Görg *et al.*, (1988). 2D-PAGE es una técnica que permite la separación de proteínas o "spots" dependiendo de dos propiedades: punto isoeléctrico y peso molecular.

Se realizó 2D-PAGE en combinación con MALDI-TOF para determinar la expresión de proteínas en *E. coli* O157:H7 y SARM en los diferentes tratamientos (Tabla 5). Se utilizaron dos gradientes de pH inmovilizado (IPG-Strip) para *E. coli* uno de rango de pH 3-10 no lineal y para SARM uno de rango de pH 4-7, con el fin de encontrar el mayor número de spots según las características propias de la bacteria. La muestra fue mezclada y cargada al IPG-strip de 17 cm en una proporción 1:1 con buffer de

rehidratación (Urea 8 M, Chaps 2%, DTT 50 Mm, Anfolitos 0.2% y Azul de bromofenol 0.1%) durante 12 a 14 horas (O'Farrel 1975; Görg *et al.* 2004).

Las proteínas se separaron en un Protean IEF cell (Bio-Rad) según su punto isoeléctrico en una primera etapa conocida como isoelectroenfoque (IEF). Posteriormente, se realizó un paso de equilibrio mediante un proceso de reducción-alquilación en un buffer que contiene Urea 6 M, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, SDS 2%, Glicerol 20% y DTT 2%, logrando así la reducción de puentes disulfuro en la muestra; un segundo paso se llevó a cabo con una solución que contiene yodoacetamida 2% en lugar de DTT para bloquear los grupos sulfhídricos (Görg *et al.* 1988a). Cada paso se realizó en agitación constante utilizando un agitador orbital, a temperatura ambiente (25°C), 50 rpm por 30 minutos.

En la segunda etapa las proteínas fueron separadas de acuerdo con su peso molecular (Laemmli 1970). Se corrió una SDS-PAGE en una cámara electroforética Protean xi Cell (Bio-Rad) a 200v. Se usó buffer de corrida (Glicina 1.44%, Tris-base 0.2%, SDS 0.1%) para la migración de las proteínas. El peso molecular y punto isoeléctrico de las muestras se determinó comparando la movilidad electroforética de los marcadores *PageRuler™ unstained protein ladder, 2D- SDS-PAGE Standards*.

Finalmente, los geles se fijaron en una solución de Metanol 50% y Ácido fosfórico 2%. Para realizar la tinción de los geles obtenidos se preparó una solución de metanol 33%, ácido fosfórico 3%, sulfato de amonio 17% y azul de coomassie G-250. Posteriormente, los geles se lavaron con agua MQ y se almacenaron en una solución decolorante débil (Metanol 5% y Ácido acético 10%). Cada experimento fue realizado por triplicado.

4.7.3. Registro y análisis de imágenes: Los geles obtenidos fueron registrados empleando un Documentador de geles Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). Los spots se detectaron utilizando el software PDQuest 2D (Bio-Rad), el cual convierte señales de muestras biológicas a datos digitales teniendo en cuenta las coordenadas e intensidad

de cada pixel; las agrupaciones de pixeles determinan la densidad de cada spot. Se realizó la exploración de los datos y se aplicó un test estadístico para comparar los spots de cada grupo con los demás y determinar si existen diferencias significativas.

4.7.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF: Es una técnica aplicada ampliamente al análisis de moléculas biológicas debido a su alta compatibilidad con 2D-PAGE. Los spots de interés fueron cortados del gel y desteñidos con ACN 50% y Bicarbonato de amonio 50 mM. Cada pieza seca se rehidrató con una concentración de 13 ng/μL de tripsina en bicarbonato de amonio 50 mM por 17 horas. Los péptidos tripsinizados se extrajeron del gel con buffer de extracción (50% de ACN en 1% de TFA), se sonicaron en baño por 15 minutos. Los péptidos se mezclaron con la solución de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) (20 mg / ml en buffer: 50% de ACN en 1% de TFA) y se aplicaron en un porta muestras (ground steel target) en proporción 1:1 (muestra: matriz). Las digestiones tríplicas se analizaron con el espectrómetro de masas MALDI-TOF / TOF Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) operado por el software FlexControl v.33 y equipado con un láser Nd: YAG de 355 nm. Los espectros de masas se adquirieron en el modo de reflectrón positivo y se promediaron a partir de aproximadamente 1000 disparos de láser. Como calibrante externo se empleó una digestión tríplica carbamidometilada de suero de albúmina bovina (BSA fracción V, Merck) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los espectros de masas obtenidos se enviaron al motor de búsqueda Mascot (www.matrixscience.com) y se compararon con la base de datos Swiss-Prot bajo el filtro de taxonomía "Firmicutes" para SARM y "*Escherichia coli*" para *E. coli* O157:H7 (Dave *et al.* 2011). La identificación de proteínas se realizó sobre la base de la puntuación MASCOT estadísticamente significativa ($p < 0,05$), este sistema de puntuación se basa en el cálculo de la probabilidad del emparejamiento entre los datos experimentales y una entrada de una base de datos sea por azar, muy similar a los algoritmos de búsqueda de secuencias por homología (Perkins *et al.* 1999).

4.7.5. Análisis Bioinformático: Se utilizó el software XLSTAT (www.xlstat.com) para construir los gráficos de mapas de calor y expresión diferencial. También se empleó el software STRING (<https://string-db.org>) el cual facilita la construcción de una red de interacciones predictiva (Interactoma), que permite evaluar las funciones y rutas biológicas altamente representadas, asociadas con la lista de proteínas diferenciales. En el interactoma las proteínas se representan como nodos. Las interacciones determinadas experimentalmente se representan con rosado y azul claro aquellas predichas por bases de datos curadas. Las interacciones predichas se representan con azul (conurrencia) y verde (vecindad). Las asociaciones por minería de textos se representan con líneas verdes claras y la coexpresión se representa con líneas negras. Por último, se empleó el programa PANTHER (Análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas; <http://pantherdb.org/software>). las proteínas expresadas de forma diferencial se clasificaron de acuerdo con sus términos de ontología génica (GO), entre los “GO” más comunes están: Proceso celular”, Procesos metabólicos, Localización, Respuesta a estímulos. A continuación se definen los criterios utilizados por el software para realizar la clasificación: Proceso celular: cualquier proceso que se lleva a cabo a nivel celular como crecimiento y/o mantenimiento celular, fisiología celular; Procesos metabólicos: Las reacciones y vías químicas, incluido el anabolismo y el catabolismo, por los cuales los organismos vivos transforman sustancias químicas.; Localización: Cualquier proceso en el que una célula, una sustancia o una entidad celular, como un complejo proteico u orgánulo, se transporta, se adhiere o se mantiene en una ubicación específica. Respuesta a estímulos: Cualquier proceso que resulte en un cambio en el estado o actividad de una célula o un organismo (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión genética, etc.) como resultado de un estímulo.

5. Resultados y Discusión

5.1. Síntesis y purificación del péptido P19

5.1.1. **Síntesis:** El PAM P19 fue diseñado por investigadores del GIBIM mediante herramientas bioinformáticas y de biología estructural (Rondon-Villarreal et al. 2014). Este péptido surge a partir de la modificación de la secuencia aminoácídica del péptido GIBIM-P5S9K (Cruz et al. 2017), el cual ha sido caracterizado como uno de los mejores en relación con sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Su actividad antimicrobiana fue probada frente in vitro frente a *E. coli* y SARM y la secuencia está en curso de patente.

5.2. Caracterización del péptido P19

5.2.1. **Pureza:** El péptido P19 sintetizado fue purificado utilizando una columna Sepak C-18 y analizado mediante RP-HPLC obteniéndose en el cromatograma una señal principal, sin presencia de deleciones, y un tiempo de retención de 2 min y otro mucho menor a los 5 minutos (Figura 9). Sin embargo, cabe resaltar que el pico obtenido a los 2 minutos representa mas del 90% de las especies, y dentro de ese pico se encuentra el peso molecular del péptido P19, determinado por MALDI-TOF (Figura 10).

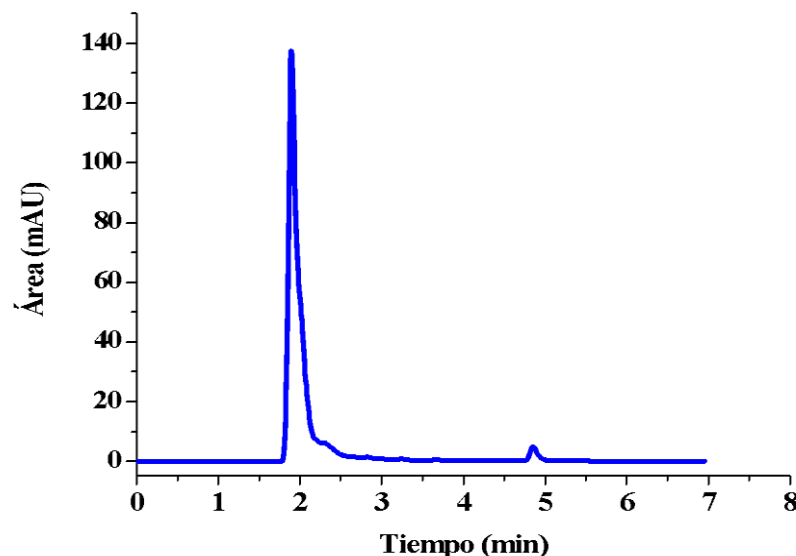


Figura 9 Análisis cromatográfico del péptido P19 por RP-HPLC utilizando una columna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB C18 equilibrada utilizando dos sistemas de solventes: H₂O con 0.1% TFA y ACN con 0.1% TFA. La detección se llevó a cabo por medición en UV ($\lambda=280$ nm)

5.2.1. Determinación de la Masa Molar: Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se logró identificar la masa molecular del PAM P19, se encontró una correspondencia entre el ion molecular calculado in silico de 1864,25 Da y el experimental que esta alrededor de 1863,165 Da (Figura 10), se observaron también algunas señales menos abundantes en el espectro de masas que pueden corresponder a: (I) Algunos residuos producto de la síntesis y (II) fragmentos que pueden ser aductos cargados positivamente formados en el proceso de ionización por interacción de la matriz con iones metálicos (Na⁺, K⁺) y sales. estas sales son impurezas comunes que se encuentran en el HCCA y en muchas muestras de proteínas, estos iones además desempeñan un papel importante en la formación de agregados de matriz, los picos de clúster siempre aparecen en ensamblajes de varios miembros. Los conjuntos de picos de clúster generalmente están separados por 190-228 unidades de masa, que representan el rango de peso molecular de la matriz 4-HCCA más un ion de protón, sodio o potasio. En general, la intensidad de los picos del grupo disminuye con el aumento de la masa. Sin embargo, las interferencias pueden aparecer en la región de masa hasta los 2000 Da,

que desafortunadamente como este caso es la región de interés para el mapeo de masa peptídica (Keller & Li 2000).

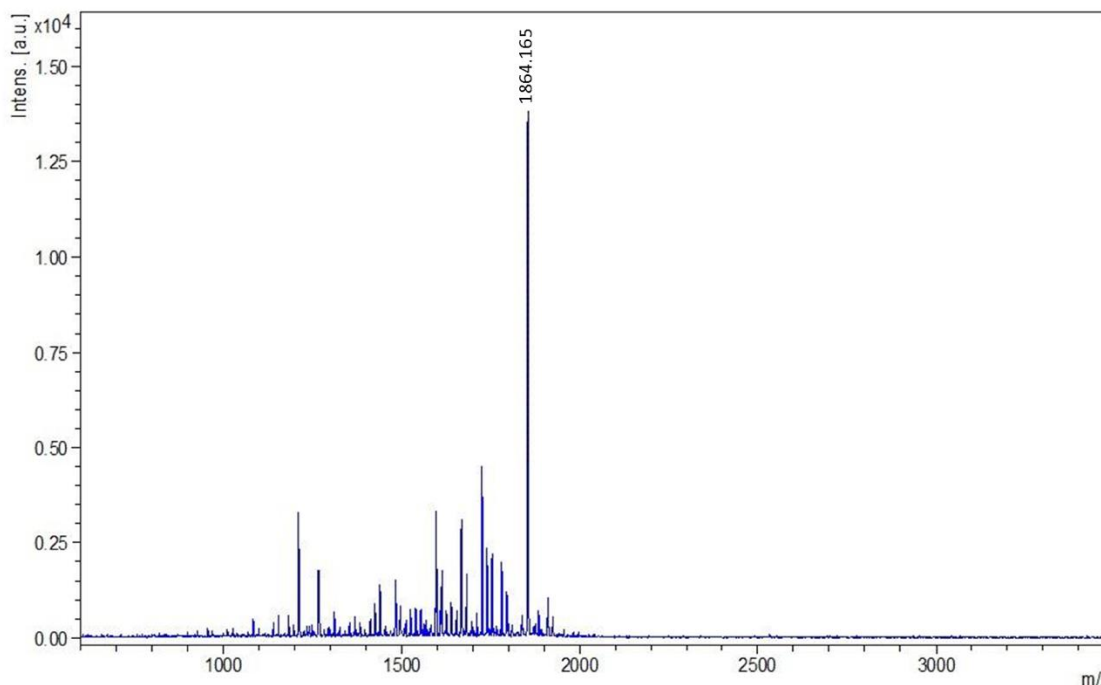


Figura 10 Espectro de masas del péptido P19, utilizando una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), El péptido fue depositado en el target por el método de doble capa, es decir, una base de matriz saturada, seguida de la muestra y finalmente una segunda capa de matriz

5.2.1. Determinación de la estructura secundaria: Se realizó la evaluación de la estructura secundaria del péptido P19 empleando dicroísmo circular en condiciones simuladas de membrana en solución de TFE al 30% (v/v). En el espectro de dicroísmo circular se presentan dos bandas negativas a 205 y 215 nm (Figura 11), estas bandas son características de una estructura α -hélice bien definida (Greenfield 2006).

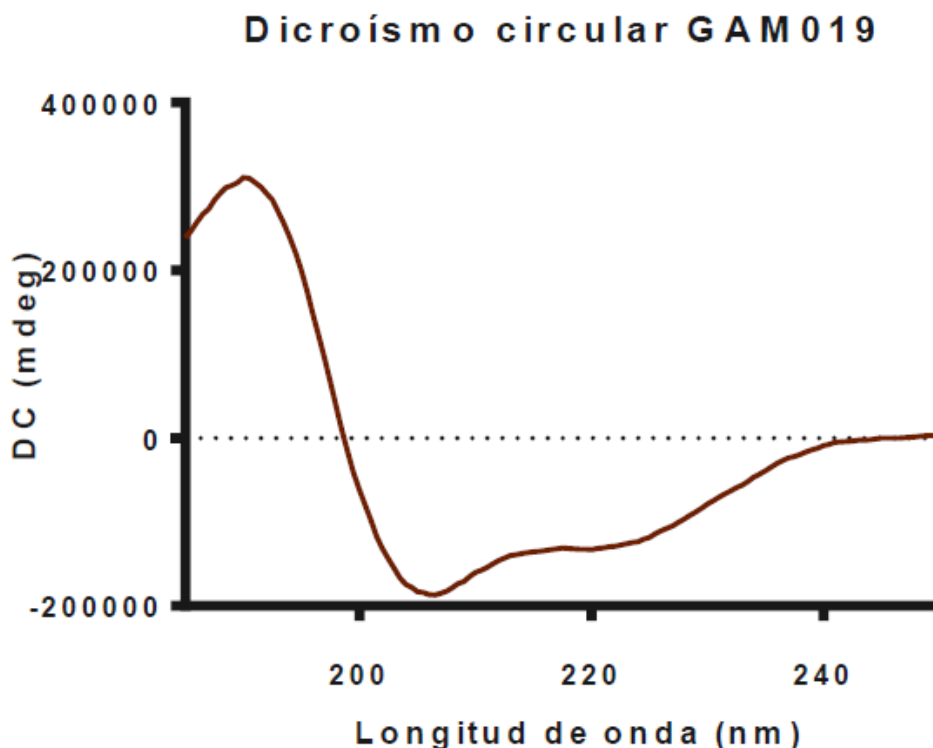


Figura 11 Espectro de dicroísmo circular del péptido P19 bajo condiciones simuladas de membrana en solución de TFE al 30% (v/v).

5.3. Síntesis del péptido P19 nanoestructurado

5.3.1. **Síntesis mediante el método de Doble Emulsión Solvente Difusión DES-D:** En este trabajo se escogió el método de DES-D que se basa en la emulsión de agua/aceite/agua (W/O/W por sus siglas en ingles), debido a que es uno de los mejores procedimientos para la encapsulación de todo tipo de fármacos hidrosolubles; a diferencia de los métodos de una sola emulsión que son ideales para encapsular fármacos insolubles en agua como esteroides (Makadia y Siegel 2011). Utilizando esta metodología se han logrado encapsular diferentes principios activos hidrosolubles de manera exitosa como: (i) alendronato, fármaco contra la osteoporosis (Cohen-Sela et al. 2009), (ii) fluconazol, uno de los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de candidiasis (Gómez-Sequeda et al. 2017), y (ii) péptidos sintéticos antimicrobianos (Cruz et al. 2017).

5.4. Caracterización fisicoquímica del péptido P19 nanoestructurado con PLGA

5.4.1. **Tamaño hidrodinámico, carga superficial y morfología:** Múltiples trabajos han sido realizados encapsulando PAMs en PLGA, ya sea en sistemas de nanopartículas o micropartículas (Water et al. 2015; Li et al. 2017; Cruz et al. 2017). Una de las principales diferencias entre estos sistemas, aparte del evidente contraste en el tamaño de la partícula consiste en que el sistema microparticulado, permite cargar una gran cantidad de péptido el cual puede tener una liberación prolongada de días o incluso semanas, mientras que los sistemas de nanopartículas tienen una liberación rápida y su tamaño reducido aumenta su reactividad (Kohane 2007).

En consecuencia, en este trabajo se optó por sintetizar un sistema nanoparticulado, donde el tamaño y la carga superficial de la nanopartícula son parámetros cruciales que afectan la velocidad de liberación, el porcentaje de encapsulación, la farmacocinética del péptido nanoestructurado e incluso la actividad antimicrobiana. Por lo tanto es clave encontrar el equilibrio entre estas dos variables (Yin Win y Feng 2005; He *et al.* 2010).

Debido a esto se realizaron una serie de experimentos variando la relación P19/PLGA con el objetivo de determinar la mejor proporción. Los resultados de la serie de experimentos se muestran en la Figura 12. Se evidenció el efecto de la cantidad de péptido sobre el potencial zeta y tamaño de las NPP19; en la medida que aumenta la cantidad de péptido, la carga de la nanopartícula aumenta, acercándose a 0 mV, lo cual disminuye la repulsión entre las nanopartículas, generando aglomeraciones (0,5 µg P19/µg PLGA, tamaño: $1976 \pm 496,56$ nm, potencial zeta: $-11,80 \pm 0,95$ mV, PDI=1). Sin embargo, en concentraciones superiores a 4 µg de P19/µg PLGA se observa que el sistema se estabiliza, obteniendo nanopartículas de tamaños inferiores a los 300nm con carga superficial positiva.

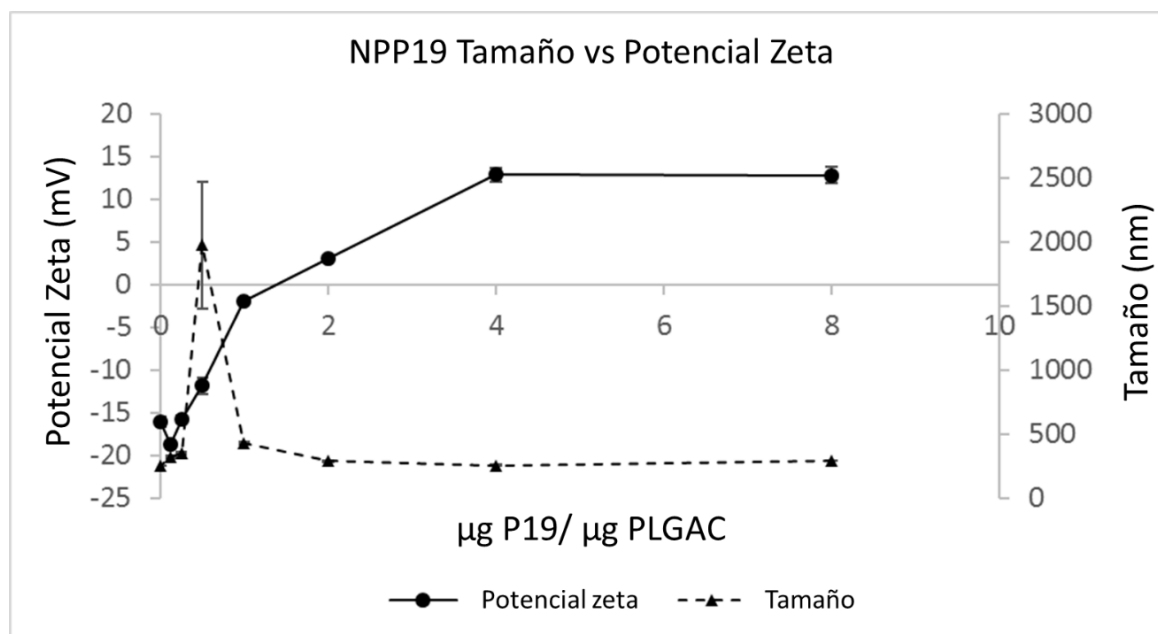
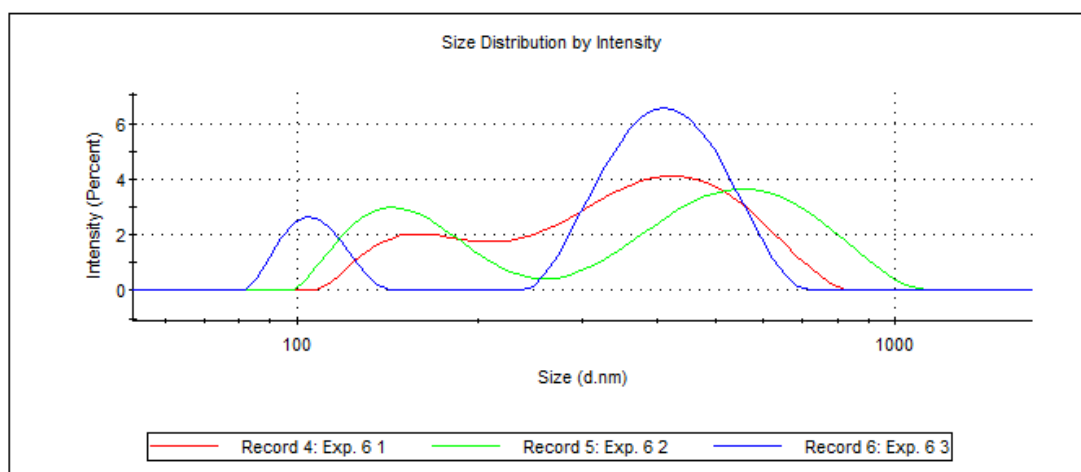


Figura 12 Efecto del potencial zeta sobre el tamaño de la nanopartícula a diferentes concentraciones de P19/PLGA.

Finalmente, la mejor relación fue la de 8 μg P19/ μg PLGA, que permitió sintetizar nanopartículas cargadas con el péptido (NPP19) de tamaños hidrodinámicos de $292,3 \pm 3,67$ nm y una carga superficial $12,00 \pm 0,95$ mV (Figura 13). Finalmente el índice de polidispersión (PDI) de 0,188, demostró una distribución estrecha y una buena reproducibilidad del método (Bivas-Benita *et al.* 2004; Vij *et al.* 2010).

Tamaño hidrodinámico

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 292,3	Peak 1: 411,1	78,2	129,5
Pdl: 0,188	Peak 2: 162,2	21,8	25,68
Intercept: 0,893	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Potencial zeta

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 12,0	Peak 1: 12,0	100,0	6,30
Zeta Deviation (mV): 6,30	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,219	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			

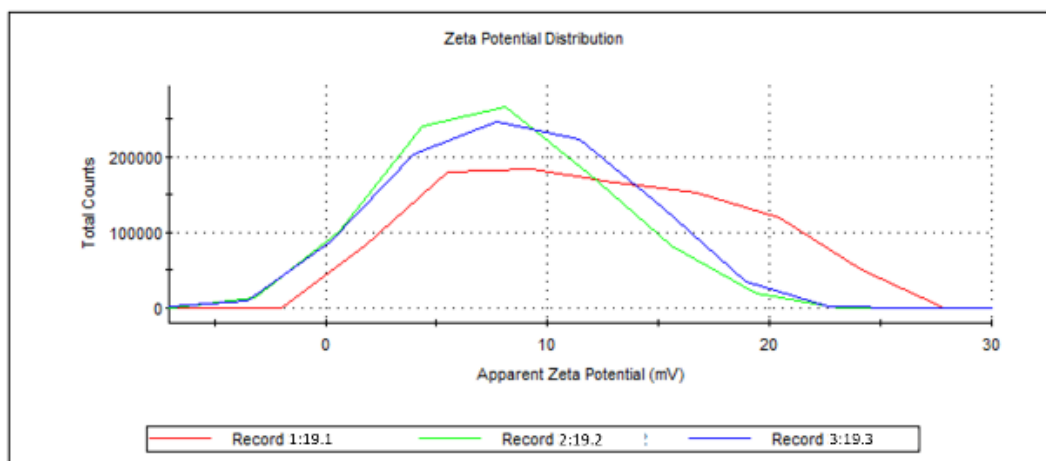


Figura 13 Distribución de tamaño y carga superficial de las NPP19 caracterizadas en la relación de 8 μg P19/ μg PLGA por DLS y LDE. A) muestra el tamaño hidrodinámico, B) Muestra el potencial zeta.

Las NPP19 fueron 6 veces más pequeñas que las obtenidas por Li *et al.* 2017 (Li *et al.* 2017), mediante la técnica de electrospray. Por otra parte, en comparación con otros trabajos que utilizan técnicas de doble emulsión se obtuvieron nanopartículas ligeramente más grandes entre un 11 y 23% (Water *et al.* 2015; Cruz *et al.* 2017). Otro de los objetivos de la síntesis fue la obtención de nanopartículas con carga positiva, ya que se ha demostrado que las nanopartículas catiónicas interactúan mejor con las membranas y paredes celulares bacterianas las cuales son de naturaleza aniónica (Khayata *et al.* 2012; Cruz *et al.* 2017). En este trabajo se logró obtener nanopartículas catiónicas ($12,00 \pm 0,95$ mV) sin necesidad de utilizar polímeros catiónicos como la polietilenimina o el quitosano, ya que estos polímeros han mostrado actividad citotóxica (Huang *et al.* 2004; Gómez-Sequeda *et al.* 2017).

La morfología de las NPP19 es esférica sin aglomeraciones (Figura 14,B) con tamaños alrededor de 290 nm (Figura 14, A) consistentes con el tamaño determinado por DLS (Figura 12). Estas nanopartículas son similares en tamaño, forma y dispersión a las obtenidas por Water *et al.* 2015 y Cruz *et al.* 2017 (Water *et al.* 2015; Cruz *et al.* 2017).

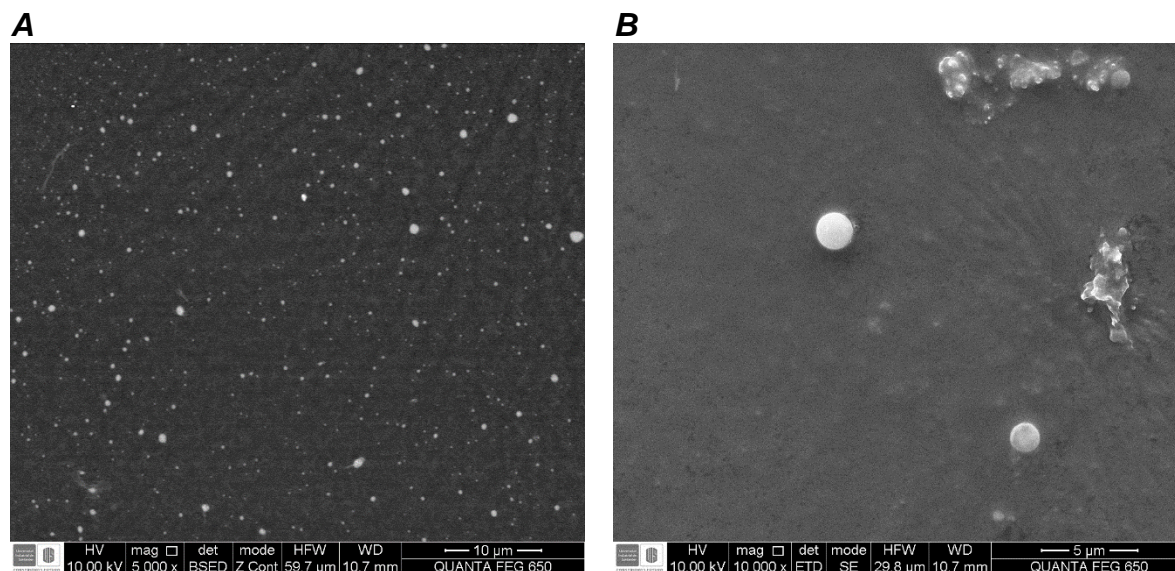


Figura 14 Micrografía de las NPP19 obtenida por micrografía electrónica de barrido (SEM), (A) Imagen general de la población de NPP19, (B) Muestra la morfología de las nanopartículas obtenidas.

5.4.2. Eficiencia de encapsulamiento: Se analizó también el efecto del potencial zeta sobre el porcentaje de encapsulamiento (Figura 15), se encontró una relación clara entre ambos parámetros. Al igual que en la Figura 12, se observa que para la concentración

de 0,5 μg P19/ μg PLGA, la eficiencia de encapsulación disminuyó drásticamente hasta 41%; esto puede deberse a la alta inestabilidad de las NPP19 a estas concentraciones en donde la nanopartícula se acerca al potencial zeta de cero. De esta manera se confirmó el efecto del potencial zeta sobre los parámetros tamaño y eficiencia de encapsulación, como lo demostraron otras publicaciones (Stoll 2013; Malvern Panalytical 2005).

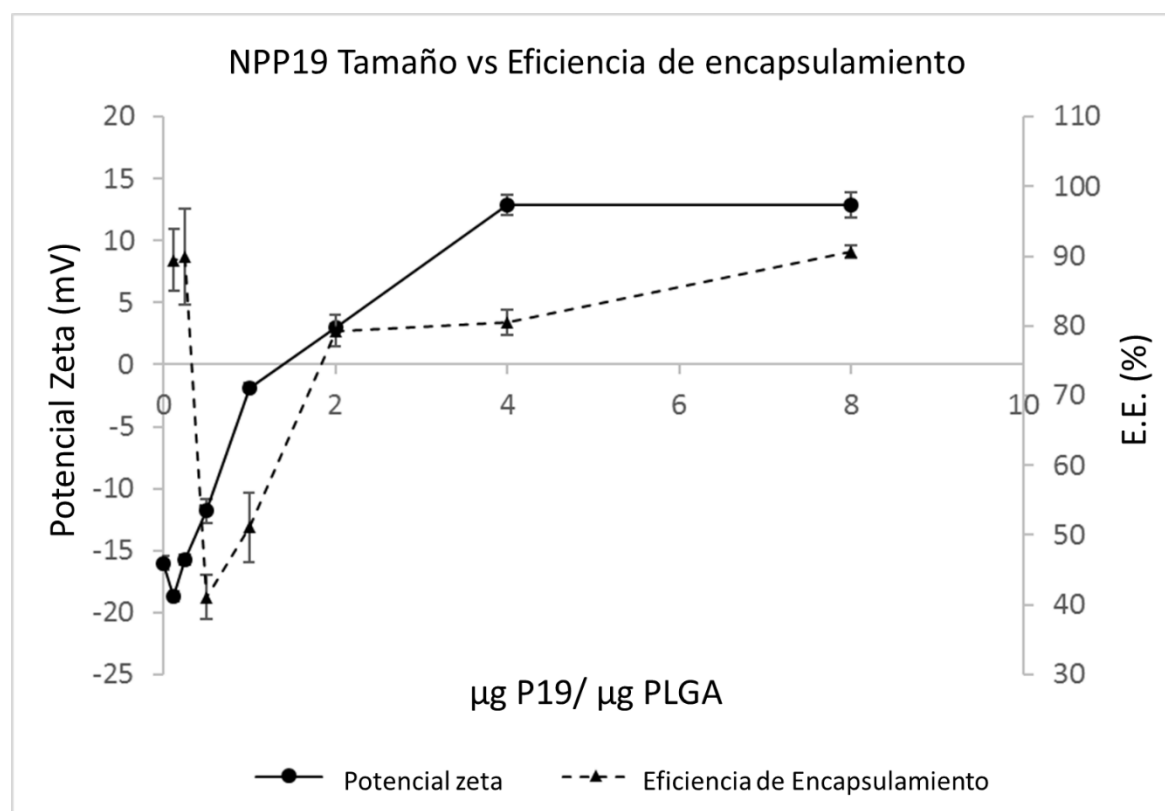


Figura 15 Efecto del potencial zeta sobre el tamaño de la nanopartícula a diferentes concentraciones de P19/PLGA.

Se relacionó el porcentaje de encapsulamiento con la capacidad de carga del polímero (Figura 17). Obteniendo excelentes resultados en la relación 8 μg P19/ μg PLGA, con un porcentaje de encapsulamiento superior al $90,5 \pm 0,9\%$ y una capacidad de carga de hasta 6,75 μg P19/ μg PLGA. Esto puede deberse a la naturaleza anfipática del péptido y a las interacciones electrostáticas entre el péptido de carga neta positiva y el polímero de carga negativa, también es probable que la nanopartícula tenga un centro acuoso el cual le permite albergar una mayor cantidad de péptido (Figura 16). Las nanopartículas obtenidas en este trabajo lograron encapsular un 35% más péptido en comparación con

las nanopartículas obtenidas por Cruz *et al.* 2017 (Cruz *et al.* 2017). Estos resultados son muy similares a los obtenidos por otros autores con porcentajes de encapsulamiento superiores al 90% (Water *et al.* 2015; Li *et al.* 2017).

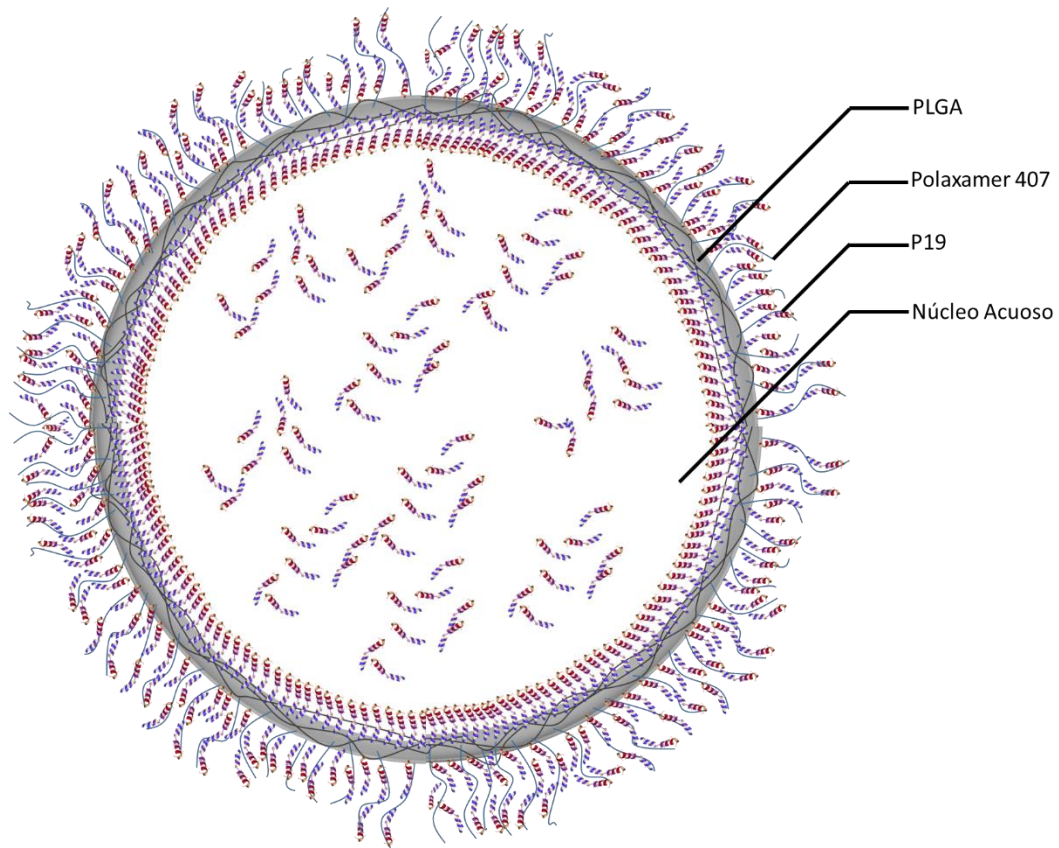


Figura 16 Posible distribución del péptido en la nanopartícula, es probable que la nanopartícula posea un centro acuoso con la capacidad de albergar una mayor cantidad de péptido.

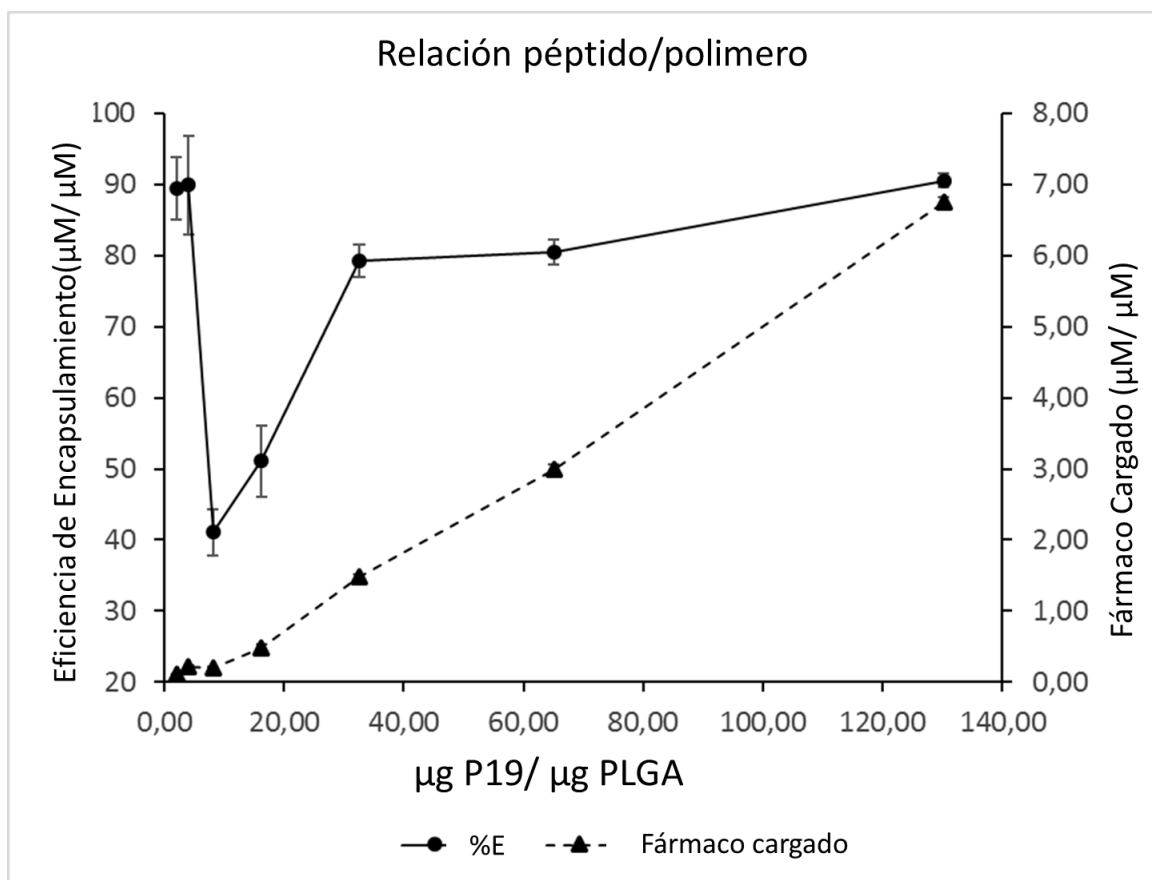


Figura 17 Relación de la eficiencia de encapsulamiento y la capacidad de carga del polímero

5.4.3. Perfil de liberación in vitro: Para realizar el perfil de liberación in vitro se escogieron las nanopartículas sintetizadas con una relación 8 μg P19/ μg PLGA la cual presentó una cinética de liberación rápida en los primeros 60 minutos ($>45 \pm 1,11\%$); posteriormente se observó un efecto de liberación controlada que se extiende hasta los 2880 minutos donde se libera el $95 \pm 3,17\%$ (Figura 18). Este resultado puede corroborar la suposición realizada en la Figura 16, donde se plantea el sistema de transporte del tipo nanocápsula, ya que la liberación rápida del 51% del péptido en los primeros 20 minutos es posible que sea la porción del péptido que se embebido en la superficie de la nanopartícula, lo cual permite que este se disocie rápidamente, mientras que otra cantidad del péptido queda en el interior (49%), es liberada lentamente en la medida que el PLGA es hidrolizado. Este perfil de liberación es muy similar al obtenido por otros autores

encapsulando diferentes principios activos (Cohen-Sela et al. 2009; Gómez-Sequeda et al. 2017; Cruz et al. 2017).

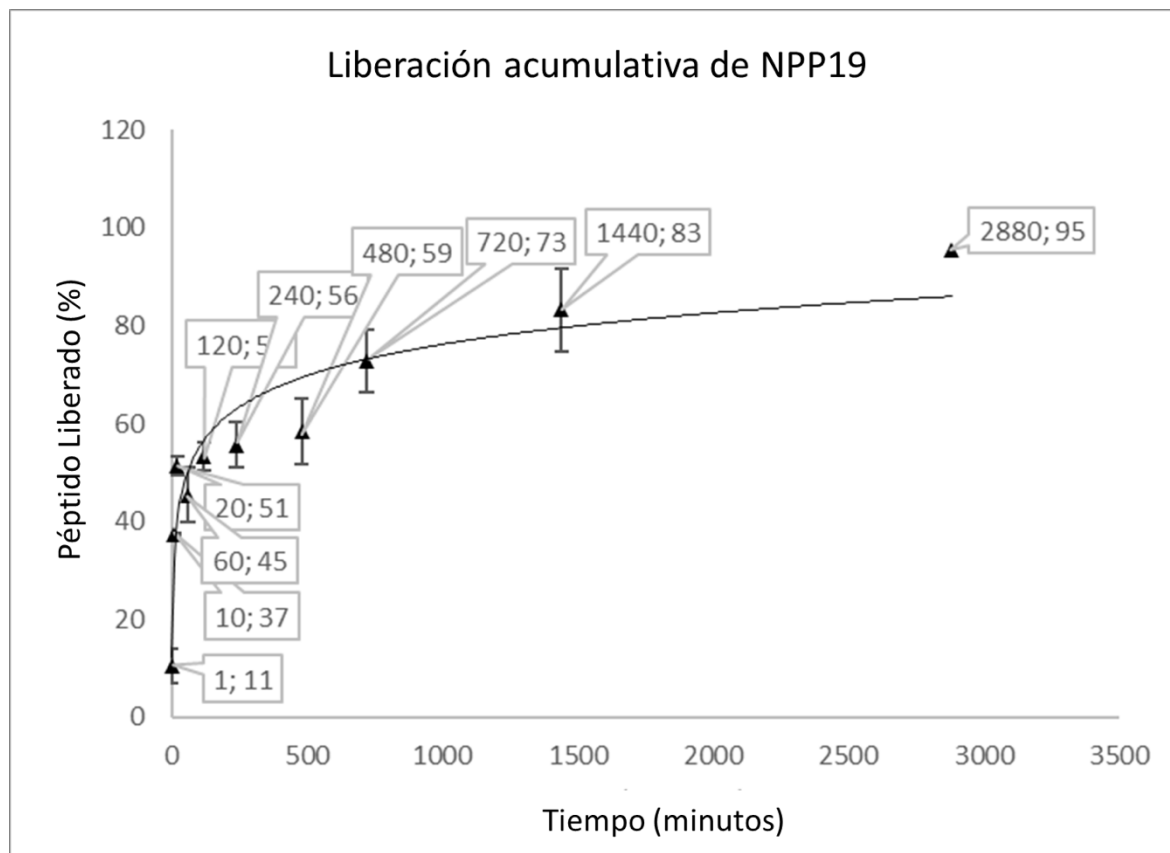


Figura 18 Perfil de liberación acumulativo de NPP19, se tomaron muestras a diferentes tiempos hasta 48 horas.

5.5. Determinación de la CMI y la CMB del P19 libre y nanoencapsulado.

El ensayo de susceptibilidad de *E. coli* O157:H7 y SARM tratados con el péptido libre P19 y nanoencapsulado NPP19 se realizó utilizando el método de microdilución en caldo. Se observó una fuerte acción antibacteriana del péptido en *E. coli* con CMI₅₀ en rangos de 12,5 y 3,13 μM para el PAM P19 libre y el nanoencapsulado NPP19 respectivamente. En este caso la nanoencapsulación logró aumentar 4 veces la actividad del péptido (Figura 19, Tabla 6), es posible que este incremento de la actividad antimicrobiana esté relacionado con el aumento de la concentración focal del péptido sobre la membrana bacteriana (Cruz et al. 2014).

Por otra parte, en SARM se determinó la CMI₅₀ en 1,5 y 0,7 μM para P19 libre y NPP19 respectivamente; en este caso, la encapsulación también favoreció la capacidad antibacteriana del péptido aumentando su actividad 2 veces (Figura 20, Tabla 6). Sin embargo, los resultados de CMI₉₀ y CMB demostraron una disminución de la actividad del péptido encapsulado en comparación con el péptido libre. Esto puede deberse a la baja velocidad de liberación del P19 de la nanopartícula, ya que el proceso de hidrolisis del PLGA generalmente toma varias horas (Figura 18). Se logró comprobar que las nanopartículas vacías (NPs) no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7 y SARM. Finalmente, se determinó que el péptido P19 tiene una actividad bactericida en el caso de *E. coli* O157:H7 (CMB 70 μM /CMI₉₀ 20 μM =3.5) y bacteriostático en el caso de SARM (CMB 70 μM /CMI₉₀ 6.5 μM =10.7).

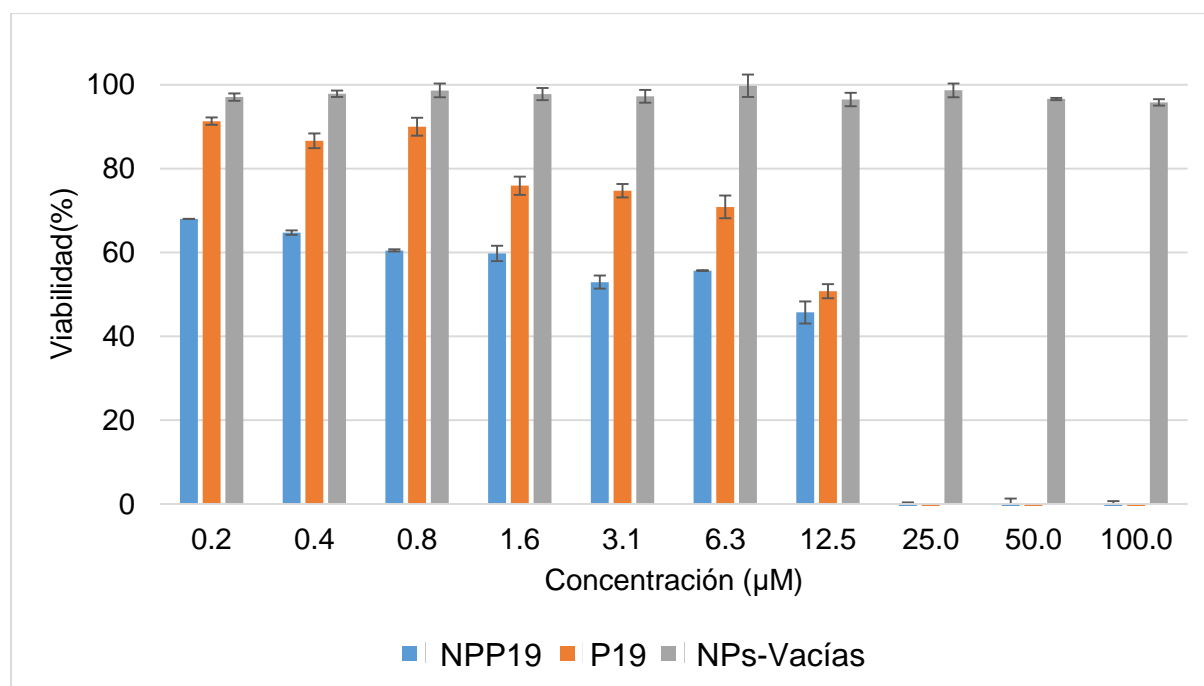


Figura 19 Porcentaje de viabilidad de *E. coli* expuesta a diferentes concentraciones del péptido P19 libre y Nanoencapsulado (NPP19) durante 8h a 37°C con agitación de 200 rpm.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

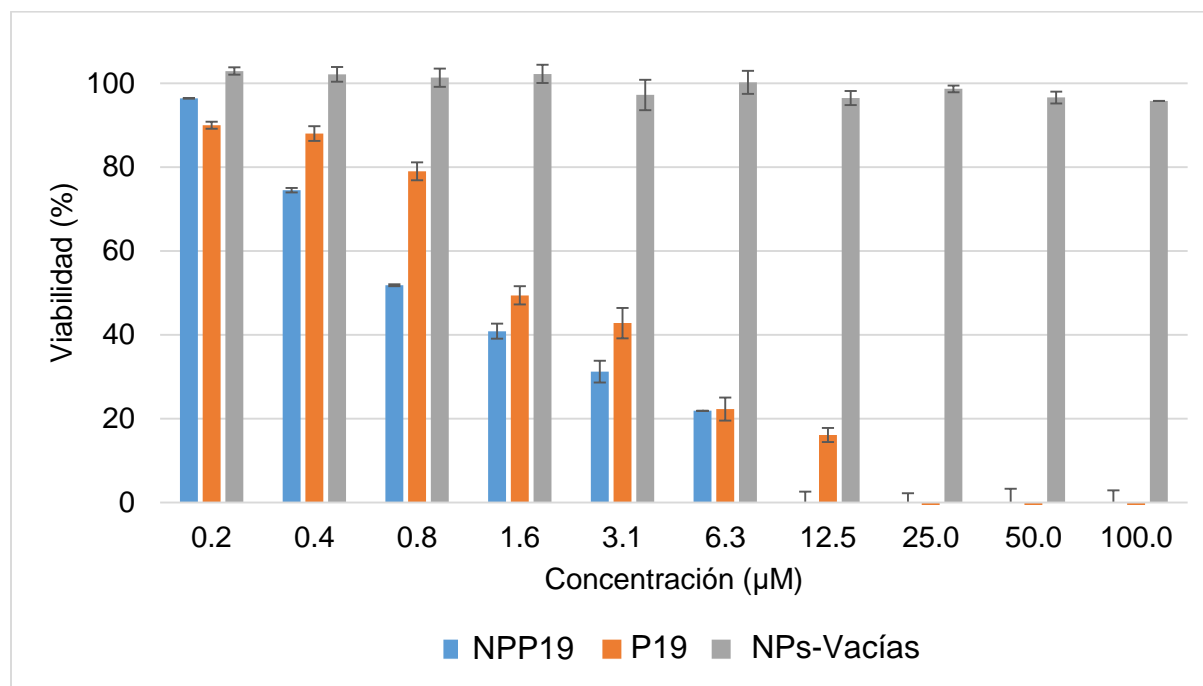


Figura 20 Porcentaje de viabilidad de SARM expuesta a diferentes concentraciones del péptido P19 libre y Nanoencapsulado(NPP19)-durante 8h a 37°C con agitación de 200 rpm.

Tabla 6 Resumen valores CMI₅₀, CMI₉₀ y CMB para *E. coli* y SARM expuestas al péptido P19 libre y nanoencapsulado.

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO	CMI ₅₀ (μM)	CMI ₉₀ (μM)	CMB (μM)
<i>E. coli</i> O157:H7	NP	>100	>100	>100
	P19	12.5	20	70
	NPP19	3.13	20	100
SARM	NP	>100	>100	>100
	P19	1.5	6.5	70
	NPP19	0.7	20	100

La CMI₅₀ del péptido P19 en *E. coli* O157:H7 y SARM es comparable a la de los péptidos naturales más potentes como la LL-37, la plectasina o la nisina (Sun *et al.* 2009; Sakoulas *et al.* 2014; Water *et al.* 2015). La encapsulación de los péptidos condujo a la obtención de mejores resultados, de forma similar a los obtenidos por otros autores que han utilizado la encapsulación de péptidos y de otros fármacos antibióticos (Water *et al.* 2015; Cruz *et al.* 2017; Gómez-Sequeda *et al.* 2017). Esto puede deberse a la interacción

electrostática entre las nanopartículas catiónicas y las membranas aniónicas de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Panyam *et al.* 2004; Xie *et al.* 2014). Esta interacción aumenta la concentración local de péptidos en la superficie bacteriana, dando como resultado un aumento de la actividad antimicrobiana (Radovic-Moreno *et al.* 2012; Haney *et al.* 2012).

5.6. Obtención de cepas resistentes al péptido P19

Fue posible inducir resistencia al PAM P19 en las cepas de *E. coli* O157:H7 y SARM estudiadas, por medio de la exposición a concentraciones sub-inhedoras del mismo. El desarrollo de resistencia al péptido fue logrado al cabo de 50 pases en ambas bacterias. Cabe resaltar que debido a la actividad inespecífica y a las múltiples dianas celulares de los PAMs, fue necesario una mayor cantidad de pases para lograr la resistencia en comparación con los antibióticos convencionales, en los que se ha observado la generación de cepas resistentes con solo 4 a 6 pases (Gullberg *et al.* 2011). Estos resultados son similares a los obtenidos por Shireen *et al.* 2013, en el cual se evalúa la generación de resistencia en *S. aureus* frente a los PAMs naturales Gramicidina y Magainina 2 (Shireen *et al.* 2013). La resistencia a los PAMs se puede deber principalmente a que estos patógenos exhiben diferentes mecanismos de resistencia como: la degradación proteolítica, el blindaje de la superficie bacteriana, la modificación de la membrana bacteriana externa, bombeo de PAMs al exterior de la célula, entre otros (Gruenheid y Moual 2012; Nuri *et al.* 2015).

En *E. coli* O157:H7 la CMI₅₀ aumentó cuatro veces, pasando de 12.5 a 50 µM y la CMI₉₀ aumentó 10 veces, pasando de 20 a 200 µM (Figura 21). Mientras que en SARM la CMI₅₀ aumentó 33 veces pasando de 1.5 a 50 µM, y la CMI₉₀ aumentó 18 veces pasando de 6.6 a 120 µM (Figura 22). Estos resultados son congruentes con estudios previos, los cuales indican que la resistencia bacteriana frente a los PAMs catiónicos puede surgir a través de una selección larga y continua en el laboratorio (Perron *et al.*

2006). El péptido P19 se puede considerar un antibacteriano promisorio cuando se compara con los resultados obtenidos por otros autores al inducir resistencia en estas bacterias frente al ciprofloxacina, un fármaco antibacteriano de amplio espectro muy utilizado en el mercado Tabla 7.

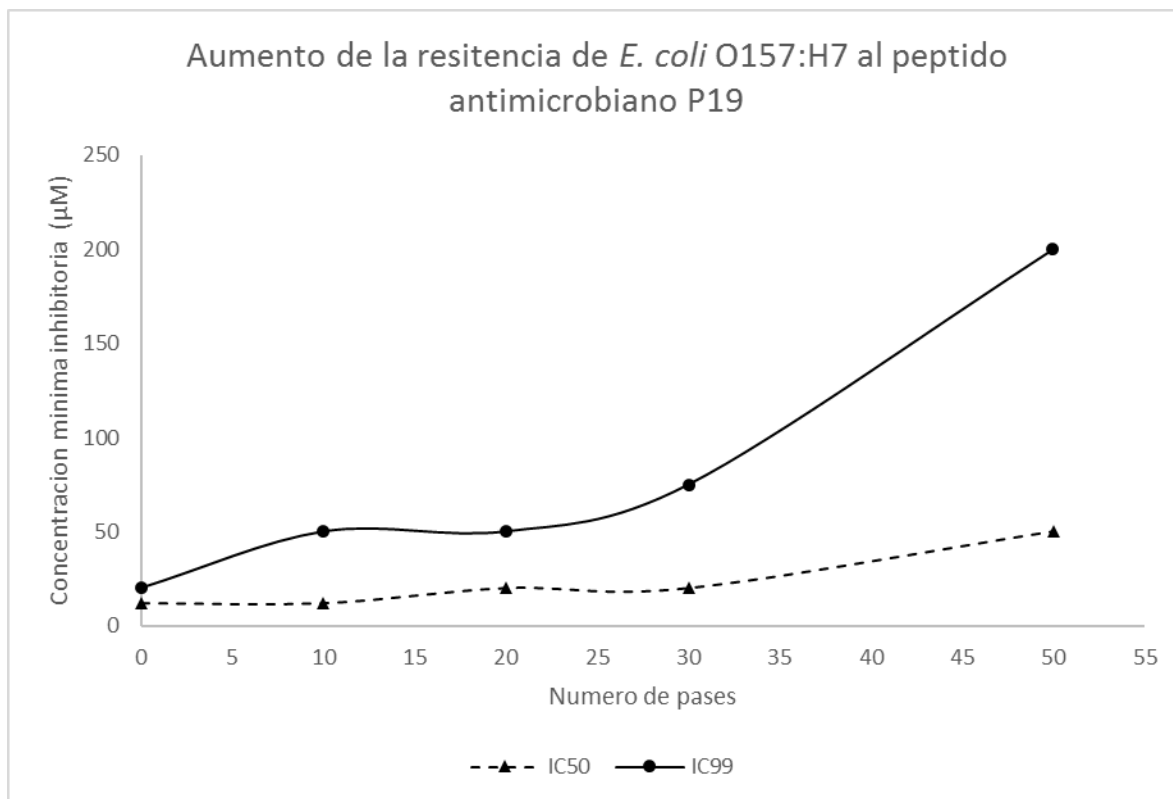


Figura 21 Cinética del aumento de la resistencia de *E. coli* a la exposición continua a concentraciones sub-inhedorias del péptido P19 por 50 generaciones.

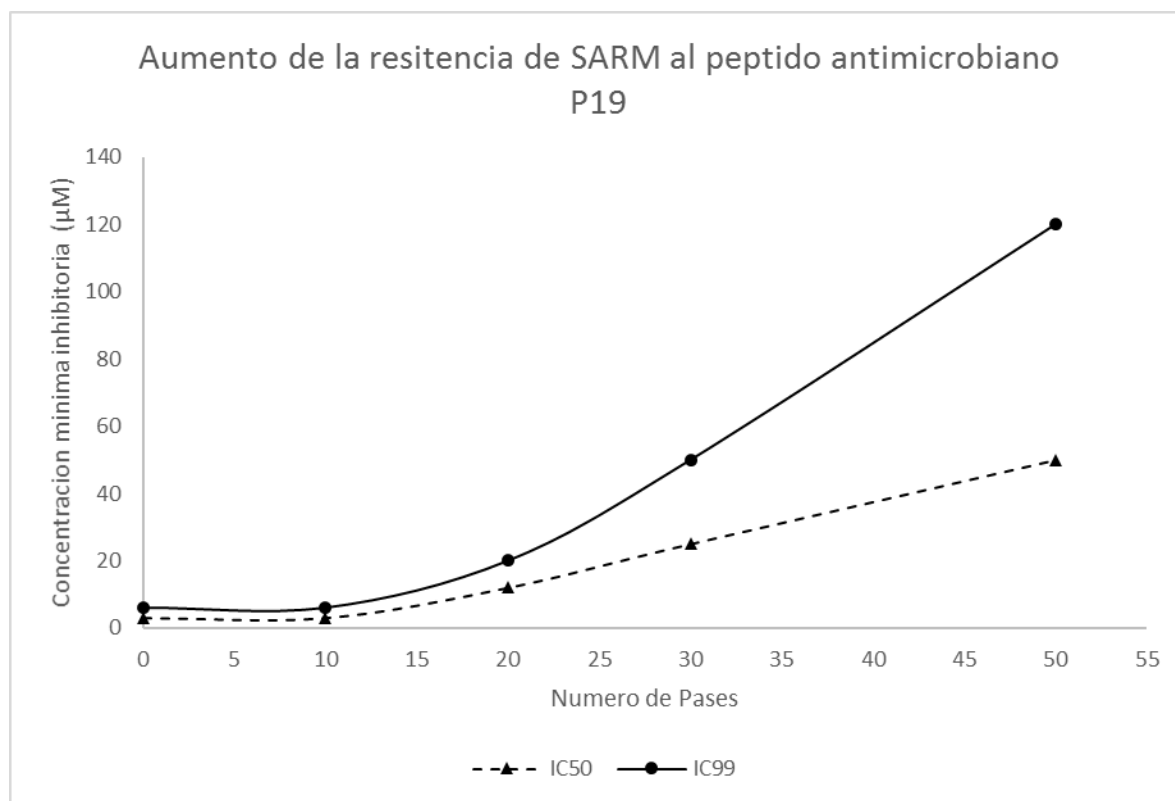


Figura 22 Cinética del aumento de la resistencia de SARM a la exposición continua a concentraciones sub-inhedorias del péptido P19 por 50 generaciones.

Tabla 7 Resultados de generación de resistencia del PAM P19 en comparación con el fármaco Ciprofloxacina. Los resultados de la ciprofloxacina fueron extraídos de Charrier et al. 2016.

Microorganismo	Fármaco	MIC ₅₀ Inicial (µM)	MIC ₅₀ Final (µM)	Pases	Aumento MIC ₅₀ veces
SARM	P19	1.5	50	50	33
	Ciprofloxacina	4	130	20	35
<i>E. coli</i>	P19	12.5	50	50	4
	Ciprofloxacina	0.078	25	25	327

5.7. Determinación de cambios en el perfil proteómico de *E. coli* O157:H7 y SARM sensibles y resistentes al péptido P19

Los geles obtenidos por electroforesis bidimensional fueron analizados usando el software PDQuest™ V8. Se logró observar en *E. coli* O157:H7 que la mayoría de proteínas se ubicaron en la región básica del gel, mientras que en SARM la mayoría de proteínas se concentraron en la región ácida del gel (Anexo 8 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 1 el cual compara en *E. coli* O157:H7 el grupo Control vs

el grupo resistente al péptido como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

), esto puede deberse a la composición aminoácídica de las proteínas analizadas. Todos los análisis presentaron un coeficiente de correlación mayor a 0.6 indicando un buen valor en este parámetro de análisis (Anexo 5) (Challapalli *et al.* 2004). Posteriormente los spots de interés fueron cortados del gel y analizados por MaldiToF a modo de ejemplo se puede observar uno de los espectros obtenidos (Anexo 6), denominado huella peptídica, las cuales son cargadas en el software Mascot el cual hace una búsqueda a partir de la huella peptídica y arroja un informe el cual indica los puntajes significativos a modo de ejemplo se incluye uno de los informes obtenidos (Anexo 7).

Los resultados obtenidos en el Mascot se clasificaron las proteínas según su función, en ambas bacterias se logró evidenciar una respuesta diferente frente a los tratamientos estudiados (Figura 23), en el caso de *E. coli* O157:H7 se observaron alteraciones en el perfil proteico muy variadas en cada uno de los experimentos. En el experimento 1 la mayoría de proteínas con expresión diferencial estuvieron relacionadas con procesos metabólicos, en el experimento 2 con procesos de transporte y en el experimento 3 con procesos celulares. Por otra parte, la respuesta de SARM a los diferentes tratamientos fue muy similar entre ellos, siendo en mayor medida los procesos metabólicos seguidos de los procesos celulares los que evidenciaron más cambios en su expresión. A continuación, se analizarán y discutirán cada uno de los experimentos individualmente.

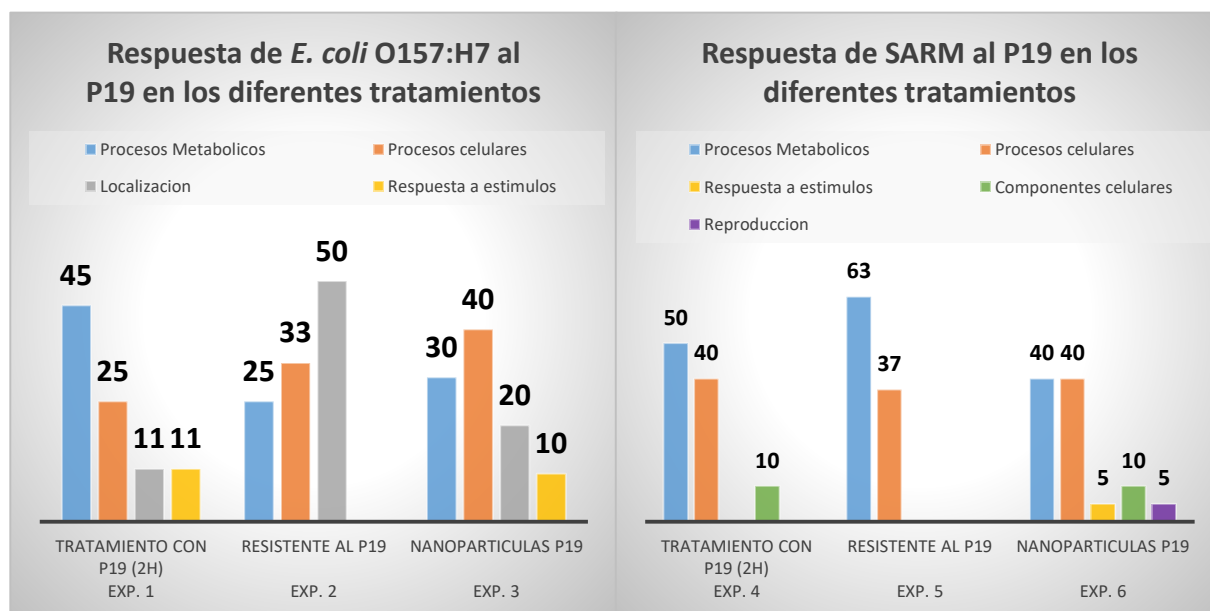


Figura 23 Porcentaje de proteínas que alteraron su expresión en los diferentes experimentos en *E. coli* O157:H7 y SARM.

5.7.1. Experimento 1: *E. coli* O157:H7 control en ausencia de P19 vs Tratado con P19.

5.7.1.1. Análisis e identificación por PDQuest™ y Mascot: Se obtuvieron un total de 6 geles: 3 del grupo control (Anexo 8 B, C y D) y 3 del grupo tratado con P19 (Anexo 8 E, F y G). Por medio del software PDQuest™ se logró identificar 475, 410 y 409 spots en las réplicas del grupo control y 250, 184 y 180 spots en las réplicas del grupo tratado. Asimismo, los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,6 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando de esta manera la reproducibilidad entre grupos (Challapalli et al. 2004).

De las proteínas detectadas, 51 tuvieron expresión diferencial ($p < 0.05$, 2x aumento o inhibición,) 48 proteínas fueron inhibidas y 3 fueron sobreexpresadas en el grupo tratado (Figura 24). Los spots con expresión diferencial fueron escindidos y tripsinizados para determinar su huella peptídica por espectrometría de masas. Se identificaron en total 17 proteínas mediante esta metodología y se listan en la Tabla 8. Por otra parte su sobreexpresión o inhibición puede observarse por medio del mapa de calor (Anexo 9) mediante intensidades de colores, en este caso, las proteínas inhibidas en diferentes

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 8 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 1, Identificadas a partir de su huella peptídica obtenida mediante "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

SS P	Proteína	N. acceso 1	Gen	Función Molecular	Proceso Biológico	P.M. 2 (Da)	P.I. 3	C. E. ⁴	P- Val or	Scor e ⁵
30 1	Reguladora transcripcional tipo DctR	Q8FC K2	dctR	- Unión al ADN.	- Regulación de la transcripción. - Transcripción de plantilla de ADN.	2063 6	8.9 5	- 0,99	1,08 E-02	103
60 6	Proteína de regulación del nitrógeno NR(I)	P0AF B9	glnG	- Unión al ATP. - Actividad reguladora de la respuesta a la fosforilación. - Unión al ADN secuencia específico. - Unión al factor de transcripción.	- Fijación de nitrógeno - Regulación de la utilización de nitrógeno. - Regulación de la transcripción de ADN templado. - Transcripción del ADN templado.	5233 6	6.0 4	- 0,98	4,02 E-02	82
12 04	Subunidad 2 alfa de la ribonucleósido-difosfato reductasa	P3945 2	nrdE	- Actividad catalítica. - Regulación enzimática. - Replicación de ADN.	- Cataliza la biosíntesis de desoxirribonucleótidos. - Replicación de ADN - Interconversión de moléculas pequeña con contenido de nucleobases.	8082 7	6.0 9	- 0,98	3,55 E-02	83
26 12	UDP-N-acetilglucosamina - N-acetilmuramil (pentapéptido) pirofosforilundecaprenol N-acetilglucosamina transferasa	A7ZH II	murG	- UDP-N-acetil-D-glucosamina: actividad de N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamil-meso-2,6-diaminopimelil-D-alanil-D-alanina-diphosphoundecarenil 4-beta-N-acetilglucosamintransferasa.	- Proceso metabólico de carbohidratos, ciclo celular, división celular, organización de la pared celular	3782 0	9.7 4	- 0,99	2,34 E-01	94
35 02	Proteína PsiE	A7ZU Q1	psiE	- Componente integral de la membrana	- Respuesta celular a la ausencia de fosfato.	1570 1	8.5 9	- 0,94	2,53 E-01	69

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

54 03	Transposase InsI para el elemento de secuencia de inserción IS30A	P0CF 88	insII	- Inserción de ADN o unión de eliminación - Unión secuencio- específica - Actividad transposasa	- Integración- transposición de ADN	4441 1	10. 87	- 0,80	2,92 E-02	79
54 15	Proteína de lisogenización de alta frecuencia HflD	Q8X7 36	hflD	- Regulador negativo de la lisogenización del fago lambda - Contribuye a la degradación de la proteína reguladora del fago CII	- Regulador de lisogenización	2304 6	9.6 9	286, 33	1,22 E-01	66
62 06	Tetraacyldisacc haride 4'- quinasa	Q0TJ D8	lpxK	- Tetraacyldisacchari de 4'-quinasa con actividad de unión al ATP	- Proceso biosintético del lípidio A	3572 9	8.9 5	- 0,95	2,02 E-02	61
65 03	Fosfato acetiltransferas a	P0A9 M8	pta	- Fosfato acetiltransferasa de unión a iones de zinc	- Proceso biosintético del acetato - Proceso catabólico de acetato - Proceso metabólico del acetato - Proceso biosintético de acetil-CoA	7746 6	5.2 8	7,43	5,13 E-03	79
78 07	Biosíntesis putativa del ácido colanico glucosiltransfer asa WcaL	P7124 3	wcaL	- Actividad transferasa - Transferencia de grupos glucosilo	- Proceso biosintético de lipopolisacáridos - Proceso biosintético del polisacárido de la capa del limo	4550 4	9.1 3	- 0,75	5,54 E-02	69
80 11	Probable piruvato- flavodoxina oxidoreductasa	P5264 7	ydbK	- Enlace de iones de hierro - Actividad piruvato- flavodoxina oxidoreductasa - Enlace de pirofosfato de tiamina	- Cadena de transporte de electrones - Respuesta al estrés oxidativo	1298 27	5.5 2	- 0,99	1,60 E-01	82

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

81 02	Proteína de conjugación multifuncional TraI	P1456 5	traI	- Unión al ATP - Unión al ADN - Actividad helicasa de ADN - Actividad ADN topoisomerasa tipo I	- Conjugación - Proceso metabólico	1918 98	5.7 5	- 0,97	9,25 E-02	119
81 06	Biosíntesis proteína bifuncional MnmC tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridine	B1LL T0	mnmC	- Actividad metiltransferasa tRNA (5-metilaminometil-2-tiouridilato)	- Actividad oxidoreductasa, que actúa sobre el grupo de donantes CH-NH	7504 4	5.6 7	- 0,97	1,75 E-01	68
81 10	Aspartoquinasa / homoserina deshidrogenasa bifuncional 2	P0056 2	metL	- Actividad aspartato quinasa - Unión al ATP - Actividad de homoserina deshidrogenasa - Unión al NADP	- Proceso biosintético homoserina - Proceso biosintético de lisina vía diaminopimelato - Proceso biosintético de metionina - Proceso biosintético de treonina	8934 6	5.3 4	- 0,99	5,54 E-02	118
81 11	UPF0401 proteína ECP_3853	Q0TB 55	ECP_3 853	- Parte del operón ecpRABCDE - Codifica el pilus común de <i>E. coli</i> (ECP)	- Desarrollo de biofilm en etapa temprana - Reconocimiento de la célula huésped	8924	5.5 5	- 0,99	3,22 E-02	66
84 01	Proteína Chaperona FaeE	P2540 1	faeE	- Organización de la pared celular - Chaperón mediado por proteína plegable - Organización de pilus		2851 7	9.4 4	- 0,99	2,27 E-02	61
85 03	Transportador ABC proteína de unión periplásmica YphF	P7726 9	yphF	- Transporte		3526 4	6.0 5	- 0,99	5,76 E-05	62

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.1.2. **Análisis Bioinformático del experimento 1:** Se realizó un análisis ontológico de los genes identificados en la Tabla 8, por medio del software PANTHER. Se determinó que la mayoría de genes de *E. coli* O157:H7 expuestos al PAM están involucradas principalmente en procesos metabólicos (45%) como: la generación de precursores metabólicos y energía, compuestos nitrogenados, compuestos fosfatados y procesos metabólicos primarios. En menor medida se expresaron diferencialmente proteínas involucradas en procesos celulares (33%), localización (11%) y respuesta a estímulos (11%) (Figura 25).

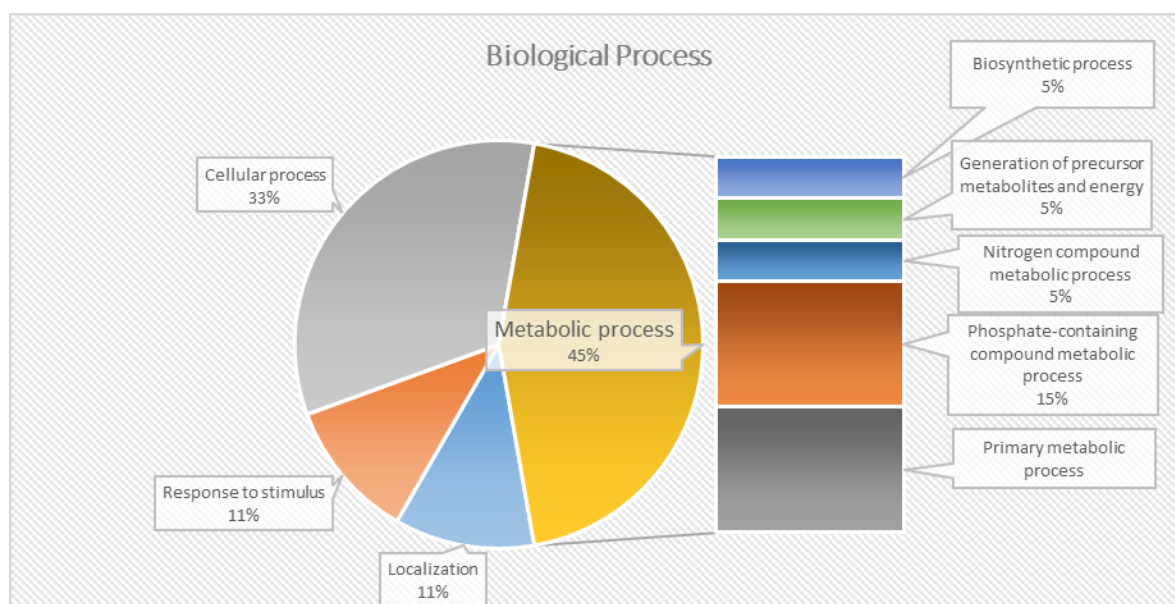


Figura 25 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

Utilizando la herramienta en línea STRING, se obtuvo un gráfico de 14 nodos interconectados (9 nodos identificados en la tabla 1 y 5 nodos de soporte para mejorar la resolución del gráfico; Figura 26).

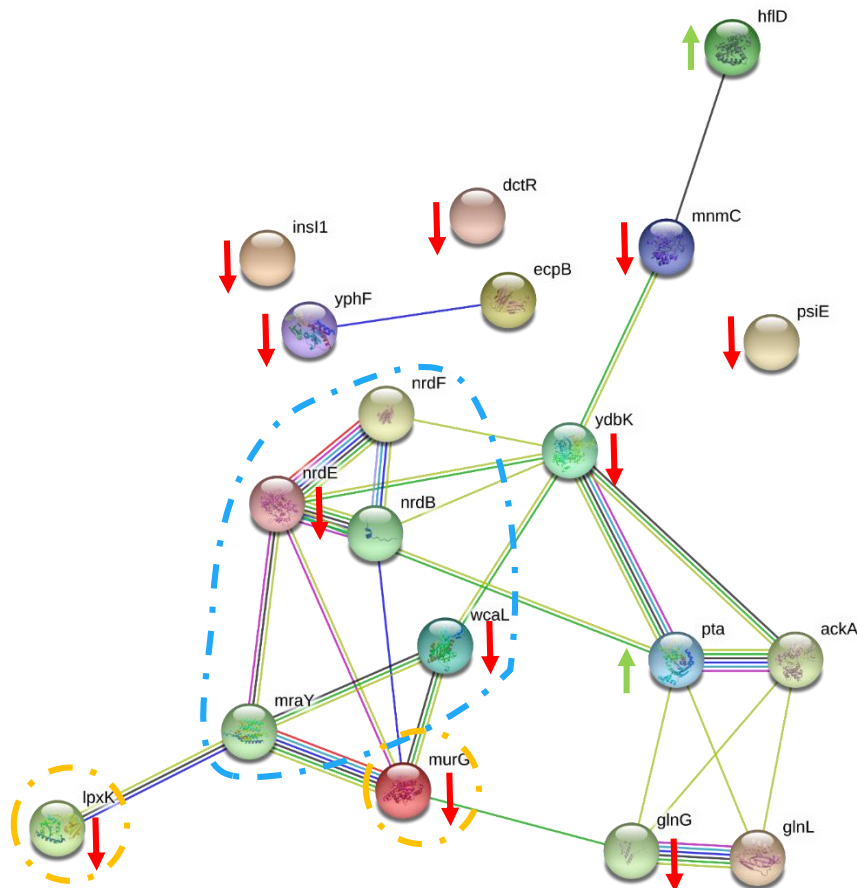


Figura 26 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19 (Tabla 8, Exp. 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. La línea punteada azul muestra las proteínas involucrada en la traducción y replicación. Los círculos en color amarillo punteado muestran las proteínas involucradas en los procesos de síntesis de componentes de pared celular.

5.7.1.3. Discusión Experimento 1: Como resultado de la exposición de *E. coli* O157:H7 al P19 (Tabla 8, Exp. 1), se observó que el péptido indujo la inhibición de una gran cantidad de proteínas (Figura 24 y Anexo 9); entre ellas proteínas intracelulares, indispensables para el crecimiento y la replicación en *E. coli*, como: (i) la Ribonucleosidodifosfato reductasa subunidad 2 alfa “nrdE” la cual provee los precursores necesarios para la síntesis de ADN, y cataliza la biosíntesis de deoxiribonucleótidos de los correspondientes nucleótidos (Martín et al. 2011); (ii) UDP-N-acetilglucosamina--N-acetilmuramil-(pentapéptido) pirofosforil-undecaprenol N-acetilglucosamina transferasa “murG”

encargada de catalizar el paso final del ensamblaje de la subunidad de peptidoglicano de la pared celular (Bupp y van Heijenoort 1993), (iii) El Tetraacildisacarido 4'-kinasa "lpxK" encargada de transferir el γ -fosfato del ATP a la posición 4' del tetraacilldisacárido 1-fosfato (denominado DS-1-P) para formar tetraacilldisacárido 1,4'-bis-fosfato (lípidos IV_A), el cual es necesario para el crecimiento en *E. coli* (Garrett et al. 1997; Garrett et al. 1998; Raetz et al. 2007)

Por otra parte, se observó la sobreexpresión de dos proteínas: la fosfato acetiltransferasa "pta" y la proteína de lisogenización de alta frecuencia "HflD", las cuales pueden constituir un mecanismo de respuesta inmediata para contrarrestar los efectos del péptido. La pta está implicada en el metabolismo del acetato, cataliza la interconversión reversible de acetil-CoA y fosfato de acetilo (Shi y Kuzminov 2005), además es uno de los supresores más fuertes y más universales de la replicación de *E. coli*; puede suprimir defectos en diversas etapas del proceso de replicación, desde la iniciación (dnaA), pasando por la función helicasa (dnaB), la síntesis de iniciadores de RNA (dnaG) hasta el avance de la DNA polimerasa (dnaN) (Maciąg-Dorszyńska et al. 2012). Por otra parte, la HflD representa un interruptor entre la lisis y la lisogénea de lambda en *E. coli*, inhibiendo la degradación mediada de λ CII *in vitro* (Kihara et al. 2001). Pasando a fase lisogénica, evitando así la lisis celular, este puede ser un efecto protector celular (Parua et al. 2010).

Sin embargo, cabe resaltar que en este trabajo no se lograron identificar proteínas de la membrana externa de *E. coli*, como: tolC, OmpA, OmpF, OmpC y OmpT. Las cuales son proteínas asociadas a bombas de eflujo y porinas que están relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos, como el cloruro de benzalconio, ácido nalidíxico y la piperacilina/tazobactam (Bore et al. 2007; Lin et al. 2008; Valéria dos Santos et al. 2010). Por otra parte, se logró identificar la proteína murG, identificada en estudios previos, al exponer a bacterias Gram positivas a la acción de péptidos catiónicos (Wenzel et al. 2014).

5.7.2. Experimento 2: *E. coli* O157:H7 sensible vs resistente al P19.

5.7.2.1. Análisis por PDQuest™ e identificación por Mascot En el experimento se comparó entre la *E. coli* O157:H7 sensible y la resistente al péptido P19, se obtuvieron 6 geles: 3 del grupo sensible al P19 (Anexo 10 B,C y D) y 3 del grupo resistente al P19 (Anexo 10 E, F y G). Utilizando el software PDQuest™ se lograron identificar 280, 252 y 239 spots en las réplicas del grupo control y 110, 109 y 115 spots en las réplicas del grupo resistente. Asimismo, los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0.6 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando de esta manera la reproducibilidad entre grupos.

Se encontraron 42 proteínas con expresión diferencial ($p < 0.05$, 2x aumento o inhibición,) de las cuales 37 proteínas fueron inhibidas y 5 fueron sobreexpresadas en el grupo resistente al péptido (Figura 27), estos spots con expresión diferencial fueron escindidos y tripsinizados para determinar su huella peptídica por espectrometría de masas. Las huellas peptídicas que fueron exitosamente identificadas se listan en la Tabla 9. A continuación el mapa de calor muestra claramente la expresión diferencial de estas proteínas mediante intensidades de colores que varían de azul a rojo, las proteínas inhibidas se muestran en tonalidades de azul, y las proteínas sobreexpresadas se muestran en tonalidades de rojo (Anexo 11). Las proteínas involucradas en diversos procesos celulares fueron inhibidas como la proteína catalítica N-acetilmuramil-L-alanina amidasa "AmiB" (SPP 4414) y la enzima de restricción EcoKI "hsdS" (SPP 3809) mientras que proteínas relacionadas en el transporte de solutos como la proteína de unión a soluto importadora de Glutamato/aspartato "gltI" (SP7202) y la proteína periplasmática de unión al molibdato "modA" (SPP 3003) fueron sobreexpresadas.

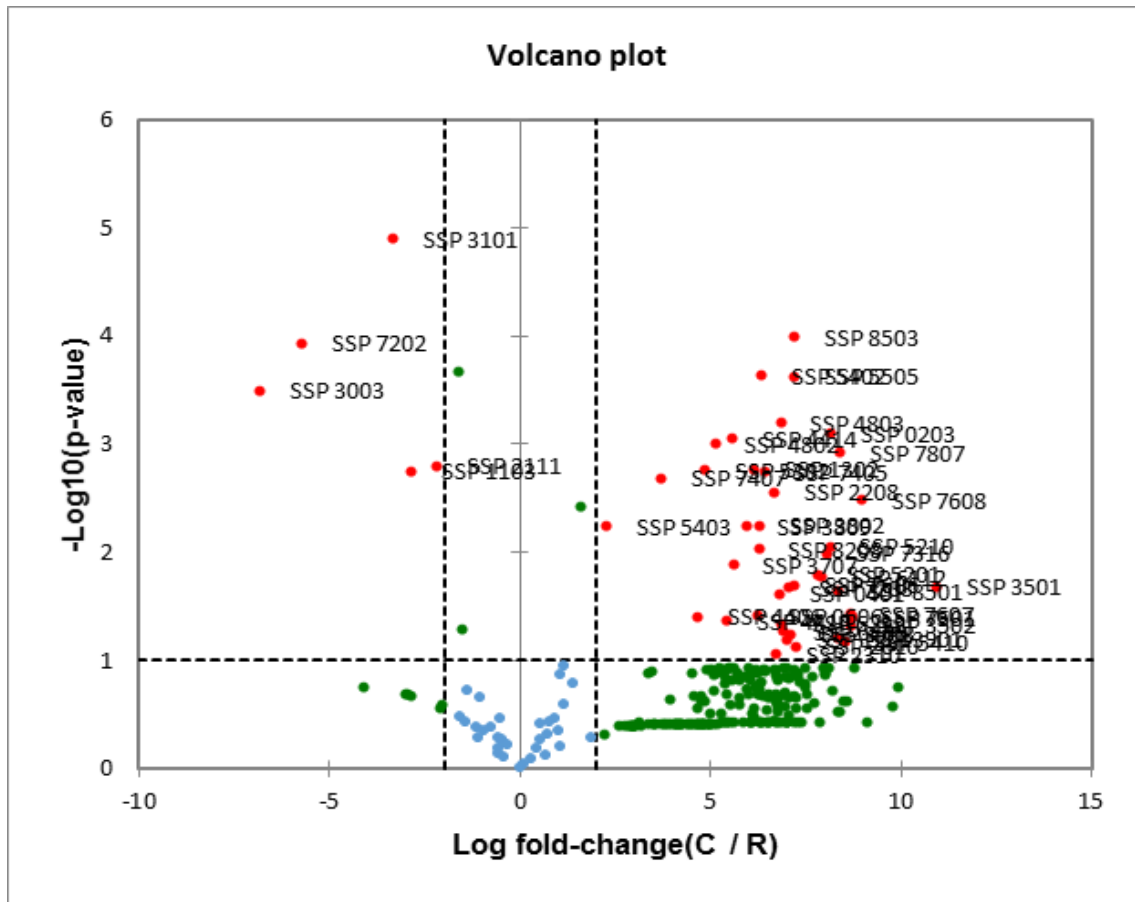


Figura 27 **Volcano plot** de los spots del Experimento 2: *E. coli* O157:H7 Control vs Resistente al P19. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 9 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 2, Identificadas a partir de su huella peptídica por "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

SS P	Proteína	N. acceso ₁	Gen	Función Molecular	Proceso Biológico	P.M. ² (Da)	P.I. ³	C. E. ⁴	P-Valor	Score ⁵
203	La proteína de utilización de ADN HofQ	P34749	hofQ	- Proteína de unión al ADN - Actividad transportadora de proteínas	- Utilización de carbono - Proceso catabólico de ADN - Secreción de proteínas - Transporte	44689	5.98	-0,996	8,E-04	86
2111	Glicina - ARNt ligasa subunidad beta de	A7ZTA5	Glys	- Actividad Arginina- tRNA Ligasa - Actividad Glicina- tRNA Ligasa - Unión al ATP	- Aminoacilación de Arginil-tRNA - Aminoacilación de Glicil-tRNA	76906	5.29	3,567	2,E-03	70
3003	Proteína periplásmica de unión a molibdato	P37329	modA	- Unión de Iones de Molibdeno - Unión al tungstato	- Transporte de iones de molibdato	27347	7.82	111,284	3,E-04	86
3707	3-oxoacil-[acil-proteína-transportadora] sintasa 3	A7ZKJ4	fabH	- Cataliza la reacción de condensación de la síntesis de ácidos grasos	- Actividad catalítica biosíntesis de ácidos grasos	33779	5.08	-0,979	1,E-02	75
3809	Enzima de restricción tipo 1 Proteína de especificidad EcoKI	P05719	hsdS	- Unión al ADN	- Sistema de restricción / modificación de ADN	51649	9.60	-0,984	6,E-03	98

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

400 2	Fe(2+) Transport Protein A	P0AE L5	Feoa	- Unión de Iones de Metal de Transición	- Transporte de iones - Homeostasi s de iones de hierro	842 3	9.4 3	2,045	2,E- 04	78
441 4	N- acetilmura moil-L- alanina amidasa AmiB	P2636 5	ami B	- Actividad amidasa N- acetilmuramoil-L-alanina	- Organizació n de la pared celular - Citocinesis dependiente de FtsZ - Catabolism o de peptidogluc ano	480 13	9.3 1	- 0,979	9,E- 04	80
480 2	Proteína de biosíntesis de purina bifuncional PurH	Q8FB 68	pur H	- Actividad ciclohidrolasa IMP - Actividad formiltransferasa fosforribosilaminoimidazolcar boxamida	- Proceso biosintético de novo ' IMP	576 56	5.6 6	- 0,971	1,E- 03	95
540 3	Proteína de usher de membrana externa FasD	P4600 0	fasD	- actividad transportadora	- Biogénesis Fimbrium - Transporte	924 11	7.0 2	- 0,793	6,E- 03	65
720 2	Proteína importadora de unión al soluto glutamato / aspartato	P3790 2	gltI	- Unión a aspartato - Unión a glutamato	- Transporte de L- aspartato - Transporte de L- glutamato	335 13	8.6 1	52,49 7	1,E- 04	126
731 6	Protein YecM	P5200 7	yec M			213 63	5.3 3	- 0,996	1,E- 02	89

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

740 7	Componente del sistema de captación de hierro EfeO	Q8FJ35	efeO - Captación de Fe ²⁺	- Fijación de hierro - Componente de transferencia de electrones	41251	5.03	-0,923	2,E-03	70
780 7	Homólogo transcripcional represor RcnR	A7ZNS4	rcnR - Unión al ADN	- Regulación de la transcripción - Plantilla de ADN	10185	8.79	-0,997	1,E-03	58

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.2.2. Análisis Bioinformático: Se realizó un análisis ontológico de los genes identificados en la Tabla 9 por medio del software PANTHER, se determinó que la mayoría están involucradas principalmente en procesos de localización (50%) seguido de procesos metabólicos (25%) y procesos celulares (25%), dentro de estos últimos destacan proteínas involucradas en el ciclo celular (13%) y la citocinesis (13%).

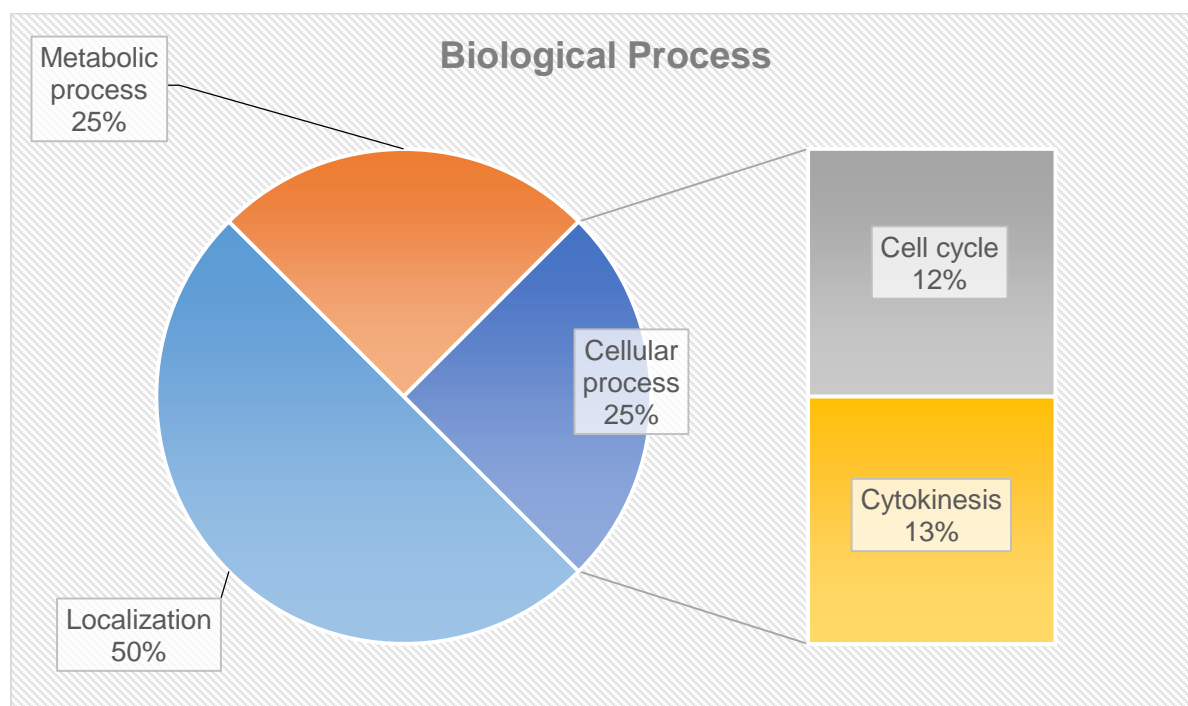


Figura 28 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por *E. coli* O157:H7 resistente al péptido P19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

Por medio de la herramienta STRING, se pudo inferir la posible asociación funcional entre el conjunto de proteínas identificadas (Figura 26), el grafico consta de 11 nodos interconectadas de los cuales 7 fueron identificadas en este trabajo y 5 más son utilizadas como referencia para mejorar la resolución del gráfico. 6 proteínas más que fueron identificadas no lograron relacionarse en el gráfico y aparecen como nodos sueltos.

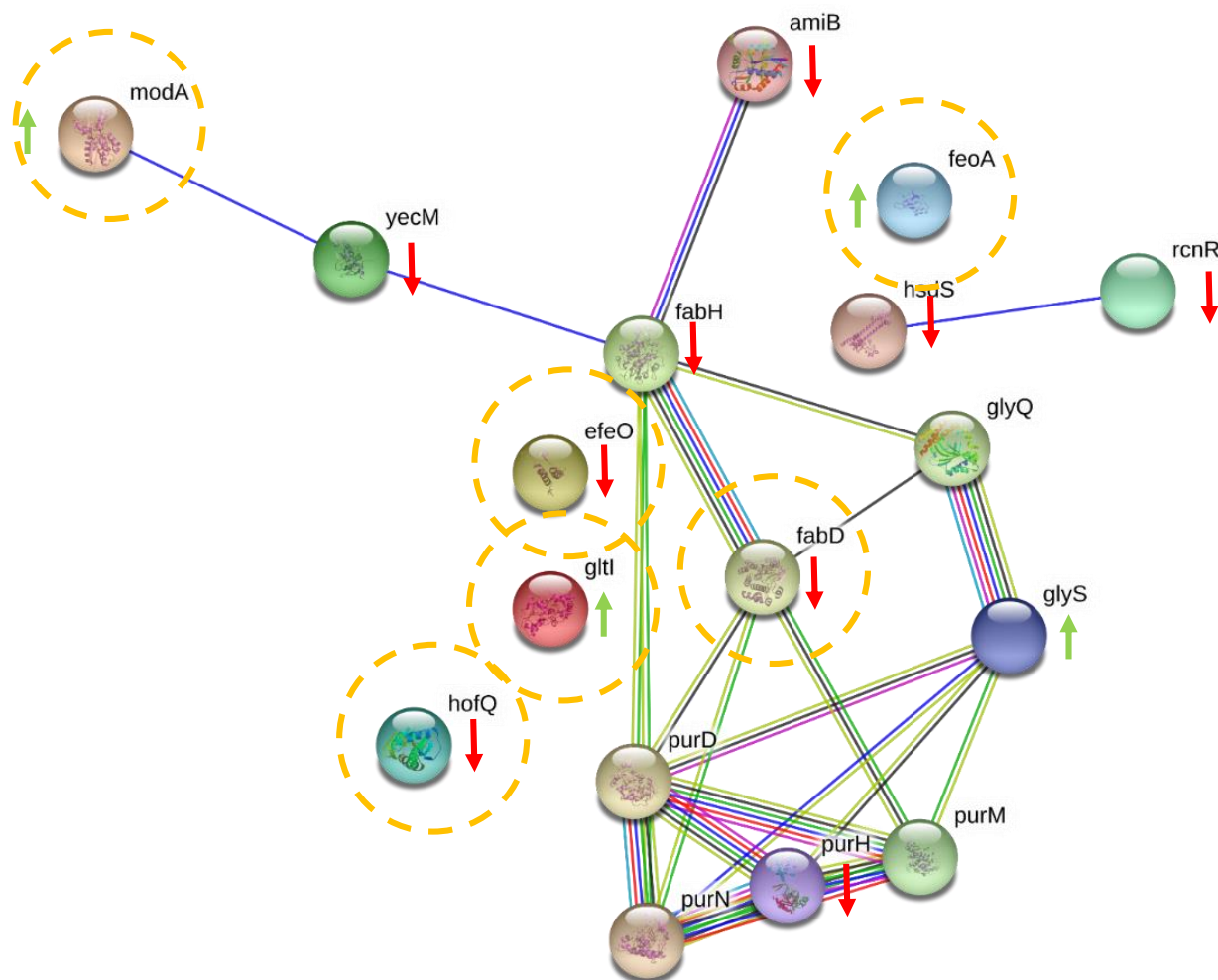


Figura 29 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente *E. coli* O157:H7 resistente al péptido P19 (Experimento 2) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Los círculos con líneas punteadas amarillas son proteínas de transporte.

5.7.2.1. Discusión Experimento 2: Se investigaron los cambios metabólicos generados en *E. coli*, tras su exposición prolongada a concentraciones subinhibitorias del péptido P19, cabe resaltar que fueron necesarias alrededor de 50 pases sucesivos aumentando la concentración del péptido a cada pase para lograr obtener bacterias resistentes y determinar cuáles proteínas pueden estar involucradas en sus posibles mecanismos de resistencia. Se pudo observar que la mayoría de proteínas fueron inhibidas en la cepa

resistente, sin embargo 4 proteínas mostraron un aumento de su expresión entre ellas: La proteína de unión al molibdato periplasmática “modA”, La proteína de transporte de Fe (2+) “FeoA”, la proteína de unión a ATP importadora de glutamato/aspartato “gltL” y la subunidad beta de la glicina t-RNA ligasa.

Es posible que se presente un desbalance en la captación de nutrientes necesarios para el funcionamiento de la maquinaria metabólica de *E. coli*, razón por la cual se observa una sobreexpresión de proteínas captadores de oligoelementos como la modA y la feoA. La proteína modA se une al molibdato con alta especificidad y afinidad, está involucrada en el transporte de molibdeno al interior de la célula (Rech *et al.* 1996), El molibdeno es un oligoelemento esencial para la mayoría de los organismos vivos. Las enzimas que contienen molibdeno son de naturaleza omnipresente y juegan papeles importantes en los ciclos globales de nitrógeno, carbono y azufre. (Aguilar-Barajas *et al.* 2011) Por otra parte la proteína transportadora de Fe (2+), feoA, participa en la captación de iones Fe²⁺ (Kammler *et al.* 1993). El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos. Su importancia se debe a su papel como cofactor de proteínas en procesos como la síntesis de precursores de ADN, la respiración y el transporte de oxígeno o como un portador de electrones (Lau *et al.* 2013; Grass 2006)

Otra ruta metabólica que posiblemente se ve afectada por la acción del péptido es la síntesis de proteínas, afectando tanto al ARN de transferencia como la síntesis de aminoácidos, observándose la sobreexpresión de la proteína glyS encargada de acoplar la glicina al t-RNA (Ibba y Söll 2000), además de un aumento de la expresión gltL el cual es parte del complejo transportador ABC GltI implicado en la captación de glutamato y aspartato. Probablemente responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte que desempeña un papel en la transducción de la energía de unión e hidrólisis de ATP a una amplia variedad de procesos fisiológicos en todos los estudios de especies (Linton y Higgins 1998).

5.7.3. Experimento 3: Nanopartículas vacías (NP) Control vs Nanopartículas cargadas con el péptido P19 (NPP19) sobre *E. coli* O157:H7.

5.7.3.1. Análisis por PDQuest™ e identificación por Mascot: Se obtuvieron un total de 6 geles 3 del grupo NP control (Anexo 12 B,C y D) y 3 del grupo NPP19 (Anexo 12 E, F y G) el software PDQuest™ permitió detectar 600, 625 y 778 spots en las réplicas del grupo NP control y 609, 728 y 691 spots en las réplicas del grupo NPP19. En este experimento, los coeficientes de correlación obtenidos estuvieron cercanos a 0,7 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando un alto grado de reproducibilidad entre grupos.

Del total de proteínas detectadas 58 tuvieron expresión diferencial ($p < 0.05$, 2x aumento o inhibición,) de las cuales 48 fueron sobreexpresadas y 3 fueron inhibidas en el grupo tratado con NPP19 (Figura 30). Los spots con expresión diferencial fueron escindidos y tripsinizados para determinar su huella peptídica por espectrometría de masas. Las huellas peptídicas que fueron exitosamente identificadas se listan en la Tabla 10, en el mapa de calor se observa que la mayoría de las proteínas en el grupo control fueron inhibidas, este es un efecto contrario a lo observado en el experimento 1 y 2 (Anexo 13), demostrando que el PLGA afecta el perfil proteómico bacteriano, por otra parte, solo dos proteínas fueron sobreexpresadas la proteína activadora transcripcional de unión al ADN “EvgA” (SPP5107) y la proteína glucosiltransferasa “YaiP” (SPP 1015).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 10 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 3, Identificadas a partir de su huella peptídica por "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

SS P	Proteína	N. acceso ¹	Gen	Función Molecular	Proceso Biológico	P.M. ² (Da)	P.I. ³	C. E. ⁴	P-Valor	Score ⁵
1015	Glucosiltransferasa no caracterizada YaiP	Q47536	yaiP	- Actividad ligasa - Actividad transferasa - Transferencia de grupos glucosilo	- Respuesta celular al estímulo de daño del ADN	45363	9,22	-0,54	4,45 E-02	117
1206	Autoinductor 2 importador de unión a ATP Proteína LsrA	B1XEAI	lsrA	- Actividad de ATPasa - Acoplado al movimiento transmembrana de sustancias - ATP vinculante		56072	6,82	8,17	2,37 E-02	78
1303	Aminoacrilato perácido putativo reductasa RutC	C8U5H2	rutC	- Actividad oxidorreductasa		13868	5,47	4,39	2,03 E-02	58
1405	Proteína no caracterizada YghW	P64576	yghW	Respuesta a butanol		11052	9,26	8,98	4,26 E-02	76
2809	Proteína de biosíntesis de triptófano TrpCF	P00909	trpC	- Actividad indol-3-glicerol-fosfato sintasa - Actividad de fosforribosilantranilasa isomerasa	Proceso biosintético de triptófano	49861	5,51	48,58	1,65 E-02	60

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

510 7	Activador transcripcional de unión al ADN EvgA	P0ACZ6	evgA	Unión al ADN	- Sistema de transducción de señal de fosforilación - Regulación de la transcripción, - Transcripción de la plantilla de ADN - Plantilla de ADN	22847	6,84	-0,53	3,27 E-02	101
640 1	Proteína determinante de forma de barra MreB	P0A9X5	mreB	- Morfogénesis celular - Regulación de la forma de la célula		37100	5,19	430,4 1	1,44 E-03	95
640 4	Homólogo anaeróbico de la reductasa de óxido nítrico flavorubredoxin	Q8X852	norV	- Enlace de iones de hierro - Actividad de óxido nítrico reductasa		47280	4,65	408,5 3	3,42 E-02	62
660 2	Sistema de transporte de taurina Proteína permeasa TauC	Q47539	tauC	- Actividad del transportador de alcanosulfonato	- Transporte de alcanosulfonato - Respuesta celular a la escasez de azufre	29793	10,6 1	4,55	4,78 E-02	69
810 1	Proteína Putative RhsE	P24211	rhsE	Autoproteólisis		77493	5,81	5,95	8,66 E-03	91

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

830 4	Proteína asociada a la ARN polimerasa RapA	A7ZHF0	rapA	- Actividad helicasa - Unión al ATP - Unión al ADN	- Regulación de la transcripción - Transcripción de la plantilla de ADN - Plantilla de ADN	110057	5,04	15,78	1,45 E-02	86
830 6	Proteína TraC	P18004	traC	Conjugación		99585	5,72	4,12	4,64 E-02	82
960 1	Endo-tipo ligado a la membrana lítica mureína Transglicosilasa A	B7MK90	emtA	- Actividad de liasa carbono-oxígeno - Actividad sobre polisacáridos - Actividad lítica endotransglicosilasa	- Proceso catabólico de la macromolécula de la pared celular - Organización de la pared celular - Proceso metabólico de peptidoglucano	22255	9,16	40,10	1,38 E-02	83

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.3.2. Análisis Bioinformático Se realizó un análisis ontológico de los genes identificados en la Tabla 10 por medio del software PANTHER, se determinó que la mayoría están involucradas principalmente en procesos celulares (40%) y en menor medida en procesos metabólicos (30%), procesos de localización (20%), respuesta a estímulos (10%). Los procesos metabólicos fueron clasificados en 4 subcategorías: los procesos biosintéticos, procesos metabólicos de compuestos nitrogenados y compuestos fosfatados, y procesos metabólicos primarios (Figura 31).

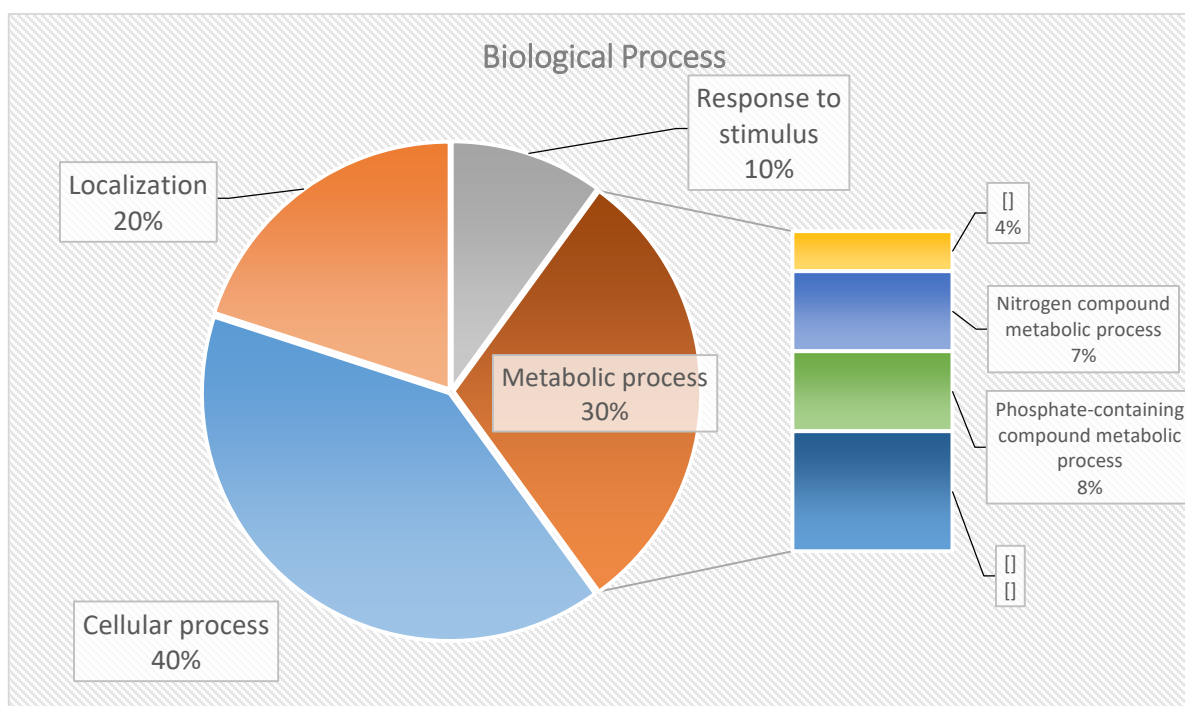


Figura 31 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con NPP19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

Por medio de la herramienta en línea STRING, se pudo inferir la posible asociación funcional entre el conjunto de proteínas identificadas (Figura 32), se obtuvo un gráfico de 11 nodos interconectados (6 nodos identificados en la tabla 1 y 5 nodos de soporte para mejorar la resolución del gráfico). 6 proteínas no pudieron relacionarse en el entramado *yaiP*, *rhsE*, *evgA*, *yghW* y *norV*.

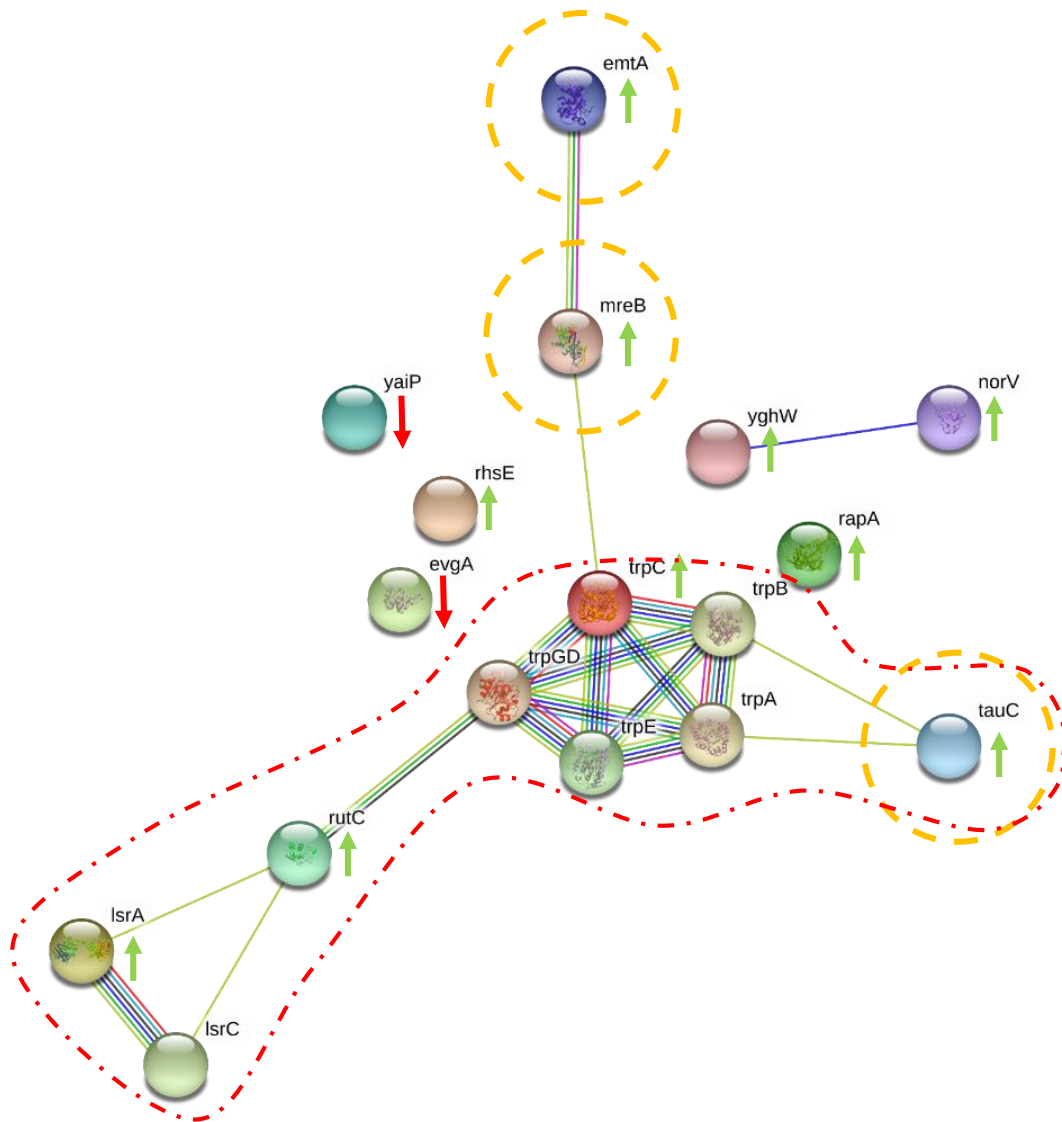


Figura 32 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con NPP19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Las líneas punteadas con rojo se muestran las proteínas involucradas en procesos energéticos.

5.7.3.1. Discusión Experimento 3

Se estudió el efecto del péptido nanoencapsulado en *E. coli*, el cual tuvo un CMI₅₀ más bajo que el péptido libre sin embargo tanto el CMI₉₀ como el CMB fue mucho más alto, lo que indica que es posible que se presentaran mecanismos de acción diferentes entre el péptido libre y encapsulado. Por medio de los análisis proteómicos se pudo evidenciar que rutas metabólicas diferentes son activadas, posiblemente por la presencia del PLGA,

el cual al degradarse puede influir de dos formas sobre *E. coli*, (i) sometiendo a la bacteria al stress del medio ácido por la presencia del ácido láctico y glicólico (ii) y por otra parte estos compuestos pueden servir como fuente de energía para la bacteria (Bala *et al.* 2004).

La respuesta de *E. coli* a la acidificación del medio se logró observar en el grupo control en el que se observa la sobreexpresión de dos proteínas la glucosil transferasa “YaiP” y el activador transcripcional de unión al ADN “EvgA”. La proteína YaiP se activa en respuesta al estímulo de daño al ADN celular (Winterberg *et al.* 2005), y la proteína “evgA” que es miembro del sistema regulador de dos componentes EvgS / EvgA el cual activa el sistema PhoQ / PhoP a través de la pequeña proteína de membrana SafA. (Eguchi *et al.* 2007), Esta vía también contribuye a la resistencia a los ácidos. Se ha encontrado que la resistencia a los ácidos es un sistema crítico para la supervivencia de *E. coli*, y que varios factores están involucrados en este sistema. EvgA también regula la expresión del operón con *mdtEF*, que codifica una bomba de efusión multidrogas que confiere resistencia a múltiples fármacos en *E. coli*. (Foster 2004).

Por otra parte en *E. coli* tratado con las nanopartículas cargadas con el péptido NPP19, se observó la sobreexpresión de múltiples proteínas (Figura 30), un efecto contrario al observado en *E. coli* tratada con el péptido libre (Figura 24) en su mayoría proteínas involucradas en procesos celulares y metabólicos, como la proteína putativa “RhsE” y el sistema transporte de taurina TauC. Los sistemas Rhs representan reservorios de la diversidad de proteínas de inmunidad a toxinas las cuales pueden movilizarse y desplegarse cuando sea necesario (Hayes *et al.* 2014), y la proteína TauC la cual se activa en respuesta a la inanición de sulfato provoca una mayor síntesis de varias proteínas implicadas en la obtención de azufre de fuentes alternativas (Eichhorn *et al.* 2000).

5.7.4. Experimento 4: Control vs tratamiento con P19 sobre SARM.

5.7.4.1. Análisis por PDQuest™ e identificación por Mascot

Se realizó un análisis comparativo proteómico entre los grupos control vs tratamientos, y se determinaron las proteínas expresadas diferencialmente que posiblemente se encuentran implicadas en la respuesta de SARM frente a la acción del péptido antibacteriano P19. Dentro de lo evaluado con el software PDQuest™ se detectaron un total de 123, 118 y 116 proteínas (spots) en las respectivas réplicas de geles dados para el grupo control (Anexo 14 B, C, D). y un total de 255, 296 y 153 spots en los geles del tratamiento con el péptido (Anexo 14 E, F, G). los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,6 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando de esta manera la reproducibilidad entre grupos.

La comparación obtenida entre el grupo control y el tratado (t-student $p < 0.05$; proteínas con variación relevante de un cambio de superior o igual a 2 e inferior a 2 veces) mostró la expresión diferencial de proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos. Los spots con expresión diferencial fueron escindidos y tripsinizados para determinar su huella peptídica por espectrometría de masas. Las huellas peptídicas que fueron exitosamente identificadas se listan en la Tabla 11. Alrededor de 20 spots fueron expresados diferencialmente en el grupo tratado con el péptido P19, de los cuales un total de 11 proteínas tuvieron algún nivel de inhibición y 9 proteínas se sobreexpresaron (Figura 33). Los mapas de calor (Anexo 15) revelan la expresión diferencial mediante intensidades de colores a través de las réplicas entre los grupos, en este caso, los spots identificados con color azul muestran inhibición y el color rojo muestran sobreexpresión en el grupo tratado. En este caso se observa que la mayoría de proteínas expresadas diferencialmente (8) fue inhibida en el grupo tratado, mientras que otras 5 proteínas son sobre expresadas.

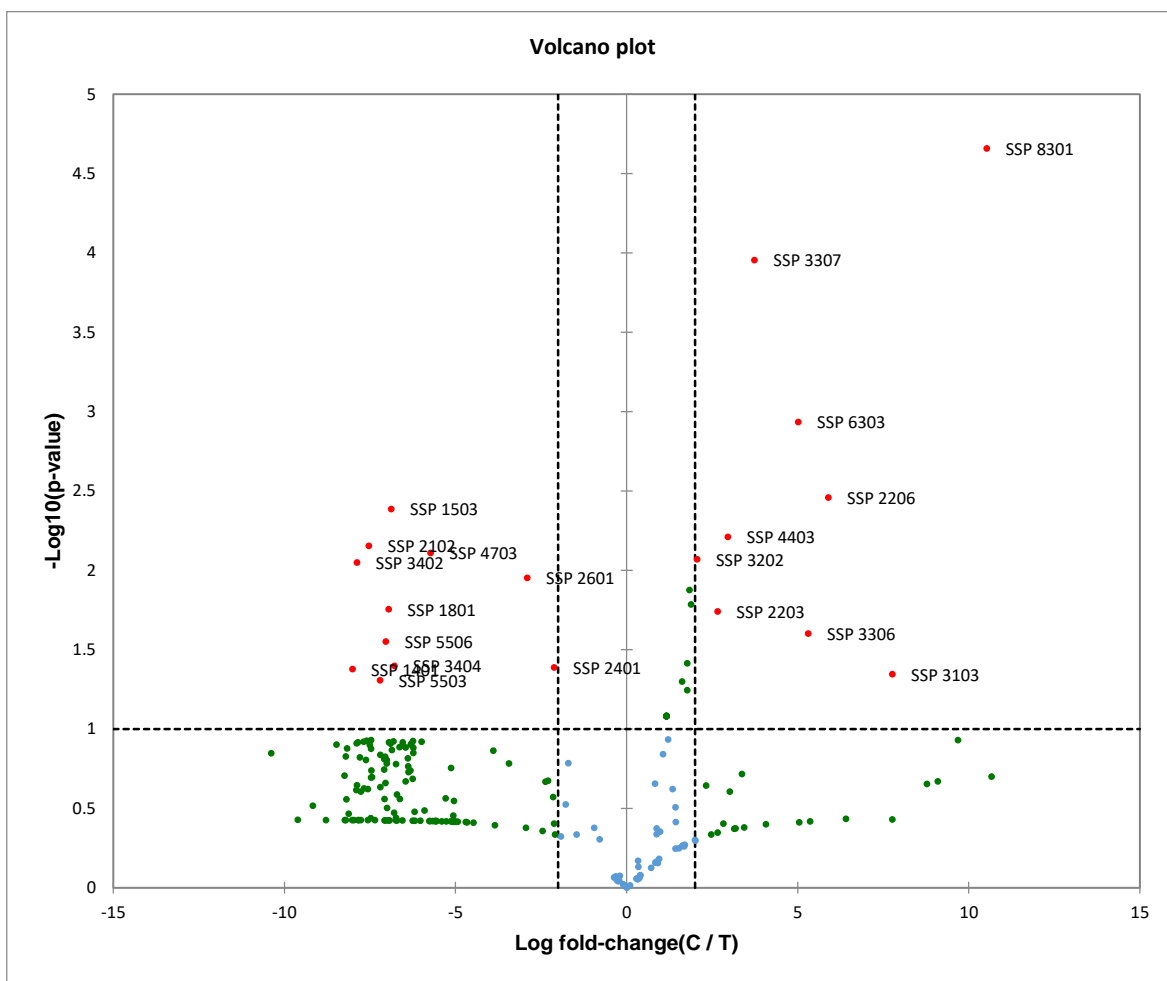


Figura 33 Volcano plot de los spots del Experimento 4: Control vs Tratamiento con P19 en SARM. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 11 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 4, Identificadas a partir de su huella peptídica por "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

S SP	Proteína	N. acceso ¹	G en	Función Molecular	Proceso Biológico	P. M. ² (Da)	P .I. ³	C. E. ⁴	P- Valor	Sc ore ⁵
1 401	Proteína ribosómica 50S L20	A5 D0U4	rp IT	- Enlace de rRNA - Constituyente estructural de ribosoma	- Traduc ción	1 3416	1 1.5	25 7,32	4, 20E- 02	75
1 503	Queuine tRNA- ribosiltransf erasa	A3 DE13	tg t	- Unión de iones metálicos - Queuine actividad tRNA- ribosiltransferasa	- Proces o biosintético queuosino - tRNA- guanine transglucosila ción	4 2997	6 .76	11 6,76	4, 11E- 03	77
2 102	Acetilgl utamato cinasa	B0 K4D4	ar gB	- Actividad acetilglutamato quinasa - Unión al ATP	- Proces o biosintético de arginina	3 2782	5 .43	18 4,08	7, 03E- 03	98
2 206	Galacto sa / galactósido de metilo importa la proteína de unión a ATP MglA	Q89 6Y2	m glA	- Unión al ATP - Actividad de ATPasa transportadora de monosacáridos		5 6131	8 .17	- 0,98	3, 48E- 03	11 3
3 103	Lantibio tico Nukacin	E0 WX65	n ukA	- Enlace del receptor	- Respue sta de defensa de citólisis a bacteria	6 570	4 .71	- 1,00	4, 52E- 02	11 2

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

3 306	Proteína Chaperona ADNJ	Q74 IT7	d naJ	- Unión al ATP - Unión a proteínas de choque térmico - Unión de iones metálicos - Enlace de proteínas desplegado	- Replicación de ADN - proteína a plegable - respuesta al calor	4 2233	7 .99	- 0,97	2, 50E-02	10 6
3 307	Proteína de unión a ATP Importadora de metilo Galactosa / galactósido	Q89 6Y2	m glA	- ATP vinculante - Actividad de ATPasa transportadora de monosacáridos	- Transporte de azúcar	5 6131	8 .17	- 0,93	1, 11E-04	73
3 403	Proteína de recombinación RecR	B8F Y16	re cR	- Unión al ADN - Unión de iones metálicos	- Recombinación de ADN - Reparación del ADN	2 2229	5 .86	- 0,72	1, 33E-02	71
3 404	Cadena gamma de ATP sintasa	A9 KK93	at pG	- Actividad de ATP sintetasa transportadora de protones - Mecanismo de rotación	- La síntesis de ATP acopla el transporte de protones	3 2027	8 .44	10 9,51	4, 00E-02	63
4 703	Tagatosa-6-fosfato quinasa	POD C12	la cC	- Unión de ATP - Actividad tagatosa-6-fosfato quinasa	- Proceso catabólico de D-tagatosa 6-fosfato - Proceso catabólico de lactosa a través de tagatosa-6-fosfato	3 3730	5 .07	52 .05	7, 76E-03	72
5 301	Glucógeno sintasa	C4L 3L1	gl gA	- Actividad de alfa-1,4-glucano sintasa - Actividad de glucógeno (almidón) sintasa - Actividad de almidón sintasa	- Proceso biosintético de glucógeno	5 4351	5 .08	- 0,73	1, 64E-02	73

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

5 401	GTPasa Der	B11 462	d er	- Unión al GTP	- Biogén esis ribosómica	4 8196	9 .19	- 0,71	5, 69E- 02	11 0
5 604	Arginin e--tRNA ligase	B1 MZ82	ar gS	- Actividad ligasa Arginina- ARNt - Unión al ATP	- Arginil -tRNA aminoacilaci ón	6 2744	5 .17	- 0,71	3, 85E- 02	79
6 303	UDP-N- acetilglucos amina - N- acetilmuram il (pentapéptid o) pirofosforil- undecapren ol N- acetilglucos amina transferasa	A8 AW15	m urG	- Actividad UDP-N-acetil-D- glucosamina de N- acetilmuramoil-L- alanil-D-glutamil- meso-2,6- diaminopimelil- D-alanil-D- alanina- diphosphoundecar enol 4-beta-N- acetilglucosamint ransferasa - Actividad Undecaprenildifo sfo- muramoilpentape ptido beta-N- acetilglucosaminil transferasa	- Proces o metabólico de carbohidrato s - Ciclo celular - Divisió n celular - Organi zación de la pared celular - Glicosi lación lipídica - Proces o biosintético de peptidogluca no - Regula ción de la forma celular	3 9819	8 .32	- 0,97	1, 16E- 03	79

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.4.2. Análisis Bioinformático

Del conjunto de proteínas que presentaban una expresión diferencial en el grupo tratado, se lograron identificar exitosamente de 14 proteínas (Tabla 11). Las proteínas identificadas se clasificaron por medio del software PANTHER de acuerdo con su función biológica (Figura 34) en (i) procesos metabólicos (50%) subclasificados a su vez en procesos biosintéticos (10%), metabolismo de compuestos nitrogenados (10%), procesos celulares (5%), y procesos metabólicos primarios (25%); (ii) procesos celulares (40%) y (iii) organización de los compuestos celulares o biogénesis (10%).

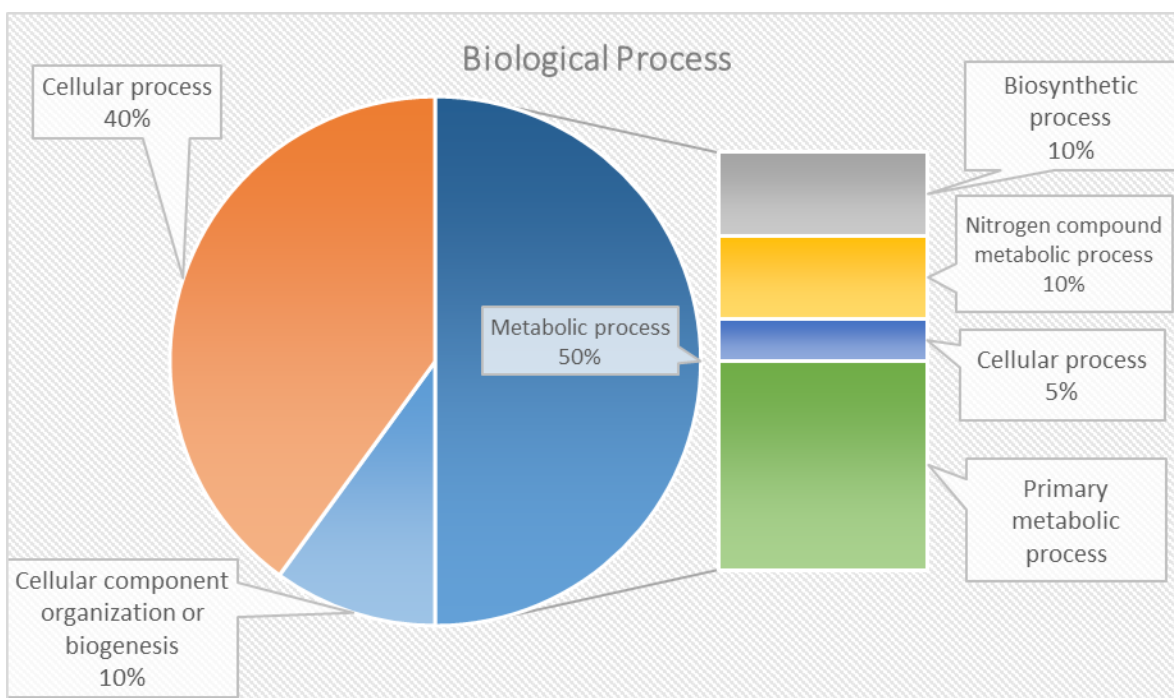


Figura 34 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por SARM al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

Dentro de los resultados obtenidos con el software STRING v10.0 utilizado para predecir las interacciones entre proteínas y sus rutas metabólicas (interactoma), encontramos una relación teórica o experimentalmente determinada para 9 proteínas. Por ejemplo, en la ruta principal se observa la coexpresión (línea negra) de dos proteínas inhibidas en el tratamiento con el P19, la proteína de recombinación RecR (-0,72 veces)

y UDP-N-acetilglucosamina-N-acetilmuramil pirofosforil undecaprenol N-acetilglucosamina transferasa (murG, -0,97 veces) (Figura 35).

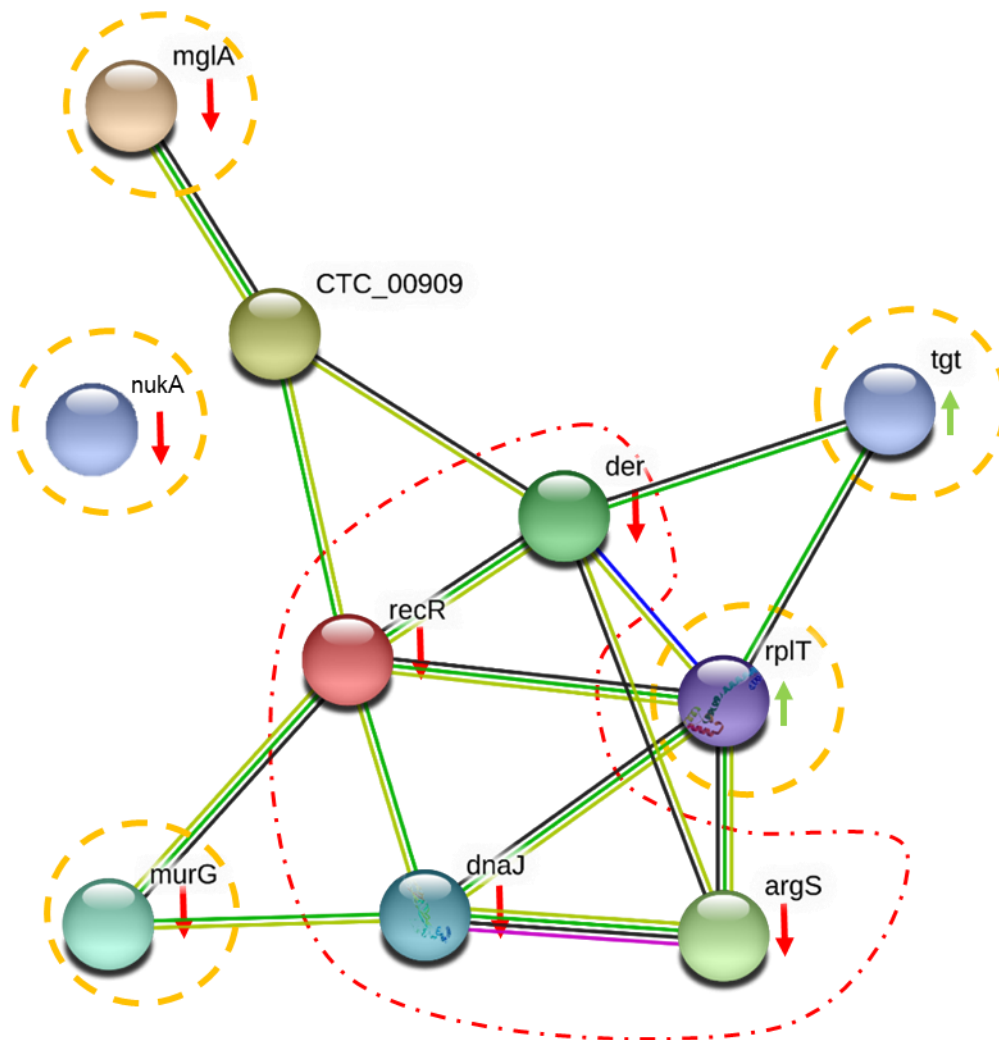


Figura 35 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en SARM al ser tratadas con el péptido P19 (Experimento 4) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. Las zonas delimitadas por la línea punteada roja corresponden a proteínas involucradas en los procesos de replicación, transcripción y traducción.

5.7.4.1. Discusión Experimento 4

Se investigó el efecto del péptido P19 a corto plazo sobre SARM, se evidenció que la mayoría de proteínas se sobreexpresaron en el grupo tratado entre ellas la proteína 50S ribosomal L20 (257,32 fold), involucrada principalmente en el ensamble estructural del

ribosoma, y en la regulación del RNAr durante los procesos de traducción (Raibaud *et al.* 2003). Esta sobreexpresión podría ser una de las consecuencias de la acción del péptido por medio de la desestabilización de las subunidades ribosomales, las cuales desempeñan funciones esenciales en casi todos los aspectos del metabolismo celular, incluido el transporte de proteínas, el empalme de ARN, la formación de enlaces peptídicos y la regulación traduccional (Aseev y Boni 2011). Además, cabe resaltar que particularmente el gen codificante de la proteína 50S ribosomal L20 es uno de los genes clasificados como targets esenciales para el desarrollo de nuevos antibióticos frente a *S. aureus* (Forsyth *et al.* 2002).

Una consecuencia similar fue la expresión diferencial de la proteína GTPasa Der (-0,71 fold), un factor novedoso involucrado en el crecimiento celular bacteriano, la biogénesis y estabilidad de las subunidades ribosomales del 50S en *E. coli* (Hwang y Inouye 2006; Hwang y Inouye 2010), siendo claro que el ribosoma además de cumplir roles fundamentales para el funcionamiento celular, es uno de los blancos principales del péptido P19.

Por otra parte, los productos de los genes *recF*, *recO* y *recR* han sido asociados previamente con procesos de recombinación y reparación de ADN bacteriano frente a algunas condiciones de estrés, mediante la interacción con *RecA* y con la proteína de unión al ADN monocatenario (*Ssb*), la cual es crucial para la replicación celular (Umezuru *et al.* 1993; Hegde *et al.* 1996). Por otro lado, *murG* es una proteína importante en los procesos de síntesis/ensamble de peptidoglicano, moléculas estructurales de la pared celular bacteriana (Mohammadi *et al.* 2007). De esta manera, la coexpresión y la inhibición de estas dos proteínas posiblemente se relaciona con la supresión del ciclo celular y la división celular, así como la organización de la pared celular como posibles efectos del péptido P19 en SARM.

5.7.5. Experimento 5: SARM Control vs Resistente al P19.

5.7.5.1. Análisis por PDQuest™ e identificación por Mascot

Para el análisis comparativo entre el control vs la expresión de las proteínas de SARM resistente al péptido P19 se obtuvieron 6 geles 3 del grupo control (Anexo 16 B,C y D) y 3 del grupo resistente al P19 (Anexo 16 E, F y G) por medio del software PDQuest™ se lograron identificar 144, 151 y 162 spots en las réplicas del grupo control y 214, 248 y 234 spots en las réplicas del grupo tratado. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,6 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando de esta manera la reproducibilidad entre grupos.

En la comparación obtenida entre el grupo control y la cepa resistente al péptido (t-student $p < 0.05$) se evidenció la expresión diferencial de proteínas relacionadas con diferentes procesos biológicos. En este experimento, 15 spots fueron expresados diferencialmente en SARM resistente, de los cuales un total de 11 proteínas fueron inhibidas y 4 proteínas altamente expresada en el grupo resistente (Figura 36).

El mapa de calor revela la expresión diferencial mediante intensidades de colores a través de las réplicas entre los grupos, los spots identificados con color azul muestran inhibición, mientras que el color rojo muestra sobreexpresión (Anexo 17). Se observó una inhibición en la mayoría de proteínas en el grupo resistente mientras que solo 4 fueron sobreexpresadas entre ellas el sistema captador de tungsteno “TupC” (SPP 502).

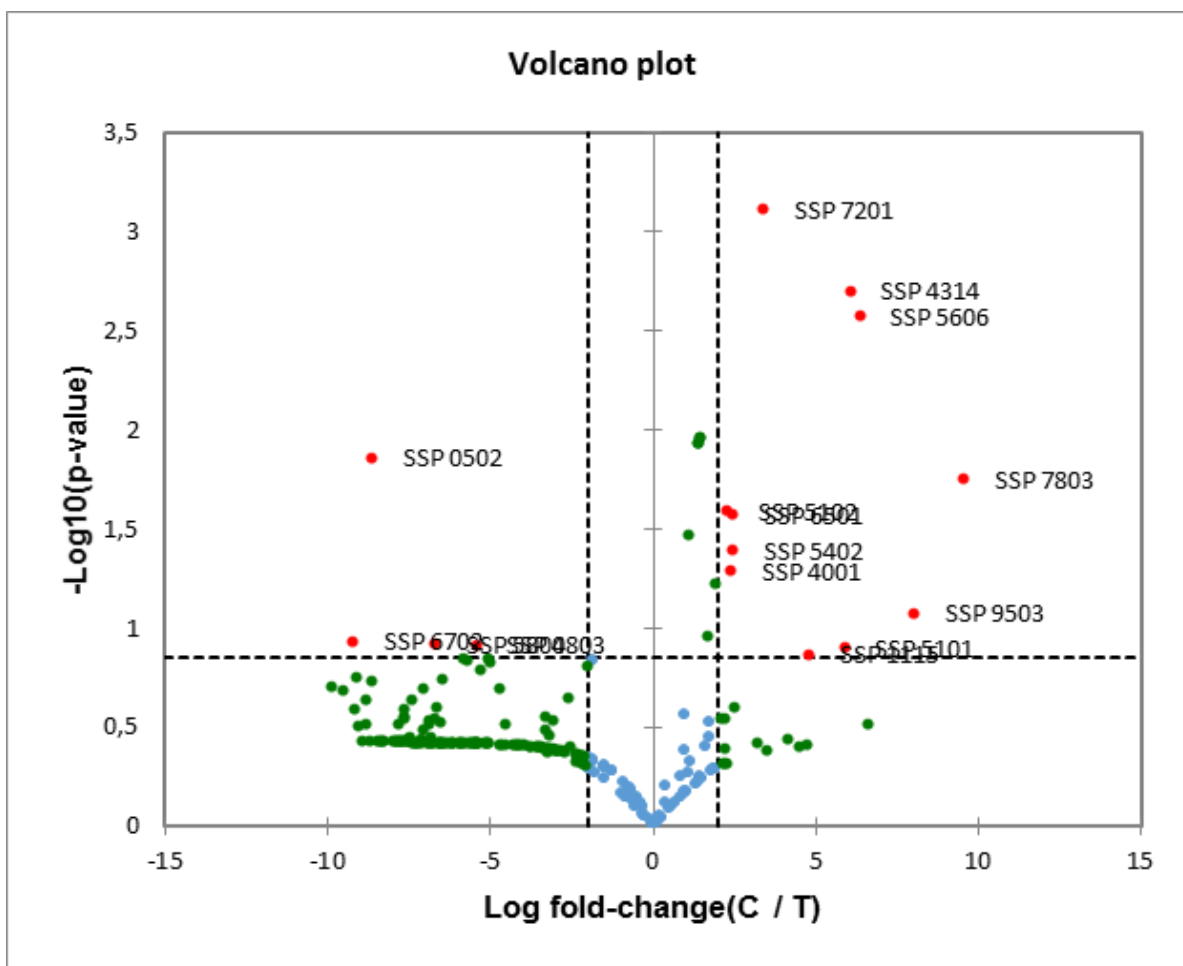


Figura 36 Volcano plot de los spots del Experimento 5: SARM Control vs Resistente a P19. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 12 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 5, Identificadas a partir de su huella peptídica por "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

S SP	Proteína	N. acceso ¹	Ge n	Función Molecular	Proceso Biológico	P. M. ² (Da)	P. I. ³	C. E. ⁴	P- Valor	S core ⁵
5 02	Sistema de captación de tungstato Proteína de unión a ATP TupC	Q93 KD4	tup C	- Actividad de ATPasa - Unión a ATP	- Transporte	23 692	5. 73	40 4,58	1,3 8E-02	72
1 112	Queuina ARNt-ribosiltransferasa	A7X 354	tgt	- Unión de iones metálicos - Queuina e tRNA-ribosiltransferasa actividad	- Proceso biosintético de Queuosina - ARNt-guanina transglicosilación	43 795	5. 94	- 0,64	1,1 6E-02	78
2 402	Xantina fosforribosiltransferasa	Q65I 86	xpt	- Actividad xantina fosforribosiltransferasa	- Recuperación de purina ribonucleosido - Proceso metabólico de Xantina Recuperación de XMP	20 805	5. 54	- 0,63	1,1 0E-02	11 6
3 502	Sintasa 4-hidroxi-tetrahidropicolinato	A4J 5V5	da pA	- Sintasa 4-hidroxi-tetrahidropicolinato	- Proceso biosintético de diaminopimelato - Proceso biosintético de lisina vía diaminopimelato	31 881	5. 79	- 0,53	3,4 3E-02	66
4 314	Deshidrogenasa aerobia de Glicerol-3-fosfato	Q49 X94	glp D	- sn-glicerol-3-fosfato: actividad ubiquinona-8 oxidoreductasa	- Proceso metabólico de glicerol-3-fosfato - Proceso catabólico de glicerol	62 278	6. 05	- 0,98	1,9 9E-03	83

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

5 101	Dihidroorotato deshidrogenasa B (NAD (+)), subunidad de transferencia de electrones	P25983	pyrK	- Unión de clúster de hierro y azufre - Unión al dinucleótido flavina adenina - Unión de iones metálicos - Actividad de oxidoreductasa	- Proceso biosintético de novo UMP	28538	5.68	-0,98	4,06E-02	81
	2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-carboxilato sintasa	Q65FT2	menD	- Actividad sintasa 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi 3-ciclohexeno-1-carboxílico - Unión de iones metálicos - Atascamiento de pirofosfato de tiamina	- Proceso biosintético de la menaquinona	64899	5.56	-0,79	2,58E-02	97
5 402	GTPasa Der	B1MYB5	der	- Unión al GTP	- Biogénesis ribosómica	48688	5.05	-0,81	1,16E-02	65
5 606	Proteína no caracterizada YpzJ	C0H447	ypzJ			7631	7.66	-0,99	2,68E-03	81
6 501	Glicina - subunidad beta de ARNt ligasa	B8CXH5	glyS	- Arginina-ARNt ligasa actividad - Unión a ATP - Actividad glicina-ARNt ligasa	- Amino acilación arginil-ARNt - Amino acilación de glicil-tRNA	79005	4.88	-0,82	2,69E-02	88

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

7 201	Proteína iniciadora de la replicación cromosómica DnaA	COM 7C0	dn aA	- Unión a ATP - Enlace de origen de replicación de ADN	- Iniciación de replicación del ADN - regulación de la replicación del ADN	51 463	5. 18	- 0,90	7,7 0E-04	75
7 803	Proteína de septación putativa SpoVG	B2U XS5	sp oVG	- Ciclo celular - División celular		10 299	5. 17	- 1,00	1,7 6E-02	93
9 503	Subunidad d A de la ATP sintasa	Q1 WUD0	atp F	- Actividad del transportador transmembrana de iones de hidrógeno	- Síntesis de ATP acoplada al transporte de protones	19 719	5. 40	- 1,00	2,6 9E-02	72

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.5.2. Análisis Bioinformático

Del grupo de proteínas que presentaban una expresión diferencial en el grupo tratado, se lograron identificar exitosamente un total de 13 proteínas en la cepa resistente al P19 (Tabla 12). Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo con su función biológica (Figura 37) en (i) procesos metabólicos (63%) subclasificados a su vez en procesos biosintéticos (14%), metabolismo de compuestos nitrogenados (14%), y procesos metabólicos primarios (35%); y (ii) procesos celulares (37%).

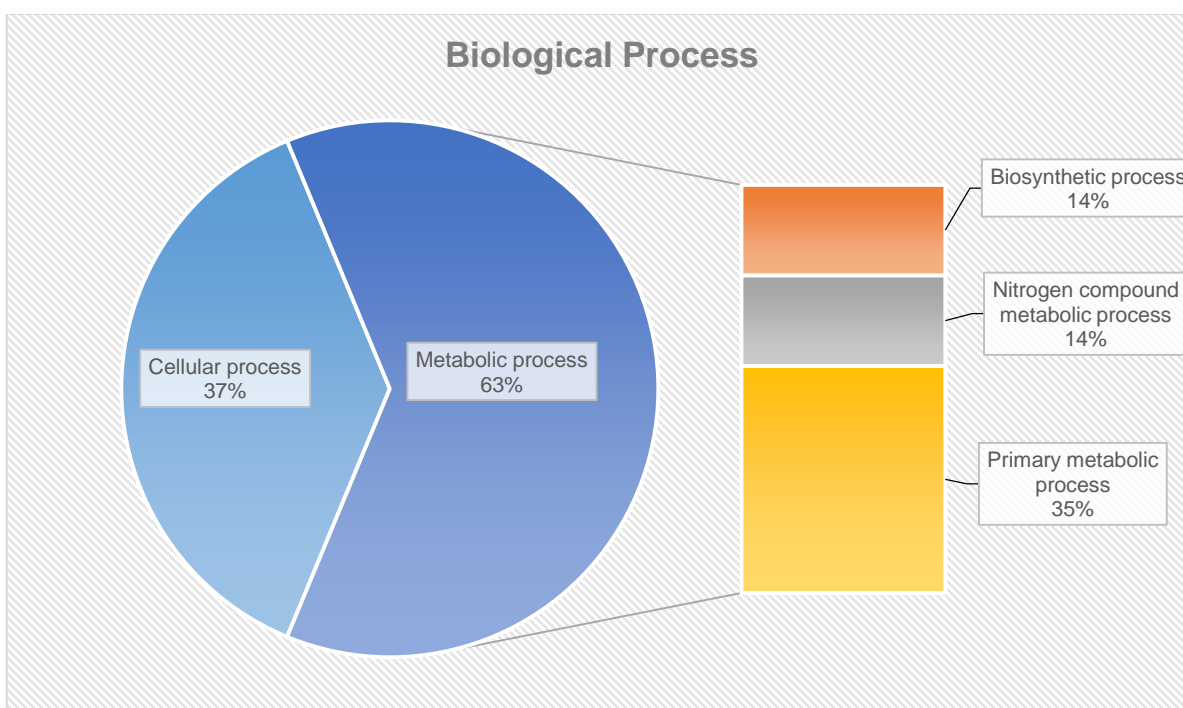


Figura 37 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

El interactoma fue obtenido con el software STRING v10.0 para evaluar las interacciones entre proteínas. Se encontró una relación teórica o experimentalmente determinada para 13 proteínas (nodos), de los cuales la mayoría presenta coexpresión entre estas (líneas negras), por ejemplo, se observa la interacción entre la proteína

quenina RNAt ribosiltransferasa (tgt, -0,64 fold), con la ATP sintasa subunidad B (atpF, -1,00 fold), y la proteína iniciadora de la de la replicación cromosomal (dnaA, -0,90 fold); siendo esta ultima la proteína central de las interacciones (nodo rojo) (Figura 38).

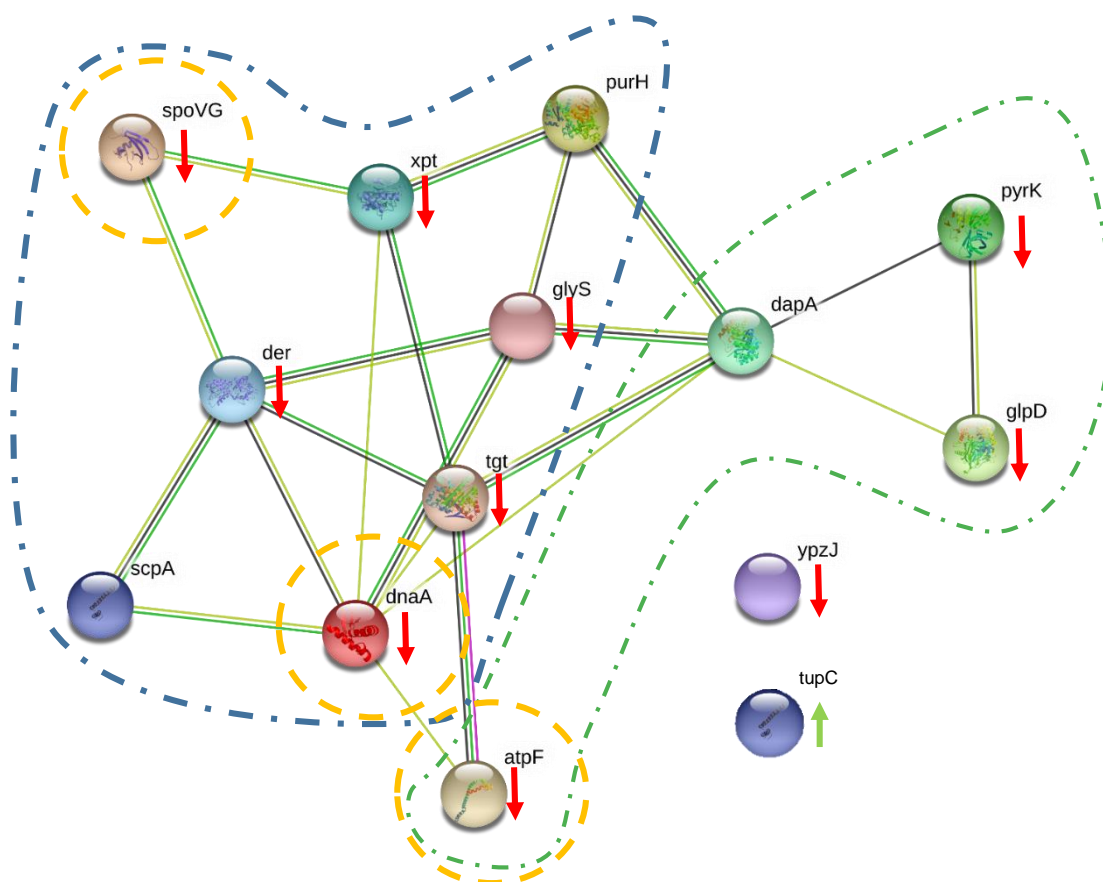


Figura 38 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente *E. coli* O157:H7 al ser tratadas con el péptido P19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. En las zonas delimitadas con la línea punteada azul y verde corresponden a proteínas involucradas en procesos de replicación, transcripción, y procesos de metabolismo energético, respectivamente.

5.7.5.1. Discusión Experimento 5

Se procedió a inducir la resistencia de SARM al péptido P19 para identificar los posibles blancos de futuros péptidos antimicrobianos, se logró identificar la sobreexpresión de la proteína iniciadora de la replicación cromosomal DnaA, la cual

contiene un único origen de replicación (*oriC*) en los cromosomas eubacterianos. Esta proteína se une de manera dependiente de ATP a *oriC* para iniciar la formación del complejo de iniciación de la replicación y posteriormente del replisoma (Messer 2002; Murray y Errington 2008). La inhibición presentada por DnaA junto con la ATP sintasa subunidad b, proteína implicada en el metabolismo energético y síntesis de ATP (coexpresión dada por el interactoma), da indicios del bloqueo o la detención de la replicación cromosomal por parte de SARM resistente al P19, dado que el complejo DnaA-ATP se convierte en cada ciclo a DnaA-ADP, y una vez convertida a ADP la proteína no puede iniciar la replicación sin ATP.

Por otro lado, uno de los mecanismos reportados para alcanzar resistencia a los tratamientos antimicrobianos y a las terapias anticancerígenas es a través del eflujo activo de los fármacos, mediante la acción de proteínas dependientes de ATP en la membrana celular (Szczepanowski *et al.* 2004; Hollenstein *et al.* 2007). La multiresistencia a fármacos es un fenómeno atribuido a la expresión de transportadores, principalmente los pertenecientes a la familia de transportadores de tipo ABC (ATP-binding cassette) en la membrana celular (Kerr *et al.* 2005); están caracterizados por tener una amplia especificidad de sustratos transportando de forma activa compuestos de distinta naturaleza (Calcagno *et al.* 2007; Álvarez de Felipe y Pulido Duarte 2008).

Parte de un complejo de transportadores ABC se encuentra limitado a los sistemas biológicos de archaea y bacterias y está compuesto por dos proteínas de unión a ATP (TupC), dos proteínas transmembranales (TupB) y una proteína de unión a solutos (Bever *et al.* 2006). Uno de estos complejos está involucrado específicamente en la incorporación de tungsteno, uno de los metales presentes en las principales enzimas que catalizan la transferencia de átomos de oxígeno (Makdessi *et al.* 2001; Otrelo-Cardoso *et al.* 2017; Bever *et al.* 2006).

En este estudio, la proteína del sistema de unión a ATP para la toma de tungsteno TupC fue la única proteína identificada que tuvo una alta expresión en la cepa de SARM resistente al péptido P19 (404,58 fold). Esta acción podría ser un intento de la bacteria para buscar un recurso necesario para la disminución intracelular del péptido mediante

su transporte activo. De manera similar, este cambio ha sido previamente reportado en un análisis transcriptómico de SARM tratado con el antibiótico de rodomicina, en el cual se observó la sobreexpresión de cuatro genes codificantes para transportadores ABC (dos genes codificantes para proteínas de unión a ATP) (Sianglum *et al.* 2012).

Además, las modificaciones post-transcripcionales del ARN son muy importantes ya que pueden alterar las propiedades químicas y físicas de los nucleótidos, resultando en un aumento de la eficiencia de las funciones del ARN. De todos los tipos de ARN, el ARNt exhibe el mayor número de modificaciones post-transcripcionales logrando que exista un control de la expresión génica que permite que las bacterias puedan sobrevivir a diferentes entornos (Shippy y Fadi 2014; Chopra y Reader 2015). La proteína queenina RNAt ribosiltransferasa (inhibida en este experimento) está involucrada en la biosíntesis del queosina ARNt, que hace parte de la modificación del ARNt. Estudios recientes también indican que su expresión disminuye o se inhibe en algunas bacterias resistentes a algún tipo de antibiótico, como por ejemplo, *Aeromonas hydrophila* resistente a la novobiocina y la rifampicina (Pridgeon *et al.* 2013), y a SARM tratada con rodomicina (Sianglum *et al.* 2012), posiblemente afectando su sobrevivencia en el entorno.

5.7.6. Experimento 6: Nanopartículas vacías NP Control vs nanopartículas cargadas con el péptido P19 (NPP19).

5.7.6.1. Análisis por PDQuest™ e identificación por Mascot

Para el análisis comparativo entre el grupo control con nanopartículas vacías (NP) vs el tratamiento con las nanopartículas cargadas con el péptido P19 (NP-P19) Se obtuvieron 6 geles 3 del grupo control (Anexo 18 B,C y D) y 3 del grupo resistente al P19 (Anexo 18 E, F y G) por medio del software PDQuest™ se detectaron un total de 236, 169 y 224 spots en las réplicas del grupo NP, y un total de 216, 130 y, 222 spots para el grupo de NP-P19. Asimismo, los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,6 en todas las réplicas (Anexo 5) indicando de esta manera la reproducibilidad entre grupos.

En la comparación obtenida entre NP y NP-P19 (t-student $p < 0.05$) se evidenció la expresión diferencial de proteínas relacionadas con diferentes procesos biológicos. En este experimento, 18 spots fueron expresados diferencialmente en NPP19, de los cuales un total de 12 proteínas fueron inhibidas y 6 proteínas fueron sobreexpresadas (Figura 39). Los spots con expresión diferencial fueron escindidos y tripsinizados para determinar su huella peptídica por espectrometría de masas. Las huellas peptídicas que fueron exitosamente identificadas se listan en la Tabla 13, con estas proteínas fue construido el mapa de calor (Anexo 19), el cual revela la expresión diferencial mediante intensidades de colores a través de las réplicas entre los grupos, los spots identificados con color azul muestran inhibición, mientras que el color rojo muestra sobreexpresión. En este caso la mayoría de proteínas del grupo tratado con NPP19 fue sobreexpresado.

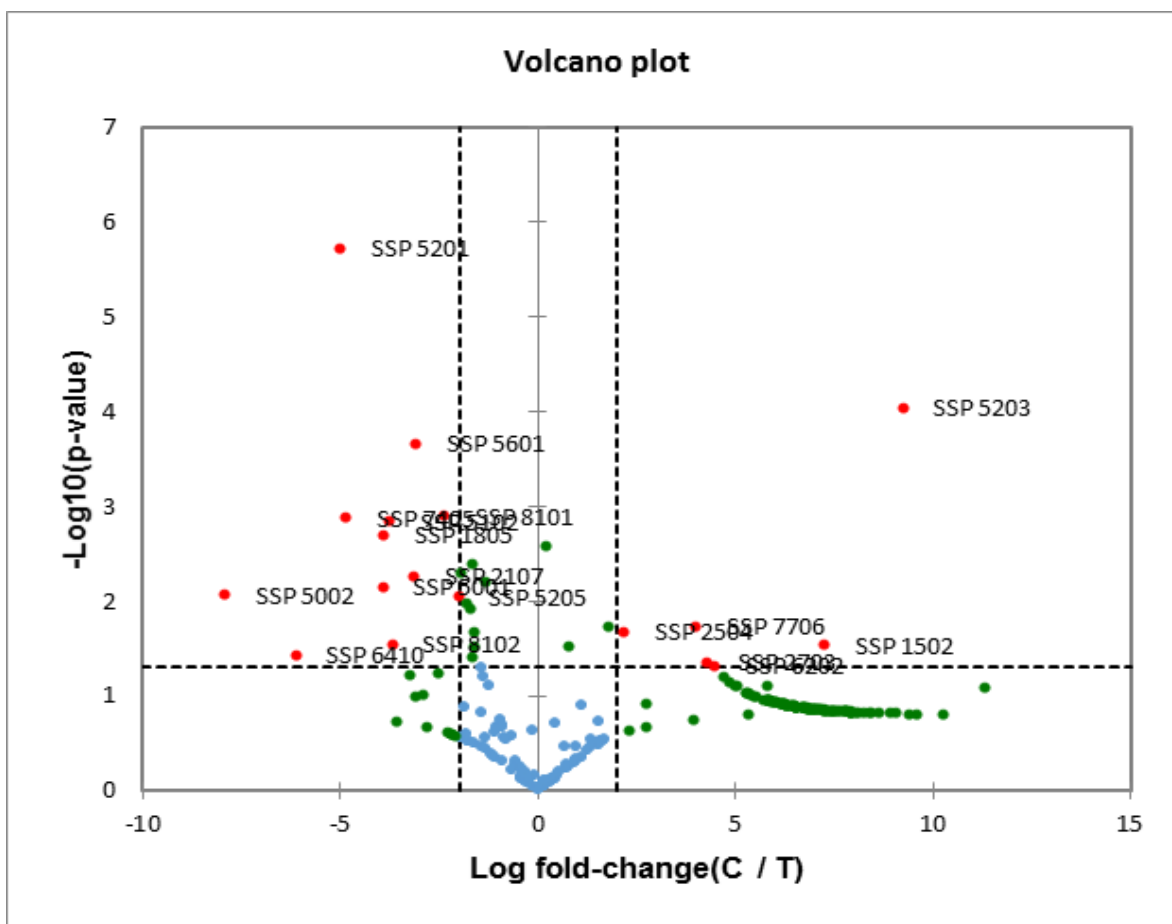


Figura 39 Volcano plot de los spots del Experimento 6: NP Control vs NPP19 en SARM. Los puntos por encima de la línea punteada horizontal son los spots con significancia estadística ($p < 0.05$), Los puntos a la izquierda y derecha de las líneas punteadas verticales son los spots con variación biológica relevante: 2 veces superior a la derecha y 2 veces inferior a la izquierda.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Tabla 13 Información bioquímica de las proteínas expresadas diferencialmente del Experimento 6, Identificadas a partir de su huella peptídica por "MASCOT Peptide Mass Fingerprint".

S SP	Proteína	N. acceso ¹	G en	Función Molecular	Proceso Biológico	P. M. ² (Da)	P .I. ³	C .E. ⁴	P- Valor	Sc ore ⁵
1 009	Subunidad de proteasa dependiente de ATP HslV	Q2 RJP6	h slV	- Unión de iones metálicos - Actividad endopeptidas a tipo treonina	- Proteólisis implicada en el proceso catabólico de la proteína celular	1 8909	6. 52	2, 16	4,0 3E-03	72
1 502	Adenina fosforribosiltransferasa	O34 443	a pt	- Actividad adenina fosforribosiltransferasa	- Recuperación de adenina - Recuperación de AMP - Recuperación de ribonucleósidos en urina	1 8920	4. 89	- 0,99	2,8 7E-02	80
1 805	Homoserina deshidrogenasa	P52 985	h om	- Actividad de la homoserina deshidrogenasa - Unión a NADP	- Isoleucine biosynthetic process - Methionine biosynthetic process - Threonine biosynthetic process	4 6600	5. 16	1 4,11	2,0 1E-03	92
2 504	Proteína no caracterizada YuzF	O32 097	y uzF			8 860	9. 43	- 0,77	2,1 1E-02	10 4
2 604	tRNA pseudouridina sintasa B	Q1 WUF2	tr uB	- Actividad de Pseudouridina sintasa - Unión a ARN	- Síntesis de pseudouridina - Procesamiento de ARNt	3 4356	8. 85	- 0,71	1,8 4E-02	15 2

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

2 703	Probable pirofosfatasa inorgánica dependiente de manganeso	Q65 E18	p paC	- Actividad de difosfatasa inorgánica - Unión de iones metálicos		3 3439	4. 76	- 0,94	4,3 9E-02	90
3 306	GTP 3',8-ciclasa	Q2 YYS8	m oaA	- Unión de clúster de hierro y azufre - Actividad ciclase GTP 3', 8'- - Unión GTP - Unión de iones metálicos	- Proceso biosintético del cofactor de molibdopterina	3 9385	5. 94	8, 42	5,9 8E-02	74
5 001	Adenina deaminasa	Q65 K51	a de	- Actividad de adenina desaminasa	- Proceso catabólico de adenina	6 2214	5. 07	1 4,27	7,0 4E-03	77
5 102	30S proteína ribosomal S9	B8F W05	rp sI	- Constituyente estructural de ribosoma	- Traducción	1 4397	1 1.20	1 2,66	1,4 6E-03	89
5 201	Histidinol deshidrogenasa	Q6 HLE7	hi sD	- Actividad de histidinol deshidrogenasa - Unión a NAD - Unión de iones de zinc	- Proceso biosintético de histidina	4 7457	5. 35	3 0,91	1,8 84E-06	94
5 205	ácido N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa	Q67 RV4	m urQ	- Enlace derivado de carbohidratos - Actividad de carbono-oxígeno liasa	- Proceso metabólico de carbohidratos - Proceso catabólico del ácido N-	3 1624	5. 91	3, 06	8,9 6E-03	11 4

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

					acetilmurámico					
5 601	Factor de elongación G	Q5L400	fu sA	- Actividad de GTPasa - Unión a GTP - Actividad del factor de elongación de la traducción		7 7202	5. 10	7, 58	2,1 7E-04	74
5 602	UDP-N-acetilolpiruvil glucosamina reductasa	C3KV11	m urB	- Unión del dinucleótido flavina adenina - Actividad UDP-N-acetilmuramato deshidrogenasa	- Ciclo celular - División celular - Organización de la pared celular - Proceso biosintético de peptidoglucano	3 3836	7. 01	1, 33	7,9 9E-02	66
5 804	Acetato cinasa	Q5XE86	a ckA	- Actividad de acetato cinasa - Unión a ATP - Unión de iones metálicos	- Proceso biosintético de Acetil-CoA - Proceso metabólico ácido orgánico	4 3757	5. 28	- 0,93	4,7 9E-02	92
7 401	NADPH deshidrogenasa	Q739N4	n amA	- Unión a FMN - Actividad de NADPH deshidrogenasa - Actividad de Pentaeritrol trinitrato reductasa - Actividad deshalogenasa reductora de tricloro-p-hidroquinona	- Respiración a sustancias tóxicas	3 8626	5. 68	1, 50	6,3 7E-03	68

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

7 403	GTP 3',8- ciclasa	Q2 YYS8	m oaA	- Unión de clúster de hierro y azufre - Activida d ciclasa GTP 3', 8 - Unión GTP - Unión de iones metálicos	- Proces o biosintético del cofactor de molibdopter ina	3 9385	5. 94	- 0,79	1,3 3E-03	71
8 101	Proteína de reparación del desemparejamient o del ADN MutS	B3 W9W4	m utS	- Unión de ATP - Unión de ADN no coincidente	- Repar ación de desajuste	9 4848	5. 52	4, 23	1,2 8E-03	83

Aclaraciones: ¹Numero de acceso; ²Peso molecular; ³Punto Isoeléctrico; ⁴Cambio de Expresión; ⁵Puntaje basado en la probabilidad de Mascot.

5.7.6.2. Análisis Bioinformático

Se realizó un análisis ontológico de los genes identificados en la Tabla 13 por medio del software PANTHER y se clasificaron de acuerdo con su función biológica (Figura 40) en (i) procesos metabólicos (40%) subclasificados a su vez en procesos biosintéticos (4%), metabolismo de compuestos nitrogenados (12%), procesos celulares (8%), procesos metabólicos de compuestos fosfatos (4%), y procesos metabólicos primarios (12%); (ii) procesos celulares (40%), (iii) organización de los compuestos celulares o biogénesis (10%), (iv) reproducción (5%), y (v) respuesta a estímulos (5%).

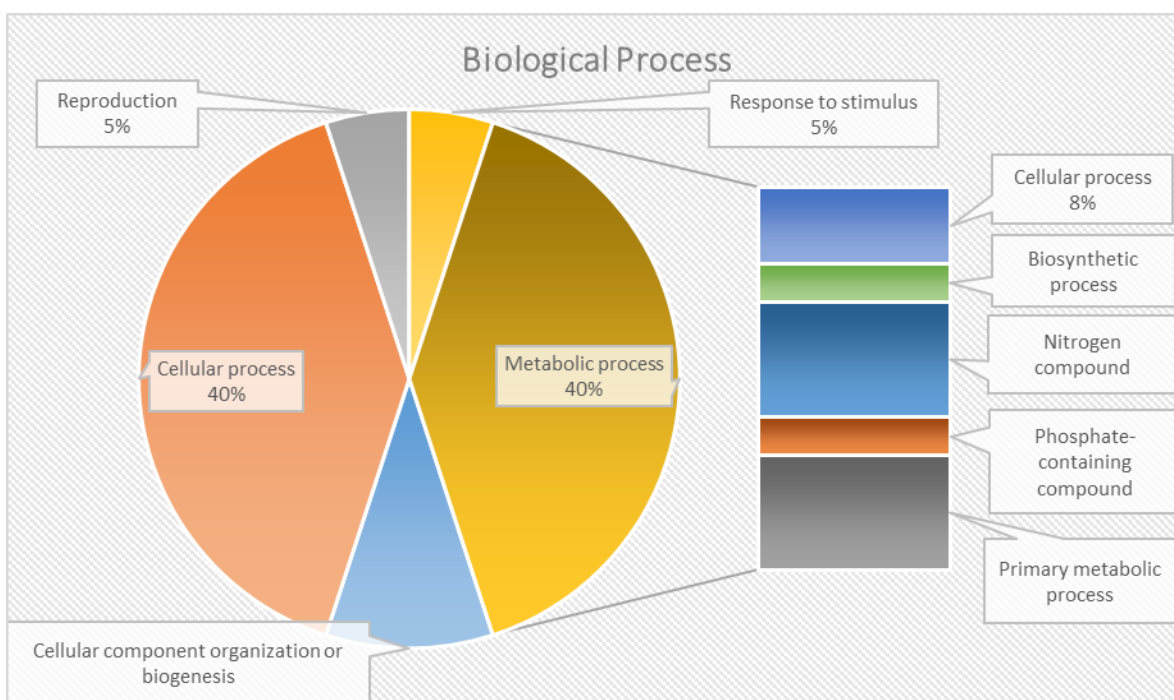


Figura 40 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por SARM al ser tratadas con NPP19, clasificadas por el software "Panther Classification System".

En el interactoma (Figura 41) se encontró una relación teórica o experimentalmente determinada entre 15 proteínas (nodos). Un posible blanco de acción es la coexpresión (línea negra) de las proteínas adenina fosforibosiltransferasa (aptF) junto con el factor de elongación G (fusA); esta interacción ha sido previamente determinada experimentalmente (línea fucsia). A su vez, fusA presenta una asociación con la proteína

ribosomal 30S S9 (rps1), y esta con la proteína RNAt pseudouridinasintasa B (truB, -0,71 fold) (líneas fucsias y negras).

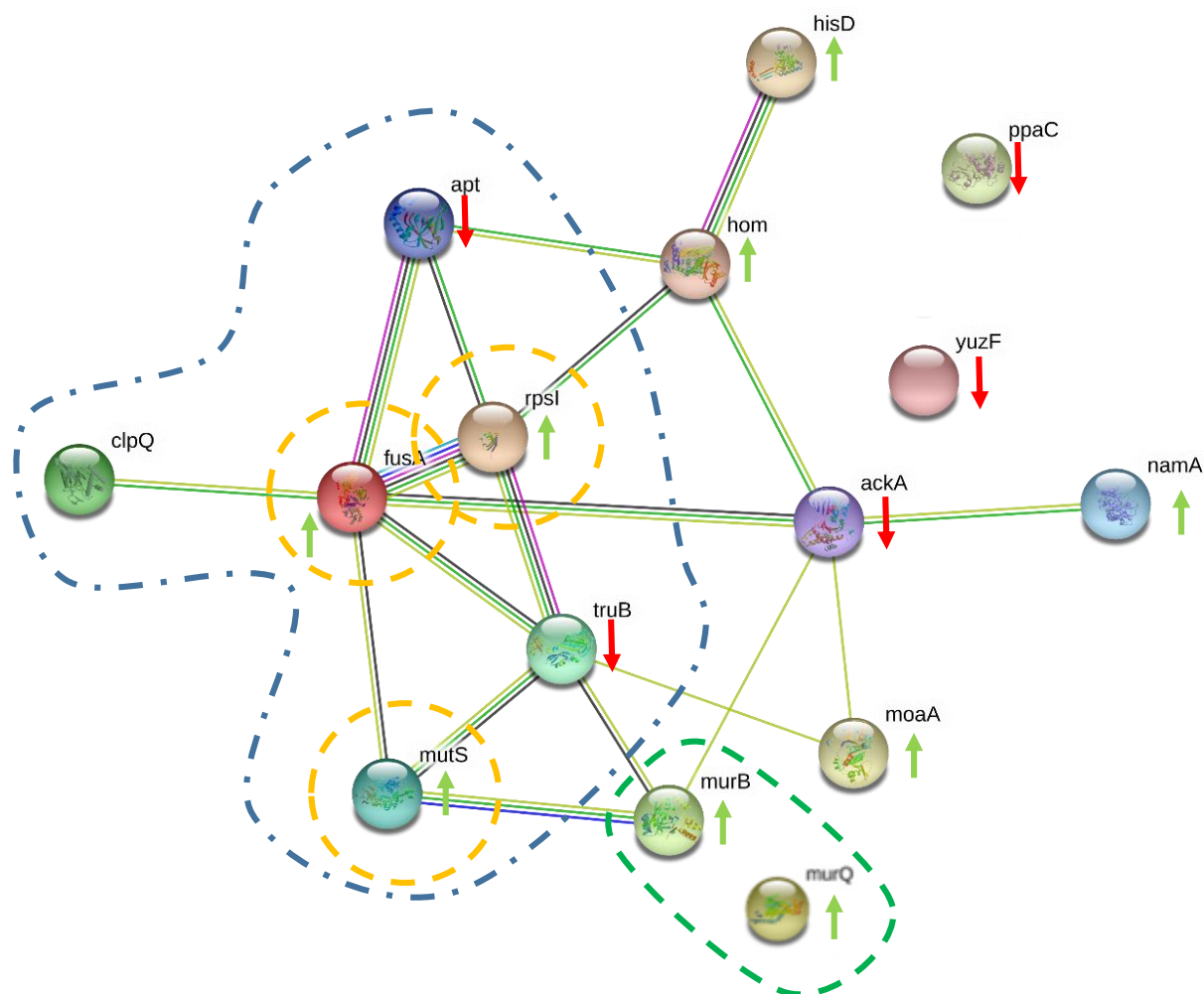


Figura 41 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en SARM al ser tratadas con NPP19 (Experimento 1) construido por STRING v10.0. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos. Las flechas color rojo indican las proteínas que fueron inhibidas y las flechas verdes indican las proteínas que fueron sobreexpresadas. La zona delimitada con azul corresponde a proteínas involucradas en procesos de reparación de ADN y traducción. Las proteínas en la zona delimitada con la línea verde corresponden a proteínas responsables de procesos de síntesis de componentes de membrana y pared celular.

5.7.6.1. Discusión Experimento 6

Finalmente se investigó el efecto de la nanoencapsulación del péptido P19 en el perfil proteómico de SARM, se evidenció una ruta adicional para dar respuesta al estrés causado por el péptido P19. Esta vía está relacionada con la modificación de la carga

superficial de la envoltura celular, ya que la mayor sobreexpresión proteica en el grupo tratado con las NPP19 fue de la histidinol deshidrogenasa (30,91 fold). Esta es una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de histidina, esta es una vía de múltiples pasos presente en arqueobacterias, bacterias, hongos y plantas, pero ausente en los mamíferos. Esto hace que su ruta biosintética sea un objetivo para la actividad de herbicidas, agentes antifúngicos y antibióticos (Barbosa *et al.* 2002; Kulis-Horn *et al.* 2014; Ruzzkowski y Dauter 2017). La L-histidinol deshidrogenasa (HDH), cataliza los dos últimos pasos en la biosíntesis de L-histidina y asimismo, se ha reportado que es esencial para la replicación y supervivencia de bacterias asociadas a diversas infecciones, tales como la brucelosis y la tuberculosis (Abdo *et al.* 2007; Joseph *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2002).

Esto sugiere un incremento estimulado de histidina (aminoácido cargado positivamente en condiciones fisiológicas) a la pared celular bacteriana, aumentando de esta manera su carga positiva y a su vez, disminuyendo la interacción electrostática con las nanopartículas.

Similar a lo evidenciado para los otros tratamientos, se sigue encontrando el ataque a las rutas de síntesis energética. La proteína adenina dosforibosiltransferasa (aptF) implicada en la formación de AMP se inhibe presentando un desbalance del metabolismo energético necesario para cumplir los procesos funcionales cruciales para el desarrollo celular (Hochstadt-Ozer 1972; Harold 1972). AtpF también ha sido identificada en el proteoma de la bacteria resistente a otro tipo de estrés ambiental como lo es la radiación *Deinococcus geothermalis* (Liedert *et al.* 2010).

Finalmente, la alta expresión del factor de elongación G (fusA), proteína que cataliza la etapa de translocación ribosómica dependiente de GTP durante el alargamiento de la traducción, demuestra un intento por mantener el crecimiento bacteriano que depende significativamente de la síntesis de proteínas catalizada por el ribosoma (Grinter *et al.* 2016; Zhu *et al.* 2016).

6. Conclusiones

El péptido sintético antibacteriano P19 presentó una fuerte acción antibacteriana sobre *E. coli* O157:H7 y SARM (CMI₅₀ 12,5 y 1,5 μ M, respectivamente. Tabla) comparable con los péptidos naturales más estudiados (LL-37, la plectasina y nisina). Con base en los resultados obtenidos en el CMI y CMB se determinó, que el P19 tiene actividad bactericida en *E. coli* O157:H7 y bacteriostático en SARM.

Se determinó la relación óptima de péptido/polímero en términos de porcentaje de encapsulamiento, tamaño y carga superficial, en 8 μ g de P19/ μ g PLGA. A partir de los resultados de capacidad de carga y perfil de liberación (Figura 17 y Figura 18) se ha propuesto un modelo de nanocapsulas con núcleo acuoso (Figura 16). Por medio la estrategia de nanoencapsulación se logró mejorar la actividad antibacteriana del péptido sintético P19 sobre SARM y *E. coli* O157:H7, disminuyendo la CMI₅₀ 2 y 4 veces respectivamente, de esta forma es posible que el índice terapéutico del P19 haya mejorado, sin embargo, es necesario realizar los experimentos pertinentes de citotoxicidad para determinar exactamente el índice terapéutico de las NPP19.

Posteriormente se exploró la posibilidad de inducir resistencia al PAM P19 en las cepas de *E. coli* O157:H7 y SARM, con el objetivo de estudiar posibles cambios metabólicos a largo plazo debido a la exposición al péptido. El desarrollo de resistencia al P19 se logró al cabo de 50 pases en ambas bacterias. En *E. coli* O157:H7 la CMI₅₀ aumentó cuatro veces, mientras que en SARM aumentó 33 veces. Se compararon los resultados obtenidos en este trabajo, con el de otros autores utilizando un fármaco convencional como la ciprofloxacina, se observó una mayor dificultad para generar resistencia al P19 en *E. coli* y SARM, siendo necesario el doble de pases y un mayor tiempo de exposición al péptido, para conseguir niveles de resistencia comparables a los del fármaco convencional.

El estudio de la expresión diferencial del proteoma de *E. coli* y SARM permitió observar estrategias de resistencia al PAM P19 muy interesantes como: (I) la sobreexpresión de

proteínas de importadoras de nutrientes (Exp. 2); (II) sobreexpresión de proteínas involucradas en la reparación de ADN y proteínas involucradas en la síntesis de componentes de la membrana y pared celular (Exp. 3 y 6); y (III) sobreexpresión de reguladores de lisogenización.

Finalmente, se logró identificar tanto en *E. coli* como en SARM un posible mecanismo de acción del P19 a nivel celular, inhibiendo la proteína murG, la cual es una glucosiltransferasa bacteriana que se encuentra localizada en la membrana interna bacteriana, y está involucrada en la biosíntesis de péptidoglicano. Esta enzima está presente en todos los organismos que sintetizan peptidoglicano y es uno de los principales objetivos para el diseño de nuevos antibióticos. Sin embargo, estos resultados deben corroborarse por medio de técnicas moleculares complementarias.

Bibliografía

- Abdo, M.R. et al., 2007. Brucella suis histidinol dehydrogenase: Synthesis and inhibition studies of a series of substituted benzylic ketones derived from histidine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(13), pp.4427–4433.
- Aguilar-Barajas, E. et al., 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *BioMetals*, 24(4), pp.687–707.
- Ainsa, J. a., 2002. Stuart B. Levy: The antibiotic paradox. How the misuse of antibiotics destroys their curative powers, 2nd edn. *International Microbiology*, 5(3), pp.155–156.
- Aires De Sousa, M. & De Lencastre, H., 2004. Bridges from hospitals to the laboratory: Genetic portraits of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(2), pp.101–111.
- Al-Mebairik, N.F. et al., 2016. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Reviews in Medical Microbiology*, 27(2), pp.50–56.
- Alanis, A.J., 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), pp.697–705.
- Alvarez, C.A. et al., 2014. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish & shellfish immunology*, 41(1), pp.93–101.
- Álvarez de Felipe, A.I. & Pulido Duarte, M.M., 2008. Transportadores de tipo ABC: Consecuencias de su interacción con flavonoides. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(6), pp.295–311.
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E. & Ochoa-Zarzosa, A., 2013. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), pp.180–195.
- Anaya, P.A.F. et al., 2013. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del

- serotipo O157: H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Revista Lasallista de Investigación*, 10(1), pp.91–100.
- Anderson, J.M. & Shive, M.S., 2012. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp.72–82.
- Andreu, D. et al., 1995. *Formation of Disulfide Bonds in Synthetic Peptides and Proteins*, New Jersey: Humana Press.
- Andreu, D. & Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47(6), pp.415–33.
- Aoki, W., Kuroda, K. & Ueda, M., 2012. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), pp.365–370.
- Aoki, W. & Ueda, M., 2013. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(8), pp.1055–81.
- Aseev, L. V & Boni, I. V, 2011. Extraribosomal functions of bacterial ribosomal proteins. *Molecular biology*, 45(5), pp.805–816.
- Attia, A.S. et al., 2013. Analysis of the *Staphylococcus aureus* abscess proteome identifies antimicrobial host proteins and bacterial stress responses at the host-pathogen interface. *Pathogens and Disease*, 155(1), p.n/a-n/a.
- Bahar, A. & Ren, D., 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), pp.1543–1575.
- Bala, I., Hariharan, S. & Kumar, M.R., 2004. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art; *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(5), pp.387–422.
- Bals, R., Goldman, M.J. & Wilson, J.M., 1998. Mouse β -defensin 1 is a salt-sensitive

- antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infection and Immunity*, 66(3), pp.1225–1232.
- Baquero, F., Martínez, J.-L. & Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), pp.260–265.
- Barbosa, J.A.R.G. et al., 2002. Mechanism of action and NAD⁺-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), pp.1859–64.
- Barlos, K. et al., 2009. 2-Chlorotrityl chloride resin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37(6), pp.513–520.
- Bauer, P.R. & Sampathkumar, P., 2017. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in ICU. *Critical Care Medicine*, 45(8), pp.1413–1414.
- Bbosa, G.S. et al., 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 06(05), pp.410–425.
- Bentley, R., 2009. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(6), pp.775–786.
- Beranova-Giorgianni, S., 2003. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), pp.273–281.
- Berendonk, T.U. et al., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), pp.310–317.
- van den Berg, S. et al., 2011. A multiplex assay for the quantification of antibody responses in *Staphylococcus aureus* infections in mice. *Journal of Immunological Methods*, 365(1–2), pp.142–148.
- Bevers, L.E. et al., 2006. Tungsten transport protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*:

- The first member of a new class of tungstate and molybdate transporters. *Journal of Bacteriology*, 188(18), pp.6498–6505.
- Bheemidi, V.S., 2011. An Imperative Note on Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2(7), pp.1–5.
- Bien, J., Sokolova, O. & Bozko, P., 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens*, 2011, p.601905.
- Bivas-Benita, M. et al., 2004. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 58(1), pp.1–6.
- Black, R.E. et al., 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 375(9730), pp.1969–1987.
- Bonar, E., Wójcik, I. & Wladyka, B., 2015. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), pp.367–381.
- Bore, E. et al., 2007. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology*, 153(4), pp.935–946.
- Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E., 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, pp.1–9.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.
- Brandelli, A., 2012. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, pp.731–741.

- Brazas, M.D. & Hancock, R.E.W., 2005. Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug Discovery Today*, 10(18), pp.1245–1252.
- Brown, K., 2004. The history of penicillin from discovery to the drive to production. *Pharmaceutical historian*, 34(3), pp.37–43.
- Bupp, K. & van Heijenoort, J., 1993. The final step of peptidoglycan subunit assembly in *Escherichia coli* occurs in the cytoplasm. *Journal of Bacteriology*, 175(6), pp.1841–1843.
- Busl, K.M., 2017. Nosocomial Infections in the Neurointensive Care Unit. *Neurologic Clinics*, 35(4), pp.785–807.
- Cai, Y. et al., 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), pp.1607–1615.
- Calcagno, A.M. et al., 2007. ABC drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions. *Current drug delivery*, 4(4), pp.324–33.
- Campos, M. a et al., 2004. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infection and Immunity*, 72(12), pp.7107–7114.
- Carone, B.R. et al., 2014. High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mutation research*, 759, pp.1–8.
- CDC, C. for D.C. and P., 2013. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*, Tomado de <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Çetin, E. & Ang, Ö., 1962. Staphylococci Resistant to Methicillin (“Celbenin”). *British Medical Journal*, 2(5296), pp.51–52.

- Challapalli, K.K. et al., 2004. High reproducibility of large-gel two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(17), pp.3040–3047.
- Chao, T.-C. & Hansmeier, N., 2012. The current state of microbial proteomics: Where we are and where we want to go. *PROTEOMICS*, 12(4–5), pp.638–650.
- Charrier, C. et al., 2016. *In vitro* biological evaluation of novel broad-spectrum isothiazolone inhibitors of bacterial type II topoisomerases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10), pp.2831–2839.
- Choo, E.J., 2017. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections. *Infection & Chemotherapy*, 49(2), pp.158–159.
- Chopra, S. & Reader, J., 2015. tRNAs as antibiotic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), pp.321–349.
- CLSI, 2017. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 28th ed. CLSI, ed., Wayne, USA.
- Coates, A.R., Halls, G. & Hu, Y., 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163(1), pp.184–194.
- Cohen-Sela, E. et al., 2009. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of controlled release*, 133(2), pp.90–95.
- Cowan, S.T., 1954. A Review of Names for Coliform Organisms. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 4(2), pp.119–124.
- Creuzburg, K. & Schmidt, H., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their bacteriophages as a model for the analysis of virulence and stress response of a food-borne pathogen. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 120(7–8), pp.288–95.
- Croxen, M. a & Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology*, 8(1), pp.26–38.

- Croxen, M.A. et al., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), pp.822–880.
- Cruz, J. et al., 2017. 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*, 28(13), p.135102.
- Cruz, J. et al., 2014. Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), pp.2299–2321.
- Cruz, J. et al., 2013. Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* E. J. Toone, ed. *Biopolymers*, 101(4), pp.319–328.
- Dang, X.L. et al., 2009. Bactrocerin-1: A novel inducible antimicrobial peptide from pupae of oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis hendel*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 71(3), pp.117–129.
- Dave, K. a et al., 2011. 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), p.Unit 16.13.
- Davies, J. & Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp.417–433.
- Dean, S.N., Bishop, B.M. & van Hoek, M.L., 2011. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 11(1), p.114.
- DeLeo, F.R. et al., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 375(9725), pp.1557–1568.
- Diekema, D.J. et al., 1999. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region

- for the SENTRY Antimicrobial Surveillanc. *Clin Infect Dis*, 29(3), pp.595–607.
- Diep, B.A. et al., 2014. Identifying potential therapeutic targets of methicillin-resistant staphylococcus aureus through in vivo proteomic analysis. *Journal of Infectious Diseases*, 209(10), pp.1533–1541.
- Dubos, R.J., 1939a. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 70(1), pp.1–10.
- Dubos, R.J., 1939b. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. *The Journal of experimental medicine*, 70(1), pp.11–7.
- Efird, M.M. et al., 2005. Epidemiology of nosocomial infections in selected neonatal intensive care units in Colombia, South America. *Journal of perinatology*, 25(8), pp.531–536.
- Eguchi, Y. et al., 2007. B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), pp.18712–18717.
- Eichhorn, E., Ploeg, J.A.N.R.V.A.N.D.E.R. & Leisinger, T., 2000. Deletion Analysis of the *Escherichia coli* Taurine and Alkanesulfonate Transport Systems. , 182(10), pp.2687–2695.
- Elsabahy, M. & Wooley, K.L., 2012. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 41(7), p.2545.
- Van Epps, H.L., 2006. René Dubos: unearthing antibiotics. *The Journal of experimental medicine*, 203(2), p.259.
- Escherich, T., 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschritte der Medizin*, 3, pp.515–522.

- Espinel-ingroff, A., 2004. *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*,
- Ethelberg, S. et al., 2004. Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 10(5), pp.842–847.
- Fields, G.B. & Noble, R.L., 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 35(3), pp.161–214.
- Fischer, A. et al., 2011. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), pp.1696–1711.
- Fleitas, O. & Franco, O.L., 2016. Induced Bacterial Cross-Resistance toward Host Antimicrobial Peptides: A Worrying Phenomenon. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp.1–5.
- Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), p.226.236.
- Forsyth, R.A. et al., 2002. A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 43(6), pp.1387–1400.
- Foster, J.W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11), pp.898–907.
- Di Francesco, A., Favaroni, A. & Donati, M., 2013. Host defense peptides: general overview and an update on their activity against *Chlamydia* spp. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(11), pp.1215–24.
- Furuya, E.Y. & Lowy, F.D., 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews. Microbiology*, 4(1), pp.36–45.

- Gänzle, M.G., Hertel, C. & Hammes, W.P., 1999. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *International Journal of Food Microbiology*, 48(1), pp.37–50.
- Garrett, T.A., Kadmas, J.L. & Raetz, C.R.H., 1997. Identification of the Gene Encoding the *Escherichia coli* Lipid A 4⁻Kinase. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), pp.21855–21864.
- Garrett, T.A., Que, N.L.S. & Raetz, C.R.H., 1998. Inactivation of the LPXK gene in *Escherichia coli* leads to loss of lipid a 4['] kinase activity and accumulation of an intermediate lacking the 4[']-phosphate. *Faseb Journal*, 12(8), pp.A1286–A1286.
- Gause, G.F. & Brazhnikova, M., 1944. Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature*, 154, pp.703–703.
- Gavrilov, K. & Saltzman, W.M., 2012. Therapeutic siRNA: Principles, challenges, and strategies. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(2), pp.187–200.
- Gibaldi, M. & Feldman, S., 1967. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(10), pp.1238–1242.
- Gómez-Duarte, O.G. et al., 2010. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne pathogens and disease*, 7(2), pp.199–206.
- Gómez-Duarte, O.G., 2014. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Rev Chilena Infectol*, 31(5), pp.577–586.
- Gómez-Sequeda, N.S., Torres, R. & Ortiz López, C.C., 2017. Synthesis, characterization, and in vitro activity against *Candida* spp. of fluconazole encapsulated on cationic and conventional nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid). *Nanotechnology, Science and Applications*, Volume 10, pp.95–104.
- Gordon, Y.J., Romanowski, E.G. & McDermott, A.M., 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current eye*

- research*, 30(7), pp.505–515.
- Görg, A., Postel, W. & Günther, S., 1988a. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9, pp.531–546.
- Görg, A., Postel, W. & Günther, S., 1988b. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9(9), pp.531–546.
- Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), pp.3665–3685.
- Grass, G., 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: All has not been said and done. *BioMetals*, 19(2), pp.159–172.
- Grayson, S.M. & Fréchet, J.M.J., 2001. Convergent dendrons and dendrimers: From synthesis to applications. *Chemical Reviews*, 101(12), pp.3819–3867.
- Greenfield, N.J., 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), pp.2876–2890.
- Gref, R. et al., 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(January), pp.1600–16003.
- Grinter, R. et al., 2016. Structure of the bacterial plant-ferredoxin receptor FusA. *Nature Communications*, 7, p.13308.
- Gruenheid, S. & Moual, H., 2012. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 330(2), pp.81–89.
- Grundmann, H. et al., 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*, 368(9538), pp.874–885.
- Gullberg, E. et al., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations M. Lipsitch, ed. *PLoS Pathogens*, 7(7), p.e1002158.
- Guy, C.A. & Fields, G.B., 1997. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. *Methods in enzymology*,

289, pp.67–83.

Habets, M.G.J.L. & Brockhurst, M.A., 2012. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biology Letters*, 8(3), pp.416–418.

Haney, E.F. et al., 2012. Influence of specific amino acid side-chains on the antimicrobial activity and structure of bovine lactoferrampin. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(3), pp.362–377.

Harold, F.M., 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *American Society for Microbiology*, 36(2), pp.172–230.

Hayes, C.S. et al., 2014. Mechanisms and Biological Roles of Contact-Dependent Growth Inhibition Systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(2), pp.a010025–a010025.

He, C. et al., 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), pp.3657–3666.

Hegde, S.P. et al., 1996. Interactions of RecF protein with RecO, RecR, and single-stranded DNA binding proteins reveal roles for the RecF-RecO-RecR complex in DNA repair and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, pp.14468–14473.

Helmerhorst, E.J. et al., 1999. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2–3), pp.105–110.

Hochstadt-Ozer, J., 1972. The Regulation of Purine Utilization in Bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 247(8), pp.2419–2426.

Hoelzer, K. et al., 2017. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Research*, 13(1), pp.1–38.

Hof, W. van t et al., 2001. Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Biological Chemistry*, 382(4), pp.597–619.

- Hollenstein, K., Frei, D.C. & Locher, K.P., 2007. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, 446(7132), pp.213–216.
- Huang, M., Khor, E. & Lim, L.-Y., 2004. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21(2), pp.344–53.
- Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y., 2010. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*, 1(2), pp.143–152.
- Hwang, J. & Inouye, M., 2010. Interaction of an essential *Escherichia coli* GTPase, Der, with the 50S Ribosome via the KH-like domain. *Journal of Bacteriology*, 192(8), pp.2277–2283.
- Hwang, J. & Inouye, M., 2006. The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 61(6), pp.1660–1672.
- Hwang, P.M. & Vogel, H.J., 1998. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 76(2–3), pp.235–46.
- Ibba, M. & Söll, D., 2000. Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), pp.617–650.
- Jean-François, F. et al., 2008. Pore Formation Induced by an Antimicrobial Peptide: Electrostatic Effects. *Biophys J*, 95(12), pp.5748–5756.
- Jenkins, D.R., 2017. Nosocomial infections and infection control. *Medicine (United Kingdom)*, 45(10), pp.629–633.
- Jenssen, H. & Aspmo, S.I., 2008. Serum Stability of Peptides. In L. Otvos, ed. *Methods in Molecular Biology*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 177–186.
- Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E.W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical*

Microbiology Reviews, 19(3), pp.491–511.

Jerse, a E. et al., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(20), pp.7839–7843.

Jiang, Z. et al., 2008. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), pp.369–383.

Jin, S., Leach, J.C. & Ye, K., 2009. Nanoparticle-mediated gene delivery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 544, pp.547–57.

Jofré, C. et al., 2011. A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32(5), pp.852–858.

Joseph, P. et al., 2007. Targeting of the *Brucella suis* virulence factor histidinol dehydrogenase by histidinol analogues results in inhibition of intramacrophagic multiplication of the pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), pp.3752–3755.

Jungblut, P.R. et al., 2008. The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal*, 2(1), p.16.

Kammler, M., Schön, C. & Hantke, K., 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(19), pp.6212–6219.

Kang, S.-J. et al., 2014. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(12), pp.1477–1486.

Kaper, J.B., 1998. The Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H7 and Other Attaching and Effacing *E. coli*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 51(Supplement1),

pp.S101–S107.

- Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp.123–140.
- Karmali, M.A., Gannon, V. & Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), pp.360–370.
- Keller, B.O. & Li, L., 2000. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(1), pp.88–93.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2), pp.119–139.
- Kerr, I.D., Reynolds, E.D. & Cove, J.H., 2005. ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochemical Society transactions*, 33, pp.1000–2.
- Keyes, K., Lee, M.D. & Maurer, J.J., 2008. Antibiotics: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Transfer. In *Microbial Food Safety in Animal Agriculture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, pp. 45–56.
- Khan, H.A., Baig, F.K. & Mehboob, R., 2017. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), pp.478–482.
- Khayata, N. et al., 2012. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), pp.419–427.
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K., 2001. Revisiting the Lysogenization Control of Bacteriophage λ . *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), pp.13695–13700.
- Kohane, D.S., 2007. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), pp.203–209.

- König, W. & Geiger, R., 1970. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chemische Berichte*, 103(3), pp.788–798.
- Kosikowska, P. & Lesner, A., 2016. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 3776(April), pp.1–14.
- Kulis-Horn, R.K., Persicke, M. & Kalinowski, J., 2014. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnology*, 7(1), pp.5–25.
- Kurlenda, J. & Grinholc, M., 2012. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta biochimica Polonica*, 59(2), pp.171–84.
- Linders, S., Fallet, C. & Franco-Lara, E., 2009. Proteome analysis of the *Escherichia coli* heat shock response under steady-state conditions. *Proteome Science*, 7, p.36.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Langer, R. & Folkman, J., 1976. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, 263, pp.797–800.
- Lau, C.K.Y. et al., 2013. Solution structure of *Escherichia coli* feoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *Journal of Bacteriology*, 195(1), pp.46–55.
- Lehrer, R.I. & Ganz, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*, 11(1), pp.23–27.
- Leng, B.-F. et al., 2011. Allicin Reduces the Production of α -Toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 16(12), pp.7958–7968.
- Leonard, A.F.C. et al., 2015. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environment International*, 82, pp.92–100.
- Li, H. et al., 2015. Outer membrane proteomics of kanamycin-resistant *Escherichia coli*

- identified MipA as a novel antibiotic resistance-related protein. *FEMS Microbiology Letters*, 362(11), pp.fnv074-fnv074.
- Li, Y. et al., 2017. Fabrication of antimicrobial peptide-loaded PLGA/Chitosan composite microspheres for long-Acting bacterial resistance. *Molecules*, 22(10).
- Liedert, C. et al., 2010. Two-dimensional proteome reference map for the radiation-resistant bacterium *Deinococcus geothermalis*. *Proteomics*, 10(3), pp.555–563.
- Lin, X. et al., 2008. Proteomic Analysis of Nalidixic Acid Resistance in *Escherichia coli*: Identification and Functional Characterization of OM Proteins research articles. , pp.2399–2405.
- Linton, K.J. & Higgins, C.F., 1998. MicroGenomics The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. , 28, pp.5–13.
- Liu, L. et al., 2015. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, 385(9966), pp.430–440.
- Loeffler, J.M. et al., 2001. Rapid Killing of *Streptococcus pneumoniae* with a Bacteriophage Cell Wall Hydrolase. *Science*, 294(5549), pp.2170–2172.
- Lowy, F., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), pp.1265–1273.
- Maciąg-Dorszyńska, M. et al., 2012. Mutations in central carbon metabolism genes suppress defects in nucleoid position and cell division of replication mutants in *Escherichia coli*. *Gene*, 503(1), pp.31–35.
- Mahlapuu, M. et al., 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(December), pp.1–12.
- Mahmood, K. et al., 2010. Incidence of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Causing Nosocomial Infection in a Tertiary Care Hospital. , 16(2), pp.91–

96.

- Makadia, H. & Siegel, S., 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), pp.1377–1397.
- Makdessi, K., Andreesen, J.R. & Pich, A., 2001. Tungstate Uptake by a Highly Specific ABC Transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), pp.24557–24564.
- Malvern Panalytical, 2005. Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations With Supplier Data by Malvern. *The A to Z of Nanotechnology*, pp.1–16.
- Maróti, G. et al., 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162(4), pp.363–374.
- Marr, A.K., Gooderham, W.J. & Hancock, R.E., 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), pp.468–472.
- Martín, I., Teixidó, M. & Giralt, E., 2011. Design, Synthesis and Characterization of a New Anionic Cell-Penetrating Peptide: SAP(E). *ChemBioChem*, 12(6), pp.896–903.
- Mathiowitz, E. et al., 1997. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature*, 386(6623), pp.410–414.
- Máttar, S., Mora, A. & Bernal, N., 1997. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in a pediatric population in Bogotá, D.C. with acute gastroenteritis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 15(7), pp.364–8.
- Mehla, J. & Sood, S.K., 2011. Substantiation in *Enterococcus faecalis* of Dose-Dependent Resistance and Cross-Resistance to Pore-Forming Antimicrobial Peptides by Use of a Polydiacetylene-Based Colorimetric Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), pp.786–793.
- Messer, W., 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial

- mode to initiate DNA replication. *Federation of European Microbiological Societies*, 26(4), pp.355–374.
- Miller, C., 1947. Development of bacterial resistance to antibiotics. *Journal of the American Medical Association*, 135(12), p.749.
- Millner, P.A., 1995. Peptide synthesis protocols: Methods in molecular biology volume 35. *Biochemical Education*, 23(2), p.116.
- Moghaddam, M.M. et al., 2015. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 26(3), pp.98–110.
- Mohamed, F. & Van Der Walle, C.F., 2008. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), pp.71–87.
- Mohammadi, T. et al., 2007. The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 65(4), pp.1106–1121.
- Murray, H. & Errington, J., 2008. Dynamic Control of the DNA Replication Initiation Protein DnaA by Soj/ParA. *Cell*, 135(1), pp.74–84.
- Nakatsuji, T. & Gallo, R.L., 2012. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 2), pp.887–95.
- Neupane, M. et al., 2011. Shiga toxin 2 overexpression in *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with severe human disease. *Microbial Pathogenesis*, 51(6), pp.466–470.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. & Vogel, H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), pp.464–472.

- Nizet, V. & Cole, J.N., 2016. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. *Microbiology Spectrum*, 4(1), pp.1–22.
- Nuri, R., Shprung, T. & Shai, Y., 2015. Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(11), pp.3089–3100.
- O'Farrel, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), pp.4007–4021.
- Ogston, a, 1882. Micrococcus Poisoning. *Journal of anatomy and physiology*, 17(Pt 1), pp.24–58.
- Ogston, A., 1881. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *British medical journal*, 1(1054), pp.369–375.
- Otrelo-Cardoso, A.R. et al., 2017. Highly selective tungstate transporter protein TupA from *Desulfovibrio alaskensis* G20. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–12.
- Otto, A. et al., 2014. The *Staphylococcus aureus* proteome. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), pp.110–120.
- Ouhara, K. et al., 2008. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), pp.1266–1269.
- Paganini, M.H. et al., 2009. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. *Revista chilena de infectología*, 26(5), pp.406–412.
- Pandey, B.K. et al., 2011. Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *The Biochemical journal*, 436(3), pp.609–20.
- Pandey, R. et al., 2005. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 301(1–2),

pp.268–276.

- Pankey, G.A. & Sabath, L.D., 2004. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), pp.864–870.
- Panyam, J. et al., 2004. Solid- state Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs from PLGA/PLA Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(7), pp.1804–1814.
- Paredes, D., Ortiz, C. & Torres, R., 2014. 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*, 9, pp.1717–29.
- Parua, P.K., Mondal, A. & Parrack, P., 2010. HflD, an *Escherichia coli* protein involved in the lambda lysis-lysogeny switch, impairs transcription activation by lambdaCII. *Archives of biochemistry and biophysics*, 493(2), pp.175–83.
- Peña-Velázquez, A., Márquez-Alonso, A. & Ruiz-Mármol, C., 2017. *FARMACOLOGÍA*, Habana, Cuba: UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS “MANUEL FAJARDO.”
- Peng, X. et al., 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J. Proteome Res*, pp.2257–2265.
- Pennington, T.H., 2000. VTEC: lessons learned from British outbreaks. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, (29), p.90S–98S.
- Pérez-Llarena, F.J. & Bou, G., 2016. Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp.1–21.
- Perkins, D.N. et al., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, pp.3551–

3567.

- Perron, G.G., Zasloff, M. & Bell, G., 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1583), pp.251–256.
- Peschel, A. & Sahl, H.G., 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4(7), pp.529–536.
- Phillips, I. et al., 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), pp.28–52.
- Piedrahita, D., Márquez, T. & Máttar, S., 2001. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. *Revista MVZ Córdoba*, 6(2), pp.119–126.
- Powers, J.P.S. & Hancock, R.E.W., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), pp.1681–1691.
- Pridgeon, J.W., Mu, X. & Klesius, P.H., 2013. Biochemical and molecular characterization of the novobiocin and rifampicin resistant *Aeromonas hydrophila* vaccine strain AL09-71N+R compared to its virulent parent strain AL09-71. *Veterinary Microbiology*, 165(3–4), pp.349–357.
- Radhouani, H. et al., 2012. After genomics, what proteomics tools could help us understand the antimicrobial resistance of *Escherichia coli*? *Journal of Proteomics*, 75(10), pp.2773–2789.
- Radovic-Moreno, A.F. et al., 2012. Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall-Targeted Delivery of Antibiotics. *ACS Nano*, 6(5), pp.4279–4287.
- Raetz, C.R.H. et al., 2007. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp.295–329.

- Raibaud, S. et al., 2003. How bacterial ribosomal protein L20 assembles with 23 S ribosomal RNA and its own messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp.36522–36530.
- Rech, S., Wolin, C. & Gunsalus, R.P., 1996. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), pp.2557–2562.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D. & Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), pp.536–547.
- Renzone, G. et al., 2005. Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 41(4), pp.459–468.
- Rivera, P.A. et al., 2004. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *Journal of microencapsulation*, 21(2), pp.203–211.
- Rivera, Z. et al., 2002. Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental Aotus monkey model. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, 59(2), pp.62–70.
- Rogowska-Wrzesinska, A. et al., 2013. 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of Proteomics*, 88, pp.4–13.
- Ron-Doitch, S. et al., 2016. Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV. *Journal of Controlled Release*, 229, pp.163–171.
- Rondon-Villarreal, P., Sierra, D.A. & Torres, R., 2014. Classification of Antimicrobial Peptides by Using the p-spectrum Kernel and Support Vector Machines. In L. F. Castillo et al., eds. *Advances in Intelligent Systems and Computing*. Advances in Intelligent Systems and Computing. Cham: Springer International Publishing, pp. 155–160.
- Rosenbach, F.I., 1884. *Mikroorganismen bei den Wund-Infektions- Krankheiten des*

Menschen, J. F. Bergmann.

- Rosi-Marshall, E.J. & Kelly, J.J., 2015. Antibiotic stewardship should consider environmental fate of antibiotics. *Environmental Science and Technology*, 49(9), pp.5257–5258.
- Rotilio, D. et al., 2012. Proteomics: Bases for protein complexity understanding. *Thrombosis Research*, 129(3), pp.257–262.
- Rozenbaum, R. et al., 2009. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(8), pp.756–760.
- Ruszkowski, M. & Dauter, Z., 2017. Structures of *Medicago truncatula* L-Histidinol Dehydrogenase Show Rearrangements Required for NAD⁺ Binding and the Cofactor Positioned to Accept a Hydride. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–13.
- Ryu, S. et al., 2014. Colonization and Infection of the Skin by *S. aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), pp.8753–8772.
- Sahoo, S.K., Ma, W. & Labhasetwar, V., 2004. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 112(2), pp.335–340.
- Sakoulas, G. et al., 2014. Human cathelicidin LL-37 Resistance and increased daptomycin MIC in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA600 (ST45) are associated with increased mortality in a hospital setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), pp.2172–2174.
- Salayers, A. & Whitt, D., 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. *Bacterial Pathogenesis*, 11(1), pp.407–421.
- Samuelson, Ø. et al., 2005. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*, 579(16), pp.3421–3426.

- Shalini, S. et al., 2015. Impact and effect of nosocomial infections: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), pp.947–951.
- Shi, I.Y. & Kuzminov, A., 2005. A Defect in the Acetyl Coenzyme A7Acetate Pathway Poisons Recombinational Repair-Deficient Mutants of. *Journal of Bacteriology*, 187(4), pp.1266–1275.
- Shippy, D.C. & Fadl, A.A., 2014. Bacterial tRNA modification enzymes: Potential role in biology and virulence. *European Journal of Physical and Health Education*, 6(2), pp.5–6.
- Shireen, T. et al., 2013. Differential Adaptive Responses of *Staphylococcus aureus* to In Vitro Selection with Different Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), pp.5134–5137.
- Sianglum, W. et al., 2012. Transcriptome Analysis of Responses to Rhodomycinone in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 7(9), pp.1–7.
- Silbergeld, E.K., Graham, J. & Price, L.B., 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual review of public health*, 29, pp.151–69.
- Smith, R. a, M'ikanatha, N.M. & Read, A.F., 2014. Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health communication*, 0236(August), pp.1–6.
- Sohani, O.R., Gaikwad, U.B. & Chaudhari, P.D., 2013. Nanoencapsulation system for delivery of protein and peptide-A review. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 2(2), pp.58–64.
- Sosa Ávila, L.M. et al., 2010. Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilino resistente en niños en Bucaramanga Colombia. *Salud UIS*, 42(3), pp.248–255.
- Spellberg, B. et al., 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin.Infect.Dis.*, 46(1537–6591 (Electronic)), pp.155–164.

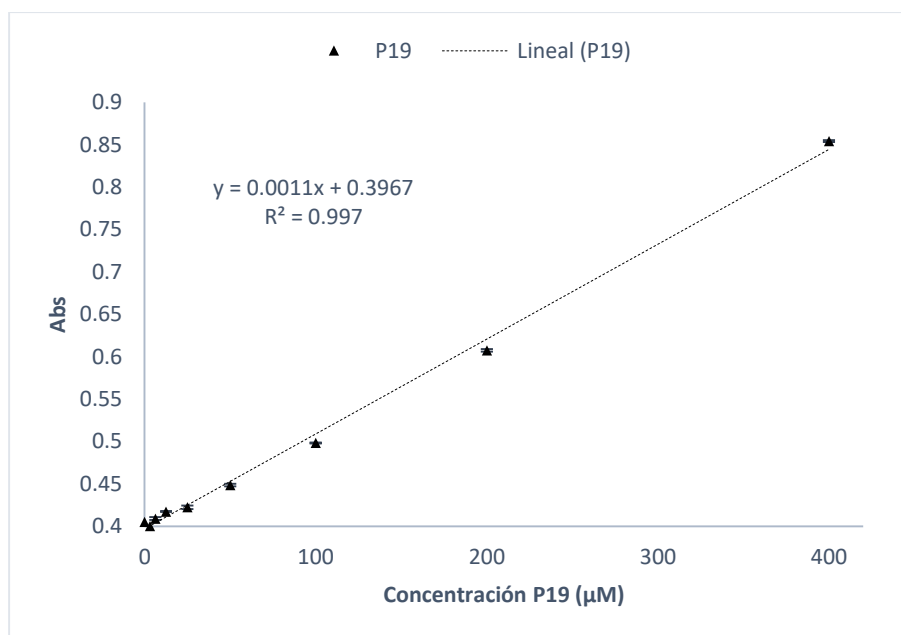
- Standing, K.G., 2003. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), pp.595–601.
- Steckbeck, J.D., Deslouches, B. & Montelaro, R.C., 2014. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert opinion on biological therapy*, 14(1), pp.11–4.
- Stoll, S., 2013. The Importance of Zeta Potential Measurements & Role of Ionic Strength in Flocculation Processes. *Water and Technology*, 4(1), pp.1–5.
- Su, H.-C. et al., 2014. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environmental science. Processes & impacts*, 16(2), pp.324–32.
- Sun, Z. et al., 2009. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), pp.1964–1973.
- Susnea, I. et al., 2012. Application of MALDI-TOF-Mass Spectrometry to Proteome Analysis Using Stain-Free Gel Electrophoresis. In *TripleC*. pp. 37–54.
- Szczepanowski, R. et al., 2004. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*, 150(11), pp.3613–3630.
- Tamargo, J., Le Heuzey, J.Y. & Mabo, P., 2015. Narrow therapeutic index drugs: A clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(5), pp.549–567.
- Tarr, P.I., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365, pp.1073–1084.
- Thevissen, K. et al., 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, 12(21–22), pp.966–971.
- Thomasin, C. et al., 1996. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing

- poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *Journal of Controlled Release*, 41(1–2), pp.131–145.
- Tomazella, G.G. et al., 2012. Proteomic analysis of a multi-resistant clinical *Escherichia coli* isolate of unknown genomic background. *Journal of Proteomics*, 75(6), pp.1830–1837.
- Ulvatne, H., 2002. Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), pp.461–467.
- Umamaheshwari, R.B. & Jain, N.K., 2003. Receptor Mediated Targeting of Lectin Conjugated Gliadin Nanoparticles in the Treatment of *Helicobacter pylori*. *Journal of Drug Targeting*, 11(7), pp.415–424.
- Umezumi, K., Chi, N.W. & Kolodner, R.D., 1993. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), pp.3875–9.
- Valéria dos Santos, K. et al., 2010. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Research in Microbiology*, 161(4), pp.268–275.
- Vanbelkum, A. et al., 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(1), pp.32–47.
- Verma, R.K. & Garg, S., 2001. Drug Delivery Technologies and Future Directions. *Pharmaceutical Technology*, 25(2), pp.1–14.
- Vij, N. et al., 2010. Development of PEGylated PLGA nanoparticle for controlled and sustained drug delivery in cystic fibrosis. *Journal of nanobiotechnology*, 8, pp.1–18.
- Wallace, W.C. et al., 2000. New epidemiology for postoperative nosocomial infections. *The American surgeon*, 66(9), pp.874–8.

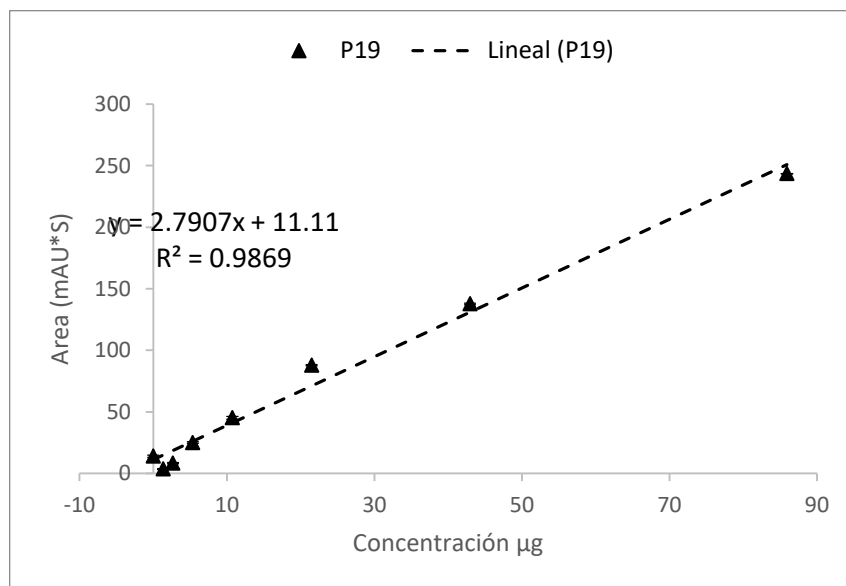
- Van Der Walle, C., 2011. *Peptide and Protein Delivery*,
- Wang, Z. et al., 2017. Deadly Sins of Antibiotic Abuse in China. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 38(06), pp.758–759.
- Water, J.J. et al., 2015. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92(February), pp.65–73.
- Weichhart, T. et al., 2003. Functional Selection of Vaccine Candidate Peptides from. *Infection and Immunity*, 71(8), pp.4633–4641.
- Weiner, J.H. & Li, L., 2008. Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), pp.1698–1713.
- Weiner, L.M. et al., 2016. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 37(11), pp.1288–1301.
- Wenzel, M. et al., 2014. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), pp.E1409-18.
- Winterberg, K.M. et al., 2005. Phenotypic screening of *Escherichia coli* K-12 Tn5 insertion libraries, using whole-genome oligonucleotide microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp.451–459.
- Xie, S. et al., 2014. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *Journal of Controlled Release*, 187, pp.101–117.
- Xu, C. et al., 2006. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics*, 6(2), pp.462–473.
- Yeaman, M.R. & Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and

- resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), pp.27–55.
- Yin Win, K. & Feng, S.-S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), pp.2713–2722.
- Zaffiri, L., Gardner, J. & Toledo-Pereyra, L.H., 2012. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 25(2), pp.67–77.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(0028–0836 (Print)), pp.389–395.
- Zhang, L. et al., 2008. Nanoparticles in Medicine : Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(5), pp.761–769.
- Zhang, L. & Granick, S., 2006. How to stabilize phospholipid liposomes (Using nanoparticles). *Nano Letters*, 6(4), pp.694–698.
- Zhang, L., Rozek, a & Hancock, R.E., 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), pp.35714–35722.
- Zhu, M., Dai, X. & Wang, Y.-P., 2016. Real time determination of bacterial in vivo ribosome translation elongation speed based on LacZ α complementation system. *Nucleic Acids Research*, 44(20), p.gkw698.
- Ziebandt, A.-K. et al., 2010. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *PROTEOMICS*, 10(8), pp.1634–1644.
- Zoja, C., Buelli, S. & Morigi, M., 2010. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatric Nephrology*, 25(11), pp.2231–2240.

Anexos

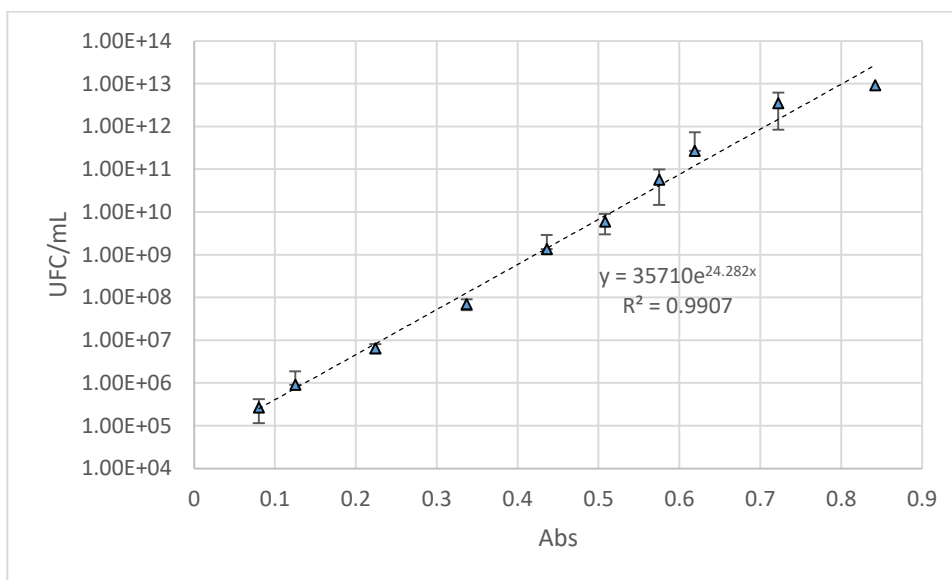


Anexo 1 Curva de Calibración del PAM P19 en agua por UV-VIS, las medidas se realizaron a $\lambda=260\text{nm}$.



Anexo 2 Curva de Calibración del PAM P19 en agua por HPLC, las medidas se realizaron a $\lambda=260\text{nm}$.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



Anexo 3 Curva de calibración de las CFU Vs Absorbancia.

Anexo 4 Valores de absorbancia obtenidos en el perfil de liberación in vitro Figura 18.

Tiempo (m)	Área Promedio (n=3)	Desv.	%liberación	desv. %
1	2.896	0.961	10.604	3.518
10	10.213	0.090	37.388	0.330
20	14.043	0.519	51.408	1.899
60	12.393	1.536	45.366	5.622
120	14.566	0.760	53.320	2.782
240	15.215	1.301	55.698	4.763
480	15.986	1.841	58.519	6.739
720	19.896	1.756	72.831	6.429
1440	22.723	2.293	83.183	8.395
2880	26.071	0.404	95.438	1.481

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

Anexo 5 Resumen general de los spots encontrados en los diferentes experimentos, los gels con coeficientes de correlación de 1,000 corresponden a los gels de referencia utilizados para construir los master gel de cada experimento.

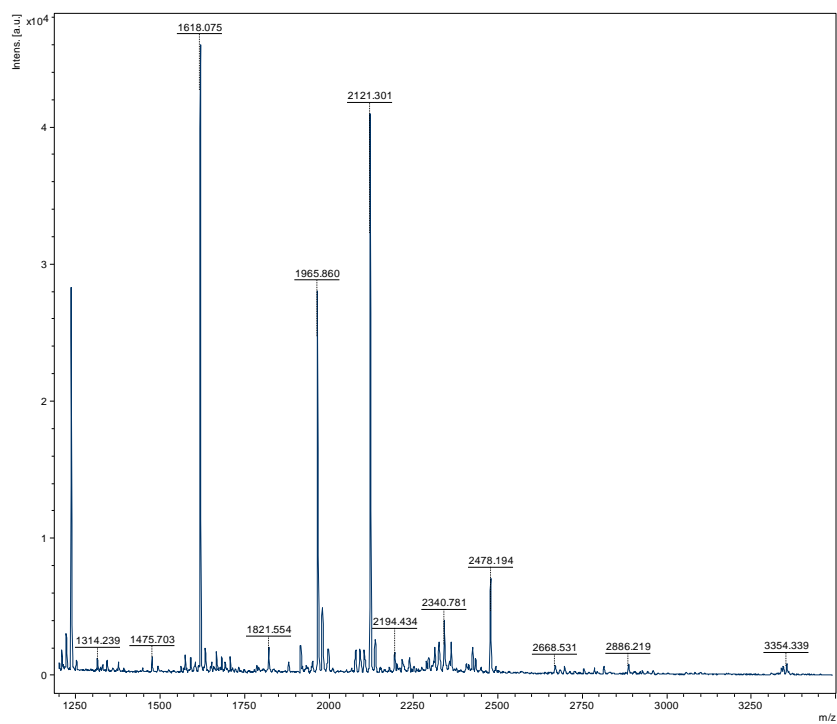
Microorganismo	# Exp.	Grupo	Nombre del Gel	Spots	Matched	% Match 1 ^a	% Match 2 ^b	Coef. Corr.
<i>E. coli</i> O157H7	1	Control ⁽¹⁾	C1-1*	475	475	100	100	1,000
			C2-1	410	200	49	42	0,630
			C3-1	409	249	61	52	0,695
		Tratamiento ⁽²⁾	T1-1	250	225	90	47	0,663
			T2-1	184	182	99	38	0,606
			T3-1	180	178	99	37	0,601
	2	Sensible ⁽³⁾	C1-2*	280	280	100	100	1,000
			C2-2	252	176	70	63	0,761
			C2-2	239	151	63	54	0,705
		Resistente ⁽⁴⁾	R1-2	110	105	95	38	0,601
			R2-2	109	108	99	39	0,608
			R3-2	115	111	97	40	0,615
	3	NP ⁽⁵⁾	C1-3	600	333	56	55	0,709
			C2-3	625	367	59	60	0,745
			C3-3	778	325	42	53	0,701
		NPP19 ⁽⁶⁾	N1-3*	609	609	100	100	1,000
			N2-3	728	335	46	55	0,712
			N3-3	691	322	47	53	0,698
SARM	4	Control ⁽¹⁾	C1-4	123	118	96	40	0,616
			C2-4	118	112	95	38	0,603
			C3-4	116	115	99	39	0,610
		Tratamiento ⁽²⁾	T1-4	255	212	83	72	0,816
			T2-4*	296	296	100	100	1,000
			T3-4	153	151	99	51	0,686
	5	Sensible ⁽³⁾	C1-5	144	139	97	56	0,718
			C2-5	151	135	89	54	0,708

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO

6	Resistente ⁽⁴⁾	C3-5	162	131	81	53	0,698
		R1-5	214	158	74	64	0,766
		R2-5*	248	248	100	100	1,000
		R3-5	234	136	58	55	0,710
	NP ⁽⁵⁾	C1-6*	236	236	100	100	1,000
		C2-6	169	93	55	39	0,613
		C3-6	224	212	95	90	0,931
	NPP19 ⁽⁶⁾	N1-6	216	112	52	47	0,664
		N2-6	130	104	80	44	0,643
		N3-6	222	124	56	53	0,696

(1) Bacteria en ausencia de P19; (2) Bacteria expuesta a P19 por 2 horas; (3) Bacteria sensible a P19; (4) Bacteria resistente a P19 producto de selección artificial; (5) Bacteria expuesta a nanopartículas vacías; (6) Bacteria expuesta a nanopartículas cargadas con P19; (*) Gel de referencia utilizado para construir el master gel; (a) Match de los spots del gel incluidos en el Master; (b) Match de los spots del gel vs los spots totales del master.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



Anexo 6 Espectro de masas de uno de los spots de interés del experimento 1.

4/12/2017

Concise Summary Report (../data/20171204/FTmtOeHth.dat)

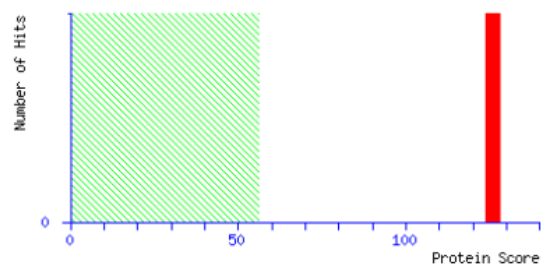


Mascot Search Results

User : Nicolas Gomez
 Email : nicosebasemi@gmail.com
 Search title :
 Database : SwissProt 2017_11 (556196 sequences; 199341870 residues)
 Taxonomy : Escherichia coli (23031 sequences)
 Timestamp : 4 Dec 2017 at 05:39:00 GMT
 Top Score : 126 for [GLTI_ECOLI](#), Glutamate/aspartate import solute-binding protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glTI PE=1 SV=2

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
 Significance threshold $p <$ Max. number of hits
 Preferred taxonomy

- [GLTI_ECOLI](#) Mass: 33513 Score: **126** Expect: 5.8e-09 Matches: 9
 Glutamate/aspartate import solute-binding protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glTI PE=1 SV=2
[YJIQ_ECOLI](#) Mass: 21869 Score: 29 Expect: 29 Matches: 3
 Putative inactive recombination-promoting nuclease-like protein YjiQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjiQ PE=5 SV=1
[GPMA_ECO24](#) Mass: 28571 Score: 27 Expect: 47 Matches: 3
 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=gpmA PE=3 SV=1

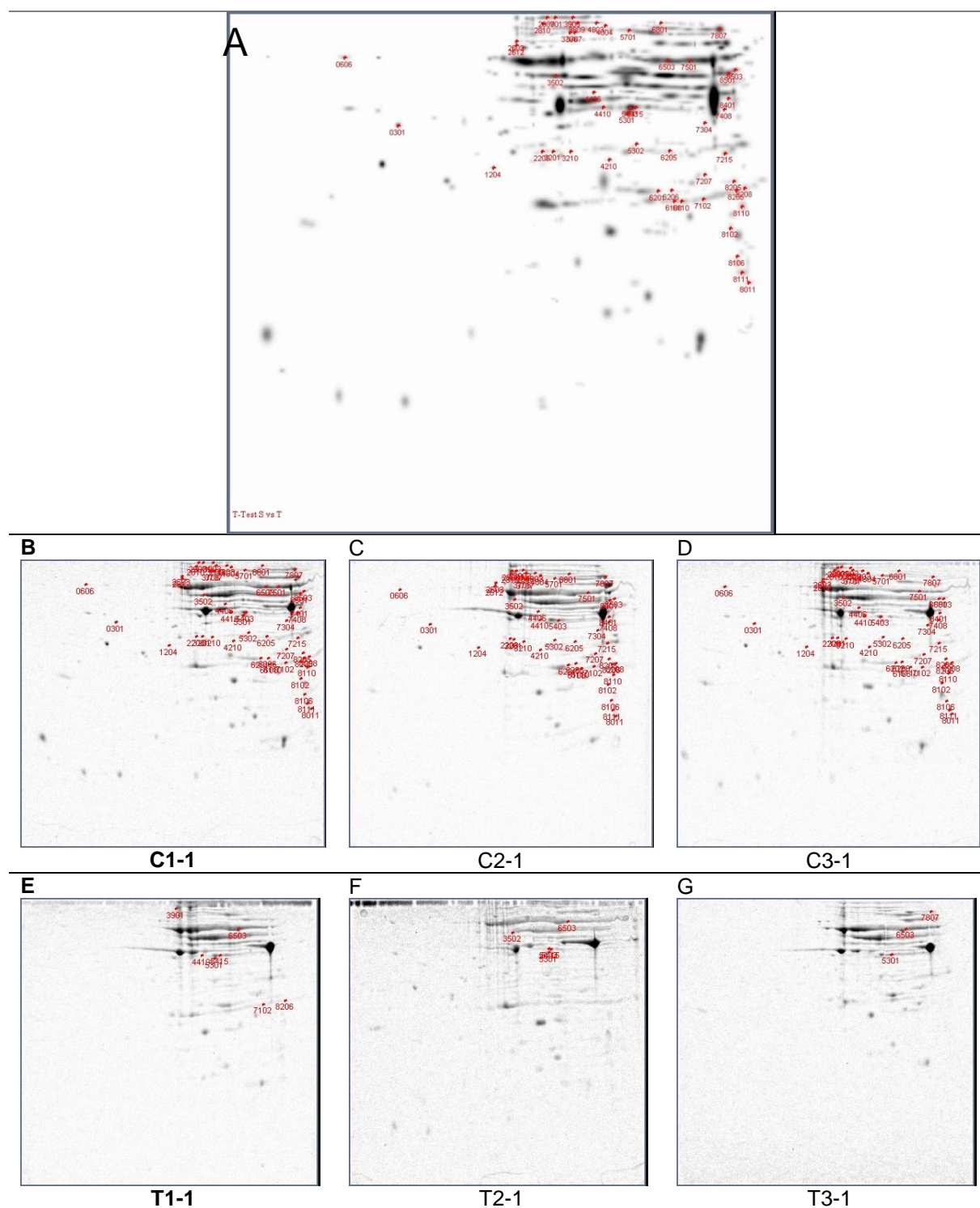
Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin
 Fixed modifications : [Carbamidomethyl \(C\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.75 Da
 Peptide Charge State : 1+
 Max Missed Cleavages : 2
 Number of queries : 9

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

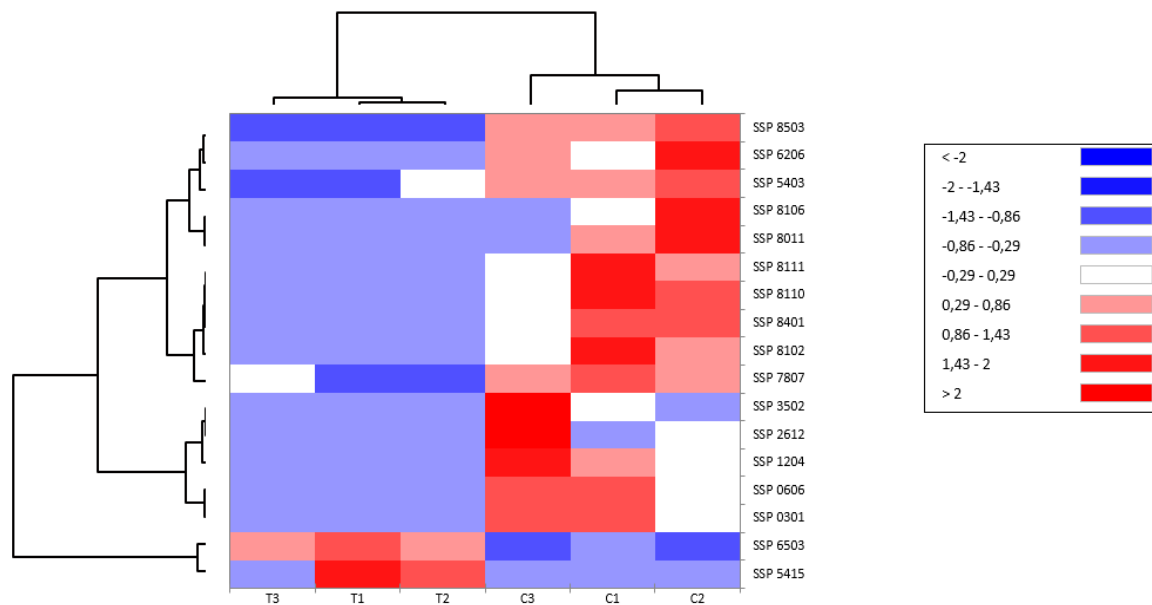
Anexo 7 Informe de Mascot, de la búsqueda por huella peptídica, puntajes superiores a 56 son considerados significativos ($p < 0.05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



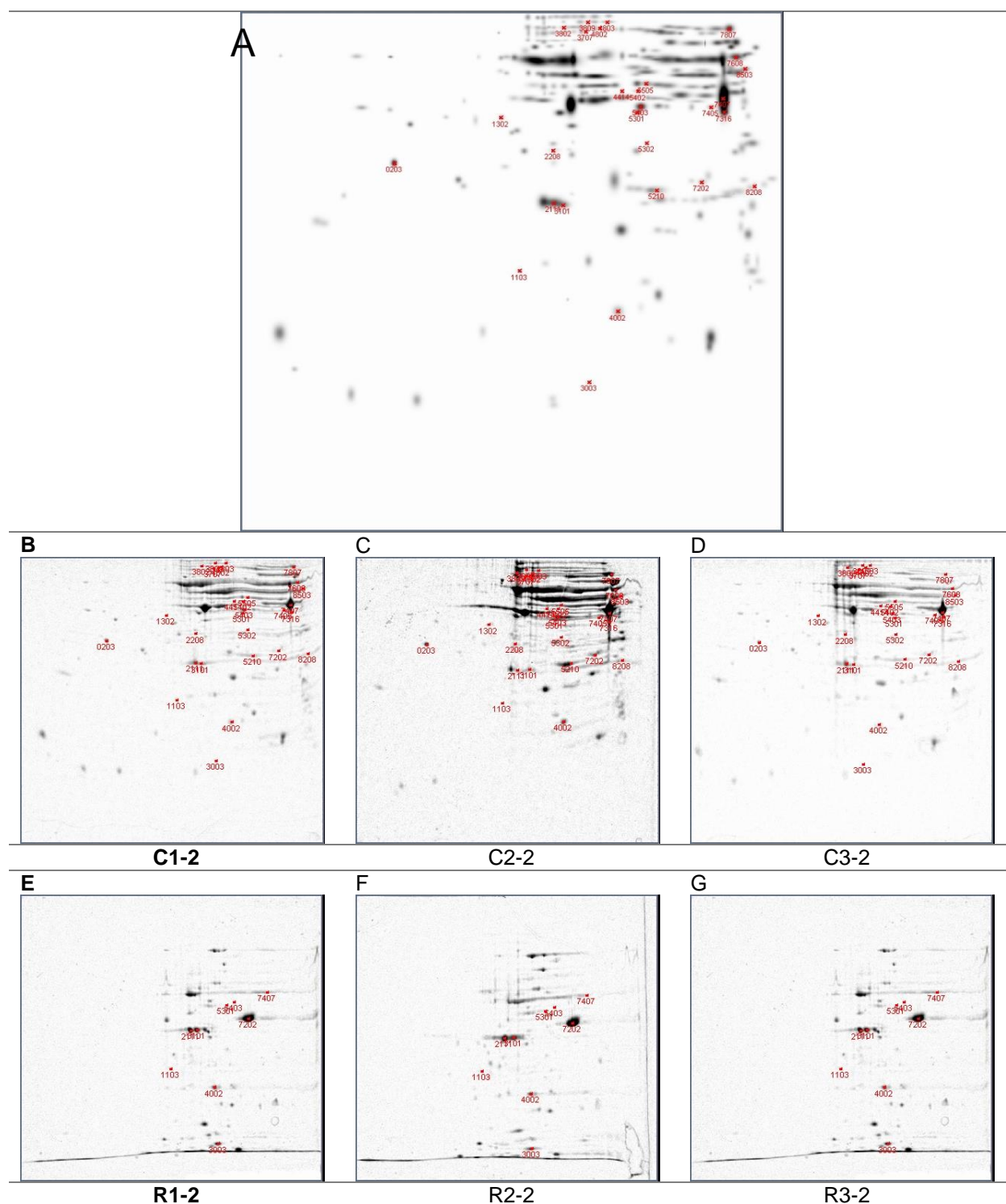
Anexo 8 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 1 el cual compara en *E. coli* O157H7 el grupo Control vs el grupo resistente al péptido como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



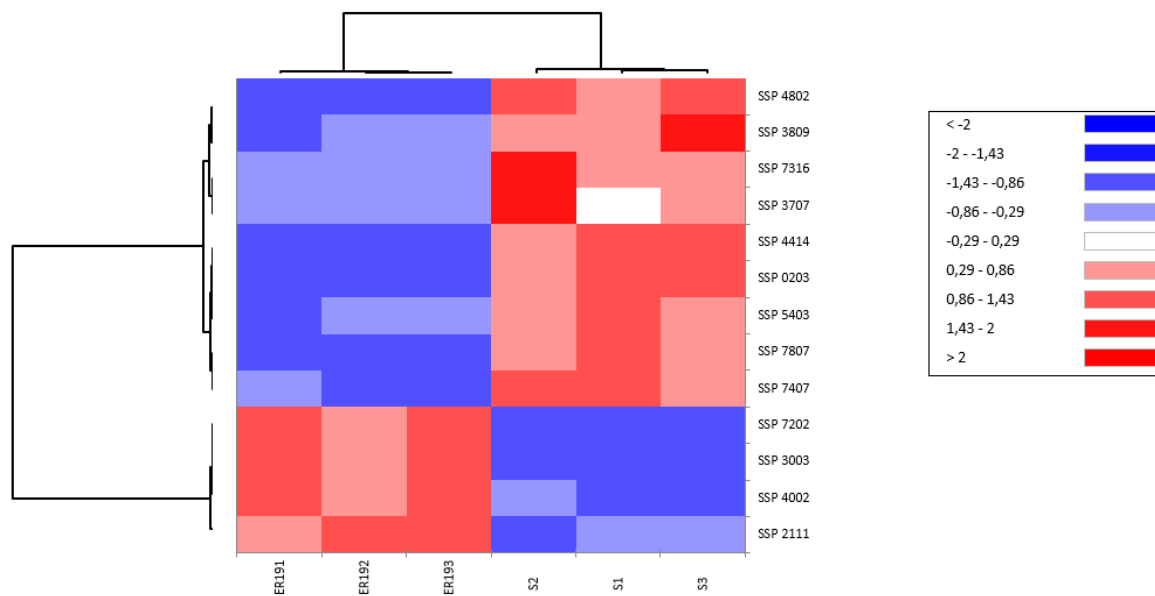
Anexo 9 Mapa de calor del experimento 1 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



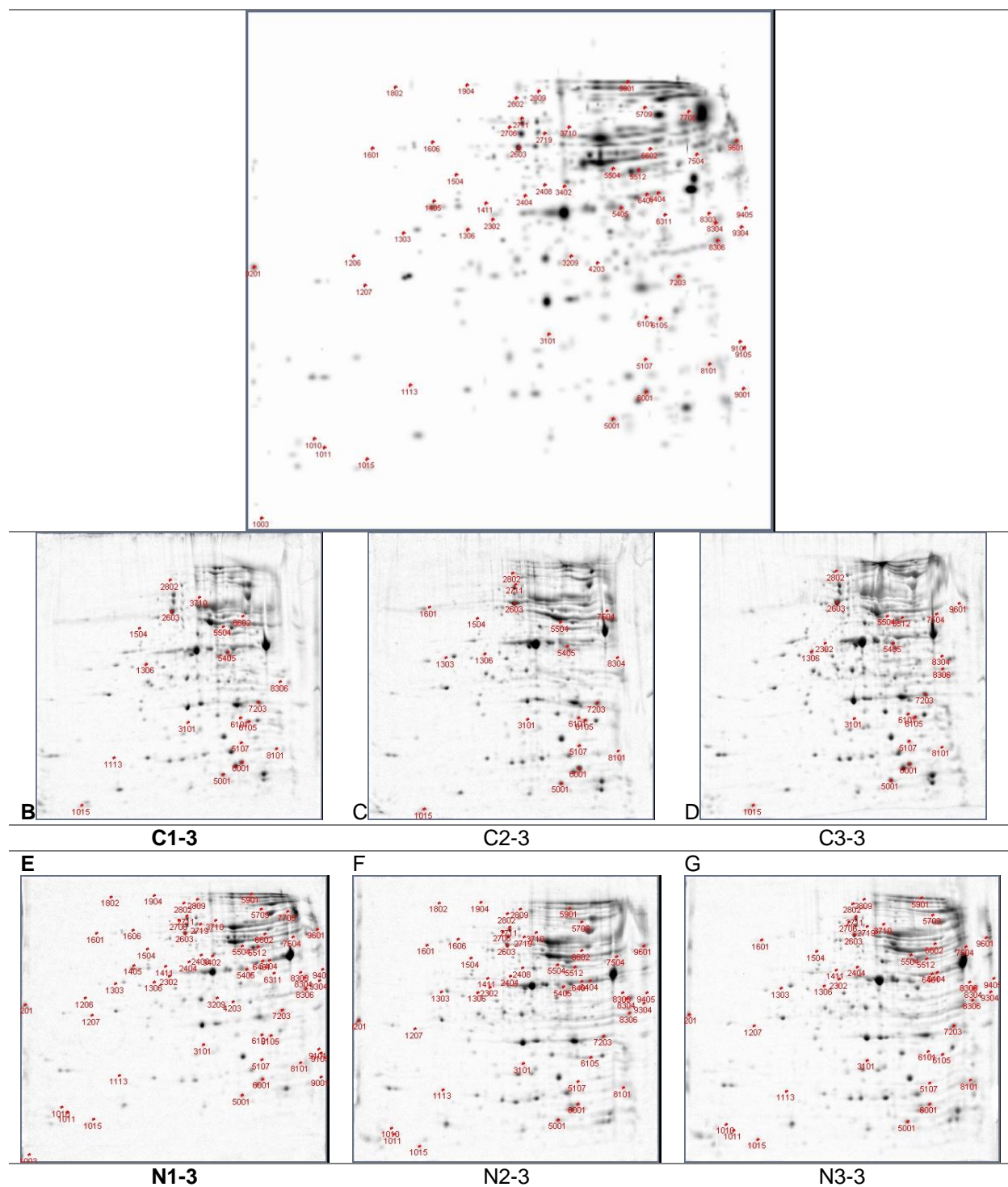
Anexo 10 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 2 el cual compara el grupo Control vs el grupo resistente al péptido P19 en *E. coli* O157:H7 como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



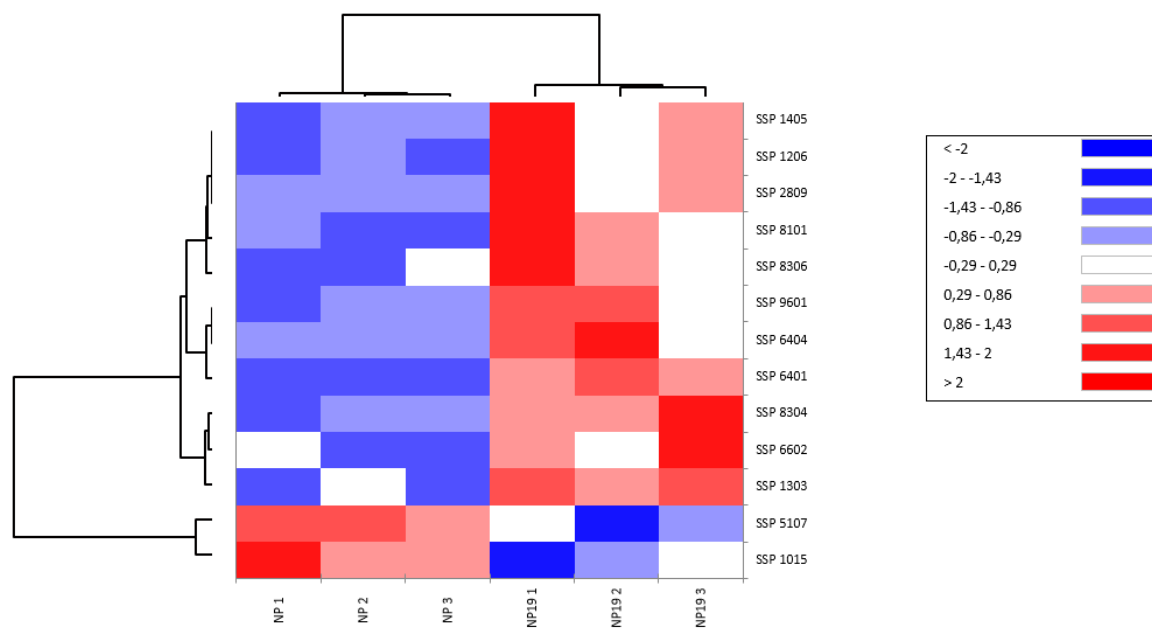
Anexo 11 Mapa de calor experimento 2 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



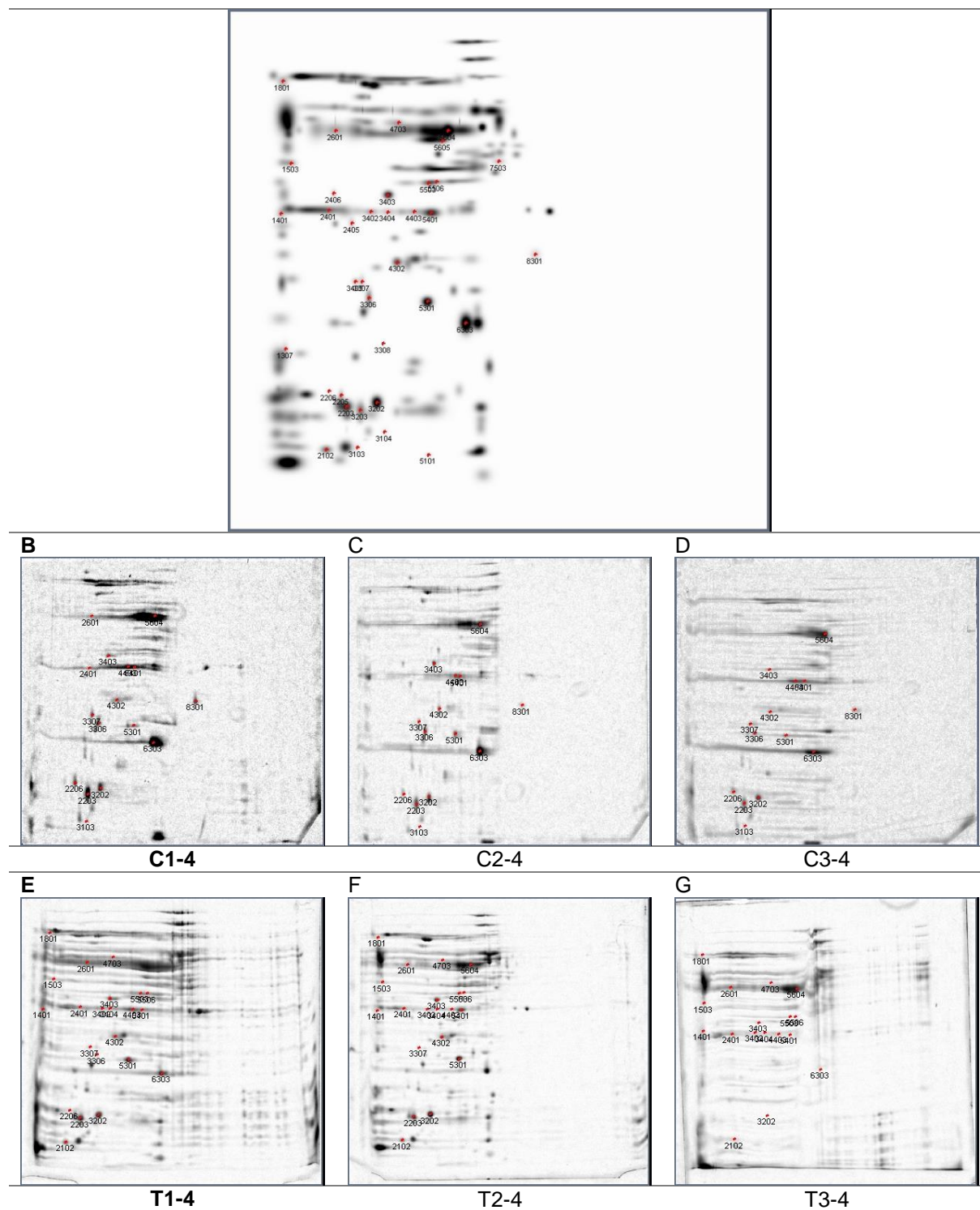
Anexo I2 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 3 el cual compara el grupo NP Control vs el grupo NPP19 en *E. coli* O157:H7 como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0.05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



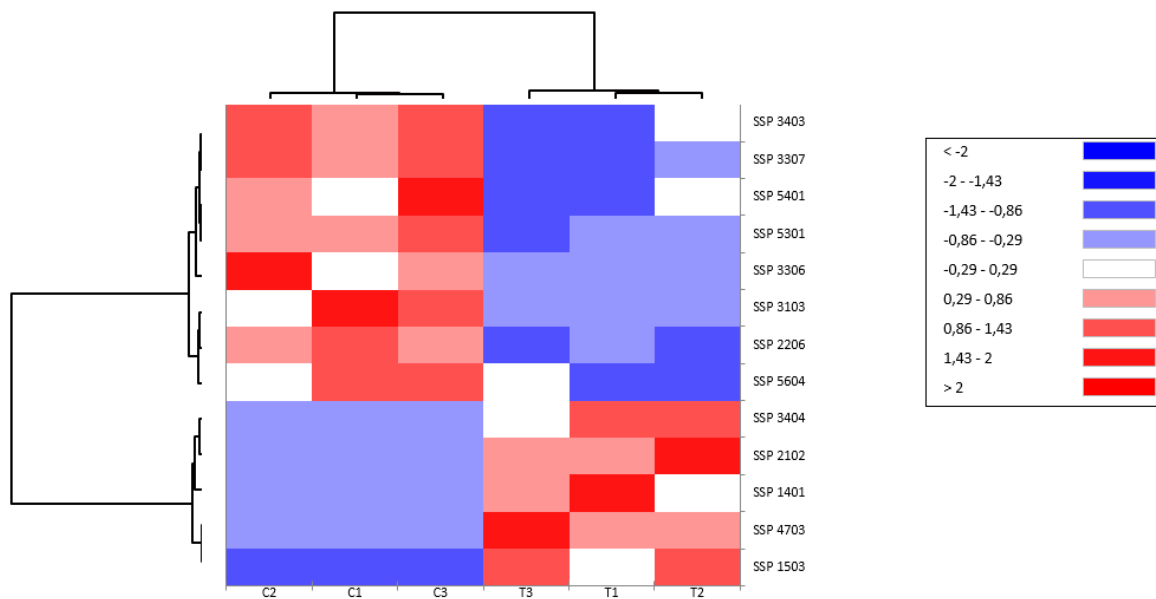
Anexo 13 Mapa de calor del experimento 3 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



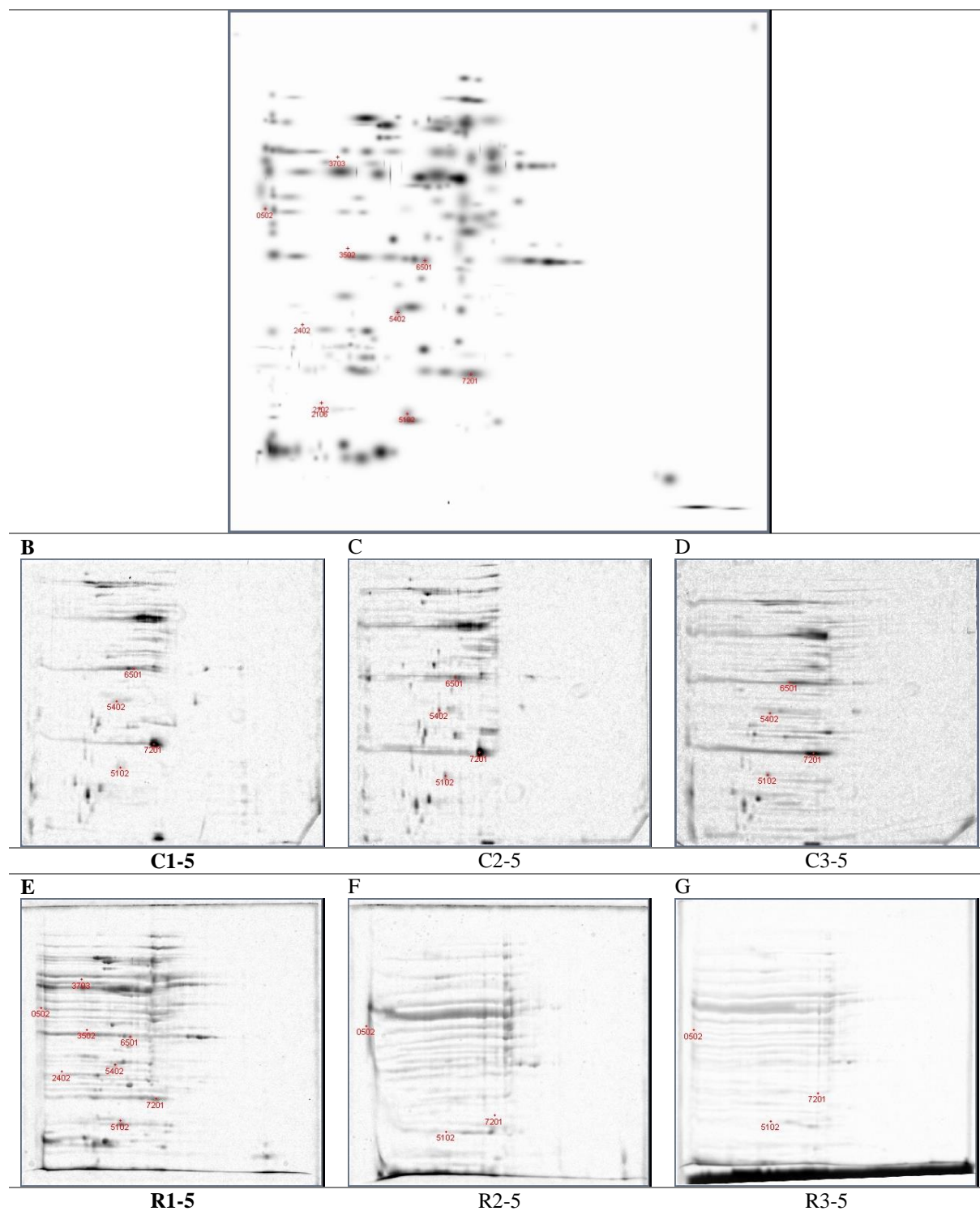
Anexo 14 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 4 el cual compara el grupo Control vs el grupo tratado con el péptido P19 en SARM como se describe en la Tabla 4; B-G: muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



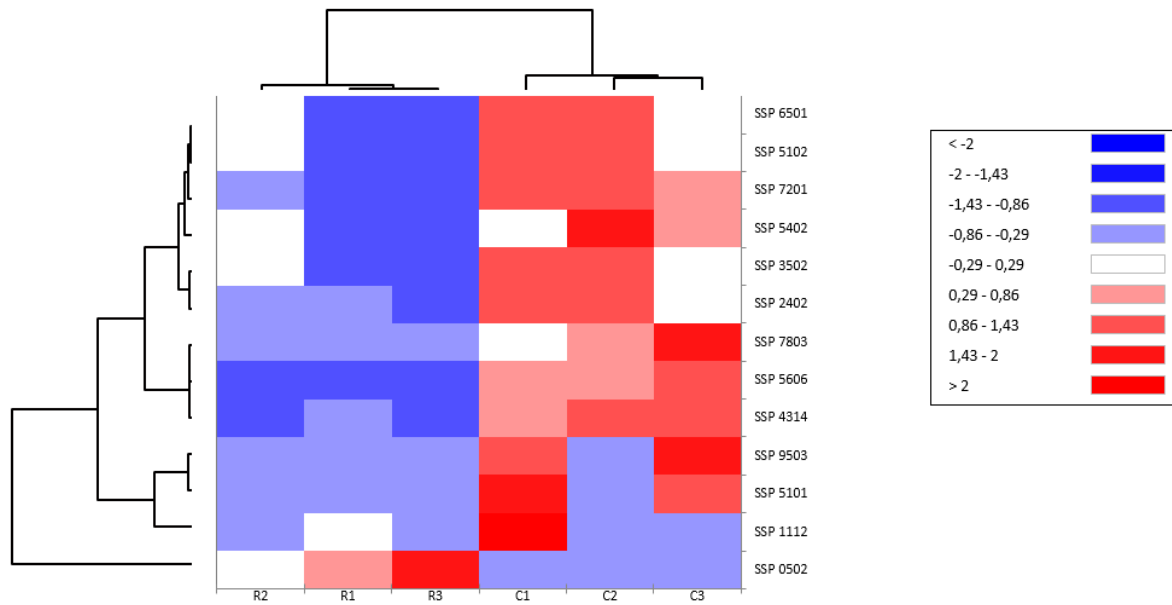
Anexo 15 Mapa de calor experimento 4 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



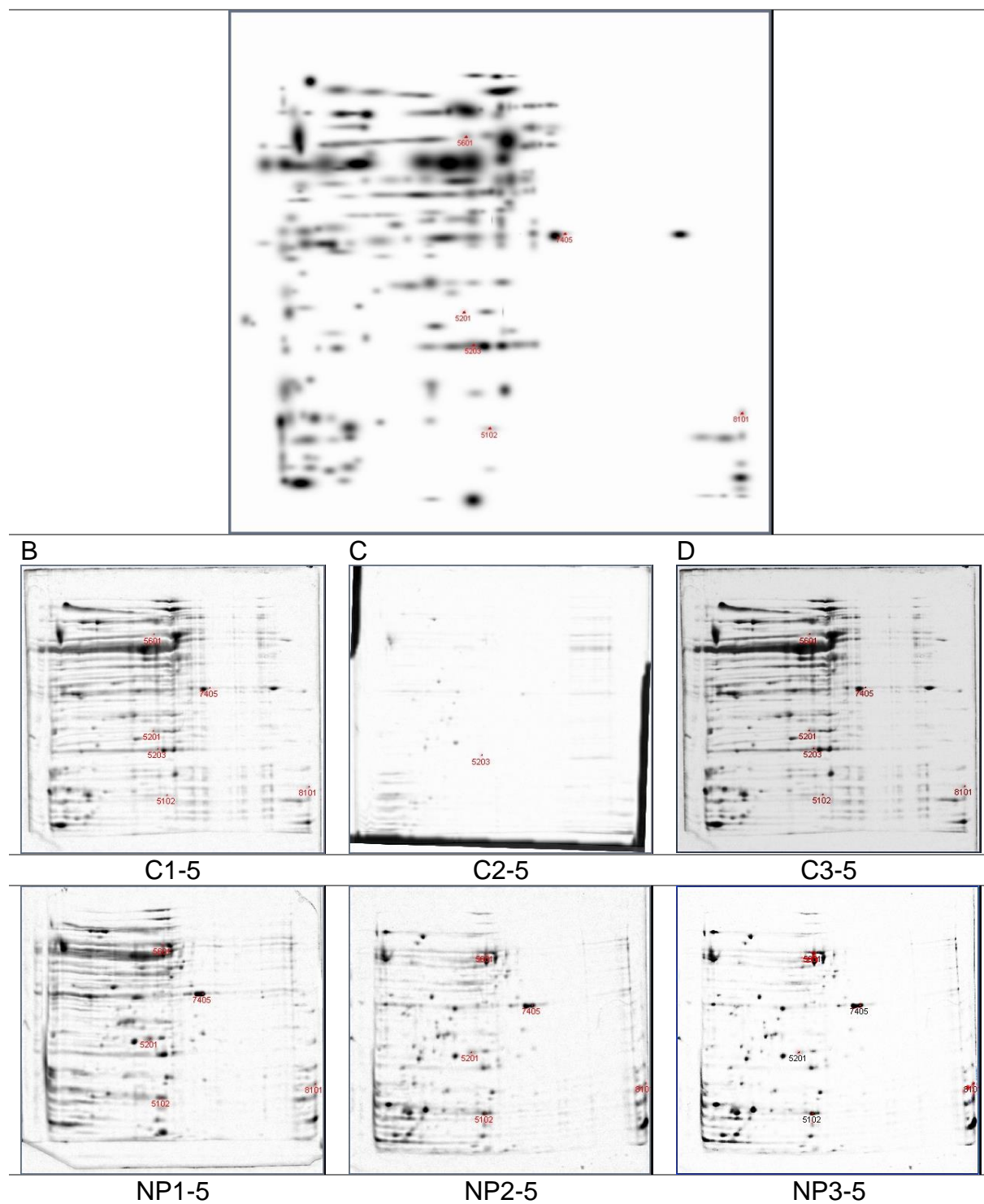
Anexo 16 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 5 el cual compara SARM grupo Control vs el grupo resistente como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



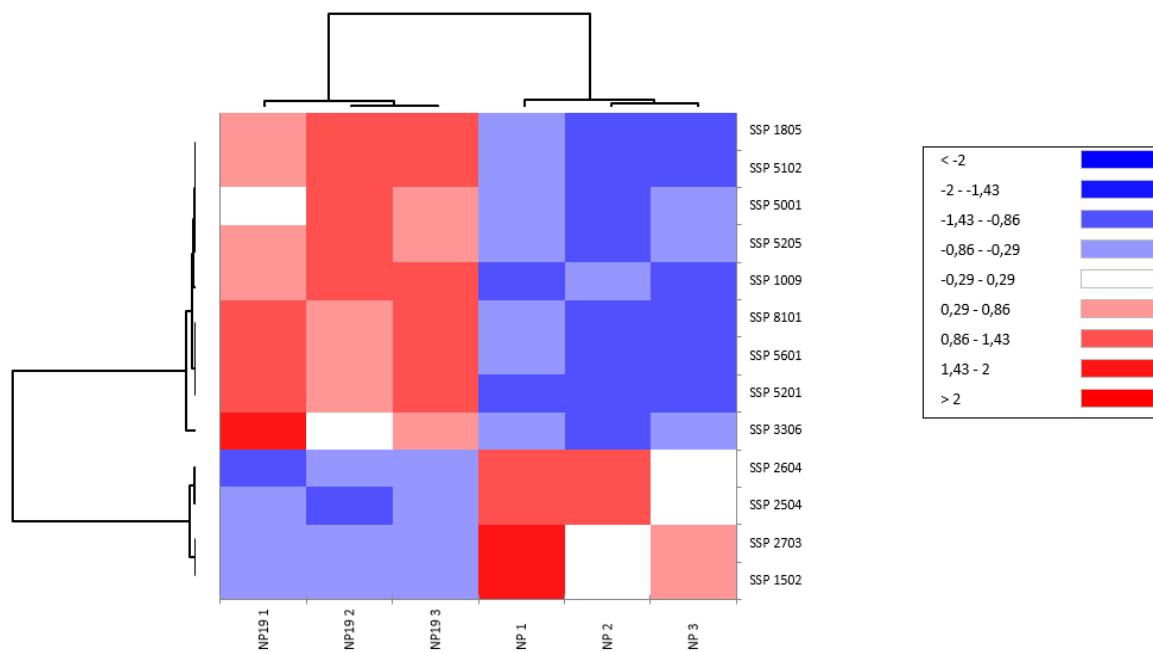
Anexo 17 Mapa de calor experimento 5 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



Anexo 18 A: se muestra la imagen del Master obtenido en el Exp. 6 el cual compara el grupo NP Control vs el grupo NP P19 en SARM como se describe en la Tabla 4; B-G: se muestran las tres réplicas de cada grupo. Los puntos en rojo señalan los spots diferencialmente expresados con significancia estadística ($P < 0,05$).

ESTUDIO PROTEÓMICO DE SARM Y *E. coli* O157:H7 FRENTE A LA ACCIÓN DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMICROBIANO P19 EN FORMA LIBRE Y NANOENCAPSULADO



Anexo 19 Mapa de calor experimento 6 representado la diferencia en la expresión de las proteínas con significancia estadística (valor de $p < 0.05$) y variación biológica relevante (cambio de expresión 2 veces mayor o menor).