

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS
NANOESTRUCTURADOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BACTERICIDA
FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a
meticilina y *Escherichia coli* O157:H7**

JENNIFFER CRUZ LAITÓN
Magíster en Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017**

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS
NANOESTRUCTURADOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BACTERICIDA
FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a
meticilina y *Escherichia coli* O157:H7**

JENNIFFER CRUZ LAITÓN
Magíster en Química

**Tesis de grado como requisito para obtener a el título de:
DOCTORA EN QUÍMICA**

Directora:

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ
Ph.D en Biocatálisis

Codirectores
FANNY GUZMÁN QUIMBAYO
Ph.D en Ciencias

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ
Ph.D en Bioquímica y biología molecular

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017**

DEDICATORIA

*A Jesucristo, Dios todopoderoso
A mis hijos Samuel y Thiago
A mis padres María Laitón y Deciderio Cruz
A mis hermanas Xiomara, Maritza y Adriana
A mi hermosa sobrina Lina María Cruz
A mi fiel amigo, mi compañero y mi amor Oscar Andrés Díaz
A mi ángel guardián Lina Rosa Benavides*

**Aunque la higuera no florezca,
Ni en las vides haya frutos,
Aunque falte el producto del olivo,
Y los labrados no den mantenimiento,
Y las ovejas sean quitadas de la majada,
Y no haya vacas en los corrales;
Con todo, yo me alegraré en Jehová,
Y me gozaré en el Dios de mi salvación**

Habacuc 3:17-18

AGRADECIMIENTOS

Al Señor Jesucristo, por regalarme la vida todos los días.

A mis hijos Samuel David y Thiago por ser mi inspiración. A mis padres y hermanas por su apoyo, paciencia y amor en todas las etapas de mi vida. A mi sobrinita Lina María por acompañarme en las madrugadas. A Oscar Andrés Díaz por su amor, cariño y comprensión. A toda mi familia que me ha apoyado y animado durante todos estos años.

A la Dra. Claudia Cristina Ortiz López por su confianza, paciencia, guía y gran motivación en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Rodrigo Torres por su apoyo incondicional no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino por sus consejos a tiempo en todos los aspectos en mi vida.

A la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo y al Dr. Claudio por su contribución, confianza y apoyo científico en la realización de la síntesis de péptidos. Gracias también por su amistad.

Al Dr. Luis Rivas, la Dra. María Ángeles Abengózar y la Dra. Pilar Fernández-Palencia por permitirme realizar los ensayos de actividad antiparasitaria y por su asistencia en el enfoque de todos los ensayos.

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología por todos estos años de aportes y buen ánimo, los llevo en mi corazón. Además, a los que no sólo fueron mis compañeros de laboratorio, sino que también me permitieron ser su amiga: Magaly Galvis, Yenny Bueno, profesor Mauricio Urquiza, Jorge Gutiérrez, Jair Flórez, Johan Gallo y César Ariza.

A mis pocos, pero verdaderos amigos Jorge Ardila, Yury Andrea Martínez, César Bernal, Luis Carlos Ramírez, Aurora Lisette Carreño, Jennifer Sarely, Yadi García, y Luz Karime Luna, con quienes sé que siempre cuento en todo momento.

A los profesores del posgrado y calificadores que una u otra forma aportaron en mi formación académica y científica.

A Colciencias por su programa de Becas Doctoral Nacional “Francisco José de Caldas” y a la Universidad Industrial de Santander por mi formación profesional.

A todas las personas que me apoyaron

¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN GENERAL	23
CAPÍTULO 1. ESTADO DE ARTE Y MARCO DE REFERENCIA.....	27
1.1 LA CRISIS DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	27
1.2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)	30
1.3 ACTIVIDAD <i>In Vitro</i> DE LOS PAMS.....	37
1.4. ENCAPSULACIÓN DE PAMS EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	40
CAPÍTULO 2 DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	43
RESUMEN.....	43
2.1. METODOLOGÍA	45
2.1.1 Materiales	46
2.1.2 Diseño de péptidos	46
2.1.3 Análisis bioinformático y selección de los péptidos análogos.....	46
2.1.4 Síntesis de péptidos en fase sólida y purificación	47
2.1.5 Caracterización de los péptidos sintéticos	48
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
2.2.1 Diseño de péptidos y análogos	50
2.2.2 Síntesis simultánea mediante la estrategia Fmoc/tBu y caracterización de los PAMs diseñados.....	53
CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS GIBIM-P1 A GIBIM-P6 Y ANÁLOGOS	62
RESUMEN.....	62
3.1 METODOLOGÍA	64

3.1.1. Materiales y reactivos	64
3.1.2. Determinación de la actividad antibacteriana de los PAMs	65
3.1.3. Evaluación de las sales sobre la actividad antibacteriana de los PAMs.....	66
3.1.4. Determinación de la CMI del enantiómero D-GIBIM-P5F8W	66
3.1.5 Determinación del grado de hemólisis de los PAMs en eritrocitos de carnero	67
3.1.6 Determinación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los PAMs.....	67
3.1.7 Determinación de la estabilidad de los PAMs GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en suero humano.....	67
3.1.8 Estudio de la distribución celular del péptido GIBIM-P5S9K mediante microscopía confocal de fluorescencia.....	68
3.1.9 Determinación de la actividad antiparasitaria de los PAMs	68
3.1.10 Evaluación de la permeación de la membrana bacteriana y parasitaria causada por los PAMs.....	69
3.1.11 Determinación de la citotoxicidad de los péptidos en macrófagos peritoneales.....	69
3.1.12 Análisis estadístico	70
3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
3.2.1 Actividad antibacteriana	70
3.2.2 Toxicidad <i>in vitro</i> de péptidos activos	76
3.2.3 Evaluación de la estabilidad en suero de los PAMs GIBIM-P5S9K y GIBIM- P5F8W	79
3.2.4 Evaluación de la interacción del péptido GIBIM-P5S9K con la membrana bacteriana mediante microscopía de fluorescencia.....	79
3.2.5 Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos	81
3.2.6 Permeación de la membrana bacteriana causada por los péptidos diseñados y análogos	85
3.2.7 Ensayo de permeabilización de la membrana citoplásmica de <i>Leishmania</i> frente a los PAMs.....	85

3.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de los PAMs en macrófagos peritoneales 88

CAPÍTULO 4. ENCAPSULACIÓN DEL PÉPTIDO GIBIM-P5S9K EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	94
RESUMEN.....	94
4.1 METODOLOGÍA	95
4.1.1 Materiales y reactivos	96
4.1.2 Preparación de nanopartículas poliméricas.....	96
4.1.3. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las NPs	98
4.1.4 Determinación de la eficiencia de encapsulación del péptido GIBIM-P5S9K en las NPs poliméricas de PLGA y PLA.....	98
4.1.5 Determinación de la CMI y la CMB de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K.....	99
4.1.6. Liberación <i>in vitro</i> del péptido GIBIM-P5S9K	99
4.1.7. Evaluación de la estabilidad de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K en suero humano	99
4.1.8. Actividad hemolítica de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K sobre eritrocitos humanos.....	100
4.1.9. Análisis estadístico.....	100
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
4.2.1 Síntesis y propiedades fisicoquímicas de las NPs de PLA y PLGA	100
4.2.2 Actividad antibacteriana de las NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K y NPs vacías	105
4.2.3 Evaluación de la liberación <i>in vitro</i> del péptido GIBIM-P5S9K de las NPs de PLA y PLGA	108
4.2.4 Determinación de la estabilidad de las NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K en suero humano.....	108
4.2.5 Determinación de la actividad hemolítica de NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con péptido GIBIM-P5S9K	110

5. RECOMENDACIONES.....	112
6. CONCLUSIONES	113
7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	116
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXOS	157

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales estructuras secundarias de los PAMs.....	32
Figura 2. Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu	35
Figura 3. . Mecanismo de acción de los PAMs.....	36
Figura 4. Mecanismo de acción de los PAMs en dianas intracelulares.....	36
Figura 5. Estructura general de los polímeros de PLA y PLGA.....	40
Figura 6. Posible modelo de encapsulación de las nanopartículas de PLGA y PLA con péptidos bioactivos.....	42
Figura 7. Etapas principales de la síntesis de péptidos fmoc.....	48
Figura 8. Simulación de la estructura secundaria de los péptidos diseñados usados como secuencia original.....	50
Figura 9. Estructura secundaria simulada de los péptidos análogos. A) Análogos de GIBIM-P2 y B) Análogos de GIBIM-P3.....	55
Figura 10. Estructura secundaria simulada de los péptidos análogos. A) Análogos de GIBIM-P4 y B) Análogos de GIBIM-P5.....	56
Figura 11. Péptidos sintéticos obtenidos por la metodología F-moc.....	57
Figura 12. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos GIBIM-P1 A GIBIM-P4A1V.....	58
Figura 13. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos GIBIM-P4N2F a GIBIM-P6.....	59
Figura 14. Espectros de DC de los péptidos diseñados.....	60
Figura 15. Espectros de DC de los péptidos análogos a GIBIM-P2	60
Figura 16. Actividad hemolítica de los péptidos diseñados y análogos a diferentes concentraciones frente a eritrocitos de carnero.....	77
Figura 17. Citotoxicidad de los péptidos más activos en líneas celulares.....	80

Figura 18. Cinética de estabilidad de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en suero humano.....	82
Figura 19. Localización celular de GIBIM-P5F8W en bacterias.....	83
Figura 20. Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 sobre A) amastigotes de <i>L. pifanoi</i> y B) promastigotes de <i>L. donovani</i> a 25 μ M.....	84
Figura 21. Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 sobre A) amastigotes de <i>L. pifanoi</i> y B) promastigotes de <i>L. donovani</i> a 25 μ M en proliferación.....	86
Figura 22. Incremento de la fluorescencia de Sytox green tras la adición de los PAMs a <i>E. coli</i> O157:H7.....	89
Figura 23. Incremento de la fluorescencia de Sytox Green tras la adición del péptido GIBIM-P5S9K a diferentes concentraciones. A) <i>E. coli</i> O157:H7, B) SARM y C) <i>P. aeruginosa</i>	90
Figura 24. Fluorescencia de SYTOX Green en amastigotes de <i>L. pifanoi</i> tras incubación (30 min) con el péptido a una concentración final de 25 μ M.....	91
Figura 25. Fluorescencia de SYTOX Green en A) amastigotes de <i>L. pifanoi</i> y B) promastigotes de <i>L. donovani</i> y tras incubación (30 min) con los péptidos más activos a una concentración final de 25 μ M.	92
Figura 26. Toxicidad de los PAMs en macrófagos peritoneales que exhibieron la mayor inhibición en amastigotes y promastigotes overnight.....	93
Figura 27. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. a, b y c) NPs de PLA; d, e y f) NPs de PLGA; g) IR de las NPs.....	102
Figura 28. Actividad antibacteriana de las nanopartículas cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K.....	106
Figura 29. Liberación <i>in vitro</i> del péptido GIBIM-P5S9K de las NPs.....	110
Figura 30. Actividad hemolítica del péptido GIBIM-P5S9K encapsulado en PLGA y PLA.....	111

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 2.....	45
Esquema 2. Eliminación del grupo fmoc por aminas secundarias para la formación de un grupo NH ₂ libre en la SPSS.....	49
Esquema 3. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 3.....	64
Esquema 4. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 4.....	95
Esquema 5. Metodología general de la síntesis de nanopartículas.....	97

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA del año 2011 al 2016.....	31
Tabla 2. CMI y CMB de los PAMs frente a diferentes bacterias Gram (-) y Gram (+)	38
Tabla 3. Nanovehículos para la encapsulación de péptidos, proteínas y fármacos.....	41
Tabla 4. Número de acceso en el GenBank de proteínas homologas a los péptidos GIBIM-P2 a GIBIM-P4.....	51
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados y sus análogos...54	
Tabla 6. Datos del dicroísmo circular de los péptidos.....	61
Tabla 7. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.....	72
Tabla 8. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en presencia de sales.....	76
Tabla 9. Actividad antibacteriana de los enantiómeros del péptido GIBIM-P5F8W..77	
Tabla 10. Actividad antileishmania de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.....	87
Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de PLA y PLGA.....	103
Tabla 12. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de PLA y PLGA cargadas y péptido GIBIM-P5S9K libre.....	107
Tabla 13. Estabilidad en suero de las NPs de PLA y PLGA cargados con GIBIM-P5S9K.....	109

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Aminoácidos, código de tres letras, una letra y estructura.....	158
Anexo B. Grupo protectores empleados en la estrategia fmoc.....	159
Anexo C. Soporte sólido utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida.....	160
Anexo D. Agente de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida.....	161
Anexo E. Secuencia y estructura de los péptidos sintéticos usados en esta tesis	162
Anexo F. Cromatogramas de los péptidos sintéticos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.....	166
Anexo G. Espectros de masas de los péptidos sintéticos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.....	175
Anexo H. Espectro de DC de los enantiómeros del péptido GIBIM-P5F8W.....	184
Anexo I. Curva de calibración del péptido GIBIM-P5S9K.....	185
Anexo J. Cinética de la Nps vacías de PLA y PLGA frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	186

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS

λ	Longitud de onda
θ	Elepticidad Molar
μ	Momento hidrofóbico
ζ	Potencial zeta
ν	Número de onda
A	
Aa	Aminoácido
ACC	Acido α -ciano-4-hidroxicinámico
ACN	Acetonitrilo
ATF	Ácido Trifluoroacético
B	
BHI	Infusión cerebro-corazón
C	
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
C-terminal	Carboxi-terminal
D	
DC	Dicroísmo circular
DCM	Diclotmetano
DLS	Dispersión de luz dinámica
DIC	Diisoprilcarbodimida
DIEA	Diisopropiletilamina
E	
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las
Enfermedades	
EDA	Enfermedad diarreica aguda
F	
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
Fmoc	9 -flurenilmetoxicarbonilo
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
H	

HBTU	Hexafluorofosfato de (2-[(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
K	
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	
LPS	Lipopolisacáridos
M	
MALDI	Desorción/Ionización láser asistida
MBHA	4-metilbencilhidrilamina
MS	Espectrometría de masas
N	
NPs	Nanopartículas
O	
OMS	Organización mundial de la salud
P	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PBP	Proteínas fijadoras de Penicilina
PBS	Tampón fosfato de sodio
PEI	Polietilenimina
PGLA	ácido poli-láctico-co-glicólido
PLA	Ácido poliláctico
PVL	Panton- Valentine Leucocidina
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio
R	
Rink	4-(2',4'- dimetoxifenil-aminofenil) fenoximetilpoliestireno.
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa
S	
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus pneumonia</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SHU	Síndrome Hemolítico Urémico
SNT	<i>Salmonella</i> no tifoidea
SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida
T	

t-Boc	<i>ter</i> -Butiloxicarbonilo
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TFE	2,2,2- Trifluoroetanol
TFS	Tampón Fosfato de Sodio
TOF	Tiempo de vuelo
U	
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonia
W	
W/O/W	Emulsión agua/aceite/agua
WARR	Alianza Mundial contra la Resistencia a los Antibióticos

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS NANOESTRUCTURADOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA Y *Escherichia coli* O157:H7*

AUTOR: JENNIFFER CRUZ LAITÓN**

PALABRAS CLAVES: PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS, NANOENCAPSULACIÓN, RESISTENCIA BACTERIANA, ENFERMEDADES INFECCIOSAS

DESCRIPCIÓN: En este trabajo de investigación doctoral se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron 18 nuevos péptidos con un amplio espectro de propiedades antibacterianas, utilizando la estrategia F-moc en bolsas de té. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) se caracterizaron mediante espectrometría de masas Maldi-TOF y espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Posteriormente, se determinó la actividad antibacteriana *in vitro*, frente cepas patógenas de *Escherichia coli* O157: H7 (*E. coli* O157: H7), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), utilizando el método de microdilución. Se demostró actividad bactericida para todos los PAMs frente al menos una de las cepas patógenas ensayadas. Los PAMs denominados GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W presentaron las mejores actividades antibacterianas, alcanzando una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI₉₉) en rangos de 0.5 a 25 µM, frente a las tres cepas.

Posteriormente, el PAM GIBIM-P5S9K se encapsuló en nanopartículas (NPs) poliméricas de PLA y PLGA utilizando el método de doble emulsión difusión de solvente. Además, las NPs se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Dispersión de luz en Modo Dinámico (DLS), Potencial Zeta y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Las NPs mostraron forma esférica y tamaño promedio comprendido entre 160 y 330 nm. Por otra parte, se evaluó el efecto antibacteriano de las NPs cargadas con GIBIM-P5S9K, mediante la determinación de la CMI₉₉; se determinó un valor de 75 y 25 µM frente a SARM y *P. aeruginosa*, respectivamente. La encapsulación en el biopolímero no potenció la actividad antibacteriana, pero disminuyó el efecto citotóxico cinco veces menos y aumentó la estabilidad del péptido contra la acción de proteasas cuando se expuso en presencia de suero humano. Finalmente, la actividad antibacteriana exhibida por los péptidos libres y encapsulados contra las cepas patógenas, nos permiten considerar las NPs como una alternativa nueva y potencial para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

*Tesis Doctoral

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Claudia C. Ortiz López, Doctora en Biotecnología. Codirectores: Fanny Guzmán Quimbayo, Doctora en Ciencias y Rodrigo G. Torres Sáez, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF NEW NANOSTRUCTURED SYNTHETIC PEPTIDES WITH POTENTIAL ACTIVITY AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*, METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* O157: H7*

AUTHOR: JENNIFFER CRUZ LAITÓN**

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL PEPTIDES, NANOENCAPSULATION, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, BACTERIA, INFECTION DISEASE, NANOPARTICLES.

DESCRIPTION: In this study a group of 18 new peptides with a broad spectrum of antibacterial properties were designed, synthesized and characterized using the strategy F-moc in tea bags. These peptides were characterized by Maldi-TOF mass spectrometry and Circular Dichroism (DC) spectroscopy. Subsequently, *in vitro* antibacterial activity was determined using the microdilution method in broth on pathogenic strains of *Escherichia coli* O157: H7 (*E. coli* O157:H7), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimicrobial peptides showed effect against at least one of the bacteria used as model, standing out the peptides denominated GIBIM-P5S9K and GIBIM-P5F8W, which presented the highest activity against strains evaluated with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₉) in a range from 0.5 to 25.0 µM.

GIBIM-P5S9K peptide was encapsulated in PLA and PGLA polymeric nanoparticles (NPs) by double emulsion-diffusion/solvent evaporation method. In addition, NPs were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Dispersion (DLS), Zeta Potential and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). NPs showed a spherical shape, with an average size from 160 to 330 nm. On the other hand, inhibitory effect of NPs was evaluated by determination of MIC₉₉, where the greatest effect was presented by GIBIM-P5S9K-loaded PGLA nanoparticles with a value of 75 and 25 µM against MRSA and *P. aeruginosa*, respectively. Biopolymer encapsulation did not potentiate antimicrobial activity, but encapsulation decreased cytotoxic effect by an order of 5-fold and increased the stability of antimicrobial peptide against proteolytic action when it was exposed in presence of human serum. Finally, antibacterial activity exhibited by free and encapsulated peptides against pathogenic strains, allow us to consider polymer nanoparticles as a new and potential alternative for development of new antimicrobial agents.

*Doctoral thesis

**Science Faculty. School of Chemistry. Advisors: Claudia C. Ortiz López, PhD Biocatalysis. Fanny Guzmán Quimbayo, PhD in Science and Rodrigo G. Torres Sáez, PhD in Biochemistry and Molecular Biology.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente, existe un gran interés por desarrollar nuevos antibióticos efectivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta prevalencia e infecciones sistémicas de difícil manejo terapéutico causadas, por bacterias patógenas multirresistentes. Las soluciones que se plantean para resolver esta problemática se han limitado en gran medida a la modificación estructural de moléculas antibióticas ya existentes o a terapias de combinación de varios fármacos, mientras que el desarrollo de nuevas moléculas o la identificación de nuevas dianas terapéuticas han sido menos estudiadas.

Entre los microorganismos patógenos más resistentes se encuentran las bacterias Gram-negativas de *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*); así mismo entre las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) también presenta gran relevancia. La multirresistencia de estas bacterias se asocia generalmente con la adquisición de plásmidos y transposones, o la infección por bacteriófagos, portadores de genes de resistencia.

Recientemente, los péptidos antimicrobianos (PAMs) obtenidos en forma sintética han surgido como una alternativa promisorio para el tratamiento de infecciones microbianas, estos compuestos exhiben propiedades multifuncionales que los hacen potencialmente útiles como agentes terapéuticos. Los PAMs son oligopéptidos con un número variable de aminoácidos (longitud de cadena entre 7 y 100 residuos), que presentan propiedades fisicoquímicas tales como estructura secundaria α -hélice, carga total positiva e hidrofobicidad. Estas características afectan la interacción entre los PAMs y la membrana de la célula. Los PAMs exhiben un amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos, virus y células tumorales debido a que presentan toxicidad selectiva permitiendo atacar de manera específica la célula diana,

mediante mecanismos que al parecer dificultan la aparición de fenómenos de resistencia.

A pesar de estas ventajosas características de los PAMs, todavía se presentan algunos desafíos para implementar su uso. Estos incluyen toxicidad potencial para los seres humanos, sensibilidad a las condiciones ambientales (susceptibilidad a las proteasas y pH extremo), baja selectividad frente a cepas específicas, altos costos de producción, problemas de plegado en algunos PAMs con alto peso molecular, reducción de la actividad cuando se utilizan para el revestimiento superficial y resistencia bacteriana frente a algunos péptidos.

En este sentido, la encapsulación de biomoléculas ha surgido como una estrategia que podría mejorar la biodisponibilidad, estabilidad y actividad antimicrobiana de los PAMs. En la actualidad, existen diferentes metodologías de encapsulación, siendo la doble emulsión- evaporación y/o difusión de solvente una de las técnicas más utilizadas para la encapsulación de enzimas, proteínas y péptidos.

Por lo anterior, esta tesis doctoral fue enfocada hacia la búsqueda de nuevos péptidos sintéticos con potencial actividad frente a los microorganismos patógenos de *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa*. Igualmente, se buscó potencializar la actividad de uno de los compuestos peptídicos más activos mediante encapsulación en nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico (PLA) y ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA). La hipótesis de esta búsqueda se basó en que el tamaño nanométrico favorece una mejor interacción con el microorganismo. Además, este trabajo de investigación fue dividido en capítulos correspondientes a cada uno de los objetivos específicos inicialmente planteados.

A continuación, se presenta una breve descripción de cada capítulo:

En el **Capítulo 1** se presentan los antecedentes teóricos de la problemática actual relacionada con la resistencia bacteriana frente a los antibióticos convencionales. Asimismo, se presentan las estrategias de diseño, síntesis y mecanismos de

acción de los PAMs durante los últimos años. Adicionalmente, se desarrolla una revisión bibliográfica acerca de la importancia de la nanotecnología en el desarrollo de nuevos compuestos biológicamente activos.

El **Capítulo 2** contiene los resultados del diseño, síntesis y caracterización de dieciocho nuevos péptidos. Inicialmente, cuatro PAMs diseñados a partir del algoritmo genético denominado “DEPRAMs”, fueron tomados como plantilla para desarrollar doce nuevos análogos, mediante el diseño racional basado en la modificación de un aminoácido en la secuencia original de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas que aparecen en la base de datos CAMP (“Collection of Anti-Microbial Peptides”, por sus siglas en inglés inglés). La síntesis de los dieciocho PAMs se desarrolló utilizando la metodología en fase sólida F-moc en bolsa de té.

El **Capítulo 3** está enfocado en la determinación de la actividad microbicida de los péptidos diseñados y la evaluación de una posible correlación entre la posición de sustitución de un aminoácido en la secuencia con la actividad de los mismos. Los compuestos fueron probados sobre tres cepas patógenas modelo: *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa* utilizando la metodología de microdilución en caldo. Además, para verificar el amplio espectro de estos compuestos se evaluó la actividad antiparasitaria frente a *Leishmania*. Por otro lado, teniendo en cuenta que los péptidos pueden actuar en la membrana bacteriana o en dianas intracelulares, se logró localizar celularmente uno de los péptidos más activos, utilizando microscopía de fluorescencia.

El **Capítulo 4** describe la síntesis y caracterización de nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), cargadas con uno de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana y menor citotoxicidad. Además, se determinó la actividad del péptido cargado en las nanopartículas poliméricas de PLA y PLGA, y se comparó respecto a la actividad del péptido libre.

Asimismo, se determinó la actividad hemolítica de este tipo de compuestos en hematocritos.

Pregunta de investigación

La investigación realizada fue motivada para dar respuestas a las siguientes preguntas:

¿Es posible sintetizar nuevos péptidos bioactivos con actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas, utilizando herramientas bioinformáticas?

¿Es posible mejorar la actividad de los péptidos antibacterianos mediante la encapsulación en nanopartículas poliméricas de PLA y PLGA?

Hipótesis

La encapsulación de PAMs en nanopartículas poliméricas de PLA y PLGA representa una herramienta para mejorar la estabilidad, actividad y biodisponibilidad de estos compuestos en medio fisiológico.

Capítulo 1

ESTADO DE ARTE Y MARCO DE REFERENCIA

1.1 LA CRISIS DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

El aumento de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales representa un serio desafío para las terapias antimicrobianas. El uso de los antibióticos convencionales cada vez más potentes frente a "superbacterias", conlleva a la urgente necesidad de desarrollar otros agentes de control bacteriano. Actualmente, según la Alianza Mundial contra la Resistencia a los Antibióticos (WAAR, por sus siglas en inglés), estas moléculas podrían perder completamente su efectividad debido a una combinación entre la automedicación y la prescripción irracional [1,2].

El Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) informó que cada año mueren 25.000 personas debido a infecciones causadas por bacterias multirresistentes y añadió que alrededor de 1.5 billones de euros son considerados como un gasto extra por los servicios de salud y pérdida de productividad por año en Europa [3].

La OMS ha clasificado ocho bacterias de interés internacional; su identificación y resistencia se presenta a continuación [4]:

- *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente a las cefalosporinas de tercera generación, antibióticos β -lactámicos y fluoroquinolonas.
- *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*): resistente a las cefalosporinas de tercera generación, incluyendo antibióticos β -lactámicos, y carbapenemas.

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): resistente a los fármacos antibacterianos β -lactámicos y a la Meticilina (SARM)
- *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*): resistente o no susceptible a la Penicilina
- *Salmonella* no tifoidea (SNT): resistente a las fluoroquinolonas
- Especies de *Shigella*: resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*: disminución de la susceptibilidad a las cefalosporinas de tercera generación
- *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*): resistente a cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos

En este contexto, las bacterias Gram-negativas de *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa*, así como la bacteria Gram-positiva SARM, se han convertido en patógenos de gran relevancia, centrando la atención de la comunidad científica en la búsqueda de nuevos tratamientos que combatan las infecciones que ocasionan estos microorganismos [1].

E. coli O157: H7 es un patógeno zoonótico que fue aislado en el año de 1982 en los Estados Unidos, por su capacidad para causar enfermedades humanas que van desde la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) hasta el fatal Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). Durante los últimos 20 años se ha detectado un aumento en la resistencia a los antibióticos en las poblaciones de *E. coli* O157: H7 [5]. Muchos aislamientos presentaron resistencia frente a los antibióticos de Ampicilina, Eritromicina, Metronidazol, Vancomicina y otros han mostrado resistencia a Tetraciclina, Estreptomina y Sulfisoxazol. Sin embargo, el mecanismo de resistencia de este patógeno no se ha podido establecer con precisión. Según el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), se ha estimado que las infecciones por *E. coli* O157: H7 causan 73.000 enfermedades, 2.200 hospitalizaciones y 60 muertes anuales en los Estados Unidos [6]. En Colombia, la prevalencia de esta cepa no se conoce con exactitud. La infección por *E. coli* O157:H7 ocurre en todos los grupos de

edades, pero la incidencia más alta se presenta en niños menores de cinco años, los cuales presenta las más altas proporciones de morbi-mortalidad. Se estima que de 0.6 a 2.4% de todos los casos de diarrea y de 15-36% de todos los casos de diarrea sanguinolenta se asocian con *E.coli* O157:H7. [7].

Así mismo, la bacteria *P. aeruginosa* ha aumentado la resistencia frente a los antibióticos convencionales. Uno de los principales mecanismos de resistencia intrínseca a antimicrobianos de esta cepa es la expresión de β -lactamasas AmpC cromosomales, que confiere resistencia a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima y ceftriaxona [8]. Durante las dos últimas décadas la resistencia ha sido un problema creciente, la *Surveillance Network Database USA* ha detectado un incremento del 62% en los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (resistencia a más de 3 antibióticos) desde 1998 hasta 2000 [9]. La aparición de multirresistencia supone un aumento en la estancia hospitalaria de los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), en los costos y en la mortalidad [10,11].

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) se reportó por primera vez en la década de 1960. En la actualidad un porcentaje importante de las infecciones nosocomiales son producidas por esta cepa. El mecanismo más frecuente de resistencia a metilina se debe a la presencia del gen *mecA* en el cromosoma bacteriano, que codifica la síntesis de una proteína fijadora de penicilina (PBP, del inglés Penicillin Binding Protein) alterada, denominada PBP2a o PBP 2', con baja afinidad por las penicilinas. Las cepas de SARM que presentan este gen, se caracterizan por su multiresistencia que, comprende todos los β -lactámicos y otros antimicrobianos como tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, quinolonas y algunos metales pesados. Se ha descrito que las tasas de infección por SARM se ven incrementadas en las unidades de cuidados intensivos en Asia, África, Europa y principalmente en América Latina [12–14]. En Colombia se demostró la presencia de individuos sanos colonizados por cepas de

SARM productoras del factor de virulencia de Pantón- Valentine Leucocidina (PVL) [15].

Desafortunadamente, este aumento en bacterias resistentes no ha sido acompañado por un aumento en el descubrimiento de nuevos antibióticos. Peor aún, ha habido una disminución en el desarrollo de nueva clase de antibióticos en la industria farmacéutica debido a factores económicos desfavorables y el gran reto que resulta la obtención de aprobaciones [16, 17]. En la tabla 1, se pueden apreciar los medicamentos antibióticos que fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) en el periodo de tiempo comprendido entre el 2011 y el 2016. Efectivamente, la resistencia a los medicamentos requiere el uso de otros agentes que utilicen un mecanismo de acción novedoso. Según una estimación, se necesitan veinte nuevas clases de fármacos para que los antibióticos funcionen efectivamente durante los próximos cincuenta años [16].

En este contexto, los péptidos antimicrobianos (PAMs), representan una nueva era para tratar infecciones debido a su compleja y diversa estructura. Estos compuestos producidos por bacterias, hongos, animales y humanos, se caracterizan porque son antibióticos naturales, con una alta especificidad y baja probabilidad citotóxica en células humanas. Además, por su mecanismo de acción presentan un amplio espectro de actividad frente a bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), hongos, virus, parásitos o incluso células cancerígenas [18–20].

1.2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)

Los PAMs son moléculas efectoras del sistema inmune innato que tienen funciones contra gérmenes, y que poseen un amplio espectro de acción antibiótica (incluyendo

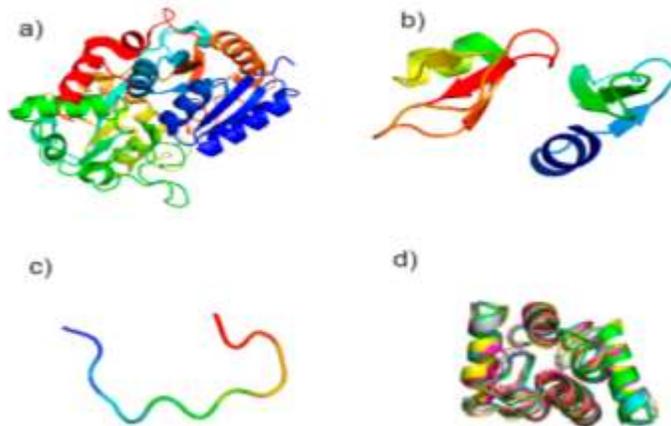
Tabla 1. Fármacos con actividad antimicrobiana aprobados por la FDA del año 2011 al 2016. Adaptada de [5].

Fármaco	Indicación	Compañía (año)
Avycaz (Ceftazidime-avibactam)	Para complicadas infecciones intra-abdominales y del tracto urinario causadas por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Proteus spp.</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Actavis (Febrero, 2015)
Dalvance (dalbavancina)	Para infecciones bacterianas agudas de la piel causadas por <i>S. aureus</i> (incluidas las cepas meticilinsensibles y resistentes a la Meticilina), <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> y <i>S. anginosus</i>	Durata Terapéutica (Mayo de 2014)
Metronidazol 1,3% Gel Vaginal	Para el tratamiento de la vaginosis bacteriana causada por bacterias anaerobias y protozoos	Actavis, Inc. (Abril 2014)
Orbactiv (Oritavancina)	Para infecciones bacterianas agudas de la piel causadas por <i>S. aureus</i> (incluyendo cepas sensibles a la meticilina y resistentes a la meticilina), <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. anginosus</i> grupo (incluyendo <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> y <i>S. constellatus</i>), y <i>E. faecalis</i> (sólo aislamientos sensibles a la Vancomicina)	Compañía "The medicines" (Agosto de 2014)
Sivextro (Fosfato de tedizolid)	Para infecciones bacterianas agudas de la piel causadas por <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. anginosus</i> (incluyendo <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> y <i>S. constellatus</i>) y <i>E. faecalis</i> .	"Cubist" Farmacéutica (Junio de 2014)
Sirturo (Bedaquiline)	Para las tuberculosis multirresistentes	Janssen Terapéutica (Diciembre 2012)
Abthrax (Raxibacumab)	Para ántrax	GlaxoSmithKline (Diciembre 2012)
Dificid (Fidaxomicina)	Para la diarrea por <i>C. difficile</i>	Optimer Farmacéutica (Mayo de 2011)

hongos y virus). Los PAMs juegan un papel importante, aunque poco conocido hasta el momento, en los procesos inflamatorios, liberación de citoquinas, inducción inmune, cicatrización, y seguramente por todas estas razones, en la patogénesis de muchas enfermedades [20].

La clasificación de los PAMs es difícil debido a su gran diversidad. Según la composición de los aminoácidos, el tamaño y estructuras conformacionales. Los PAMs pueden ser divididos en varias categorías, tales como: *a)* péptidos con estructuras α -hélice, como Catelicidina humana; *b)* péptidos con estructuras de lámina β -estabilizadas por puentes disulfuro, tales como las Defensinas humanas; *c)* péptidos con estructuras extendidas, como Indolicidina *d)* péptidos ricos en glicina, como Pg-AMP1 y péptidos con estructuras de bucle, como Defensinas cíclica [21]. En la figura 1 se muestran las principales estructuras secundarias de los PAMs.

Figura.1 Principales estructuras secundarias de los PAMs: *a)* Estructura α -hélice de Lactoferrina bovina (código PDB: 2O1L); *b)* Estructura de lámina- β de β -Defensina humana-1 (código PDB: 1IJV), *c)* Estructura extendida del péptido Indolicidina (código PDB: 1QXQ) y *d)* péptido rico en glicina Pg-AMP1



TAVARES, Letícia Stephan, et al. Antimicrobial Activity of Recombinant Pg-AMP1, a Glycine-Rich Peptide from Guava Seeds. *Peptides*, 2012, vol. 37 no.2., p. 294-300.[21]

A la fecha, no se cuenta con información relacionada que demuestren una relación clara entre un grupo estructural de PAMs y su modo de acción, el grado de

actividad o el rango de células huésped. Incluso, PAMs con estructuras muy similares pueden tener drásticamente diferentes mecanismos de acción, así como células diana [22,23]. Por ejemplo los PAMs de buforin y magainina 2, presentan una estructura similar, en el primer caso su acción se dirige al ADN y ARN; mientras que en el segundo hacia a la membrana celular [24,25].

Aunque son moléculas de difícil clasificación, existen ciertas propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la carga neta catiónica o aniónica, la hidrofobicidad, carácter anfipático y la solubilidad que los caracteriza. Estas propiedades juegan un papel muy importante para su actividad antimicrobiana y especificidad [26].

Como se mencionó anteriormente, muchos factores afectan la actividad biológica de los PAMs y existen algunas interacciones entre estos factores. En el diseño de PAMs, estas propiedades deben considerarse en conjunto ya que cambiar uno de estos parámetros para obtener una modificación deseada en un PAM puede alterar otros parámetros. Incluso un simple cambio en la secuencia primaria puede afectar a muchos otros parámetros físicoquímicos que son a menudo vitales para la actividad de un PAM y el tipo de células diana donde presenta su acción [27].

Por otro lado, la obtención de PAMs a partir de microorganismos, animales o plantas sigue siendo muy limitada. Por lo tanto, la síntesis química de PAMs [28,29] y la ingeniería genética, se han convertido en importantes estrategias de obtención de péptidos. En consecuencia, actualmente hay más de 3000 PAMs, incluyendo obtenidos sintéticamente y compuestos producidos por organismos vivos que presenta actividad biológica.

Una vez que se ha diseñado *in silico* la nueva secuencia del PAM, se debe realizar la síntesis. Una de las metodologías más utilizadas en la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS), por sus altos rendimientos. Este mecanismo consiste en la elongación de una cadena peptídica anclada a un soporte sólido a

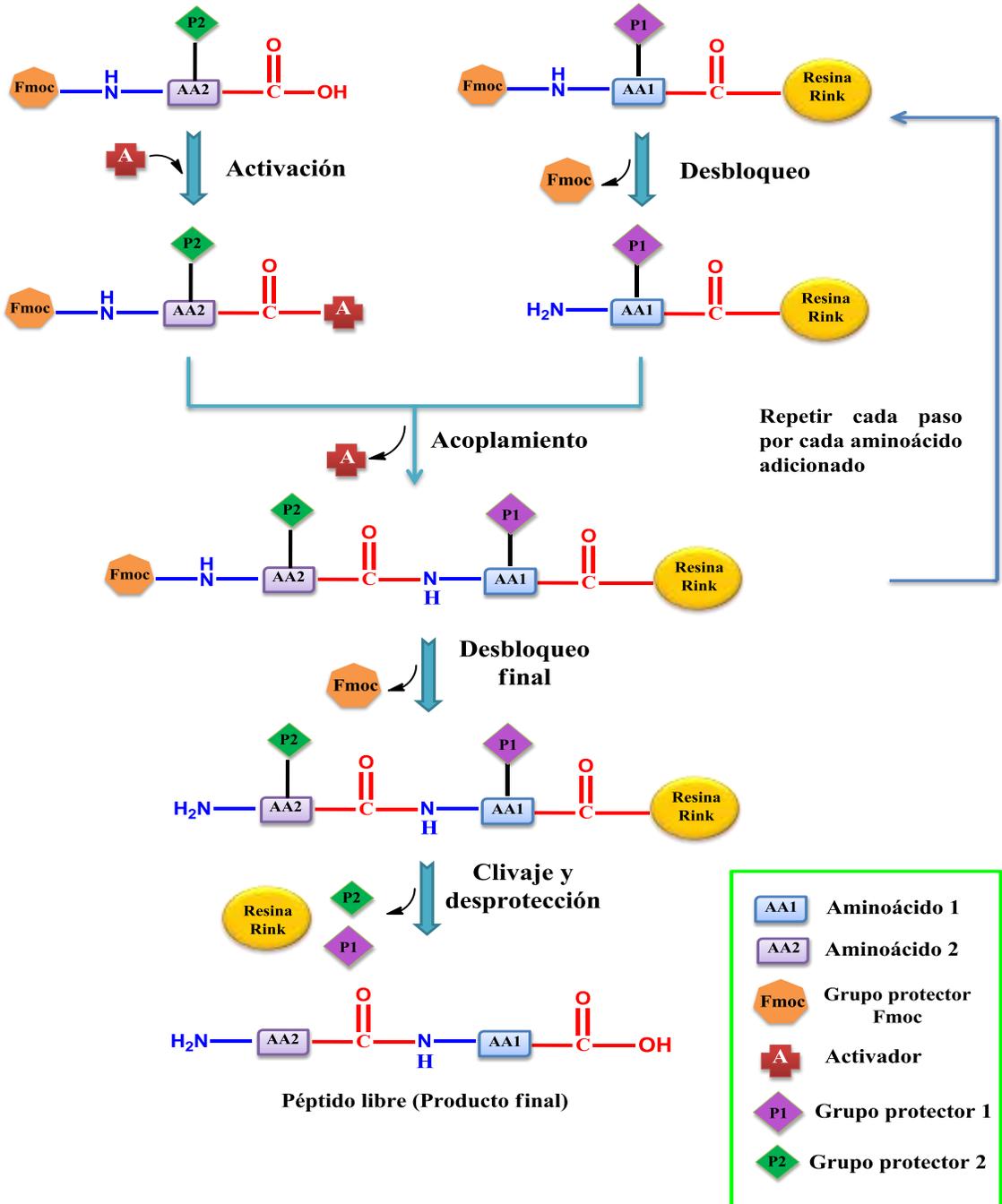
través de la adición sucesiva de aminoácidos que se unen mediante un enlace amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del aminoácido previamente ligado al soporte, hasta obtener la secuencia del péptido deseado. Los dos métodos de síntesis peptídica habitualmente usados son el 9-Fluorenilmetilcarboxil (fmoc) y el la *ter*-Butiloxicarbonilo (*t*-Boc), que difieren en los reactivos y condiciones empleadas para llevar a cabo la síntesis. El mecanismo para la síntesis de péptidos mediante la estrategia fmoc en fase sólida se describe en la Figura 2 [30].

En relación con la purificación del PAM sintetizado, el grado de pureza se determina usualmente mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC). Este análisis está basado en la hidrofobicidad diferencial de los residuos aminoacídicos, empleando gradientes de fase móvil con solventes con polaridad media como el acetonitrilo [31]. En cuanto a la caracterización, para la determinación de la masa molecular del péptido, se utiliza espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) dada su sensibilidad, velocidad y alto grado de especificidad molecular [32] y Dicroísmo Circular (DC), técnica alternativa de espectroscopía de absorción electrónica, que permite determinar la estructura secundaria del péptido, existiendo actualmente métodos de deconvolución que utilizan bases de datos y permite dar una estructura muy acertada [33].

Los mecanismos de la actividad antimicrobiana de los PAMs varían desde la permeabilización de la membrana (Figura 3) hasta las acciones sobre un conjunto de moléculas diana intracelulares que incluyen actividades inmunomoduladoras (Figura 4). Los péptidos pueden destruir la estructura de la membrana bacteriana produciendo la lisis celular, o, alternativamente, la interacción péptido-membrana puede conducir a la formación de poros transitorios y transportar el péptido dentro de la célula, poniéndolo en contacto con dianas intracelulares donde se pueden enlazar al DNA, RNA y proteínas provocando procesos como la inhibición de la síntesis de la pared celular o la síntesis de proteínas, además pueden interferir

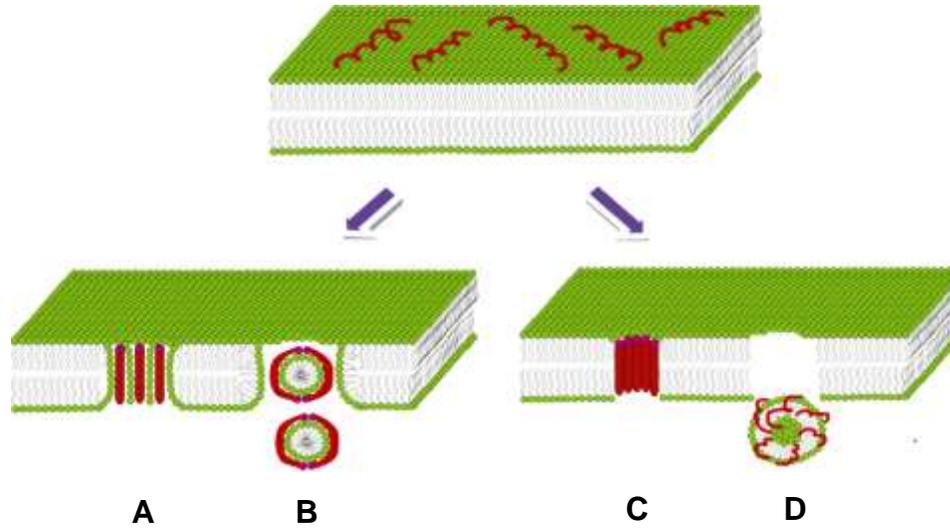
con

Figura 2. Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu.



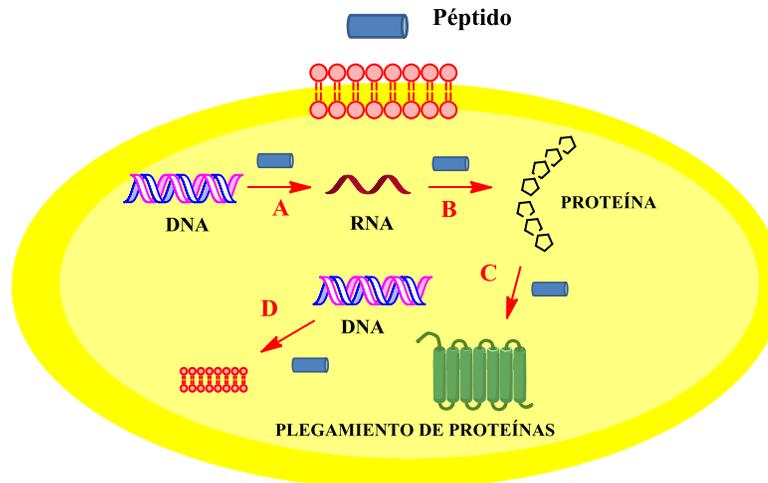
BORGIA, Jeffrey y FIELDS, Gregg. Chemical Synthesis of Proteins. Trends in biotechnology, 2000, vol. 18 no.6., p.243–51. [30]

Figura 3. Mecanismo de acción de los PAMs. A) modelo toroidal, B) modelo de capa, C) modelo de ruptura por barril y D) modelo de canales agregados.



SENGUPTA, Durba, *et al.* Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol.1778, p. 2308–2317. [36].

Figura 4. Mecanismo de acción de los PAMs en dianas intracelulares. A) Proceso de transcripción, B) Proceso de traducción, C) Plegamiento de proteínas y D) Síntesis de la pared bacteriana



VILA-FARRÉS, Xavier, GIRALT, Ernest y VILA, Jordi. Update of Peptides with Antibacterial Activity. *Current medicinal chemistry*, 2012, vol. 19 no, 36., p. 6188–6198. [37]

la citocinesis bacteriana por filamentación celular *in vitro* o *in vivo* [34; 35].

1.3 ACTIVIDAD *In Vitro* DE LOS PAMS

La actividad de los PAMs es muy amplia y puede ser dividida en: (a) antibacteriana, (b) antifúngica, (c) antiparasitaria; (d) antiviral y (e) anticancerígena. Cientos de PAMs han sido probados contra casi todas las bacterias, virus y parásitos. La mayoría de los PAMs tienen una indiscutible función frente a bacterias Gram (-) y Gram (+) y su actividad frente a bacterias patógenas ha sido su principal campo de aplicación. Dado que la variedad de péptidos evaluados es considerable, los ensayos de actividad antimicrobiana más relevantes frente a diferentes bacterias patógenas se describen en la tabla 2.

Adicionalmente, existen 4 péptidos que han alcanzado la fase III en ensayos clínicos: la magainina MSI-78 o Pexigano, indicada en el tratamiento del impétigo y las úlceras derivadas de la diabetes [45]; la protegrina de cerdo IB-367 o Iseganano, ensayada en el tratamiento de la mucositis oral [90], la proteína humana rBPI23 o Neuprex, para endotoxemia; y la indolicidina CP-226 u Omiganano, utilizada para prevenir infecciones asociadas a cateterismo [46]. Finalmente, como prevención de infecciones asociado a trasplantes de médula ósea se alcanzó fase II con lactoferricina [47].

A pesar del amplio campo de acción de estos compuestos, la resistencia bacteriana a algunos PAMs ha sido documentada [18]. Dos ejemplos de este tipo son: a) la resistencia a la dermicidina desarrollada por *Staphylococcus aureus*, por inducción de una proteasa específica, y b) la disminución de la sensibilidad a la acción de PAMs catiónicos exhibida por algunas bacterias Gram-negativas, lograda modificando su lipopolisacárido a través de un sistema de sensores específico (PhoP/PhoQ). Otro desafío para mejorar su acción antimicrobiana lo constituye su baja estabilidad en condiciones fisiológicas, ya que cuando se evalúan *in vivo* son susceptibles a degradación por peptidasas o proteasas.

Tabla 2. CMI y CMB de los PAMs frente a diferentes bacterias Gram (-) y Gram (+).

Péptido	Cepa	CMI ($\mu\text{mol/L}$)	Año	Ref.
Hc-CATH	<i>E. coli</i>	2.34	2017	YU, Haining, <i>et al.</i> Scientific Reports, 2017, vol. 7 no, 2600., p. 1-18.[38]
	<i>S. dysenteria</i>	0.59		
	<i>P. mirabilis</i>	4.69		
	<i>P. aeruginosa</i>	18.75		
	<i>S. aureus</i>	4.69		
	<i>B. subtilis</i>	75		
	<i>C. albican</i>	4.69		
N1	<i>E. coli</i> O157:H7	0.5	2017	YANG, Na, <i>et al.</i> Scientific Reports, 2017, vol.7 no,3392., p. 1-19. [39]
N2		0.25		
N3		1.0		
N4		1.0		
N5		64.0		
N6		0.5		
N7		2.0		
N8		32		
G18P Chr1	<i>E. coli</i> (ATCC 9637)	3.0	2017	TRIPATHI, Amit Kumar, <i>et al.</i> Scientific Reports, 2017, vol. 7 no, 3384., p. 1-16.[40]
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	3.0		
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC BAA-427)	6.8		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	3.0		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 700698 MRSA)	3.0		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 700699 MRSA)	3.0		

Tabla 2. CMI y CMB de los PAMs frente a diferentes bacterias Gram (-) y Gram (+).

Péptido	Cepa	CMI ($\mu\text{mol/L}$)	Año	Ref.
FR-11P	<i>E. coli</i> (ATCC 9637)	4.5	2017	TRIPATHI, Amit Kumar, et al. Biomaterialia, 2017, vol. 57, p. 170-186.[41]
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	4.5		
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC BAA-427)	6.4		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	5.0		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 700698 MRSA)	2.1		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 700699 MRSA)	1.0		
Medu sin PT1a	<i>S. aureus</i>	8.0	2017	GAO, Yitian, et al. Frontiers in Microbiology, 2017, vol. 8, p.628–637.[42]
	SARM	16.0		
	<i>E. faecalis</i>	32.0		
	<i>E. coli</i>	128.0		
LPcin -YK3	<i>P. aeruginosa</i>	128.0	2017	KIM, Ji-Su; JOENG, Ji-Ho y KIM, Yongae. Journal microbiology biotechnology, 2017, vol.27 no,4., p.759–767. [43]
	<i>Listeria innocua</i>	>20		
	<i>S. aureus</i>	>2.5		
	<i>P. aeruginosa</i>	>2.5		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	>17		
J-AA	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	>35	2017	LIU, Beijun, et al. Peptides, 2017, vol. 88 no,16., p.115–125. [44]
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4.0		
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27857)	8.0		
	<i>B. subtilis</i> (ATCC 23857)	16.0		
		2.0		

En este sentido, la encapsulación de los PAMs en nanoestructuras se propone en esta tesis como una estrategia de protección de los péptidos frente a la

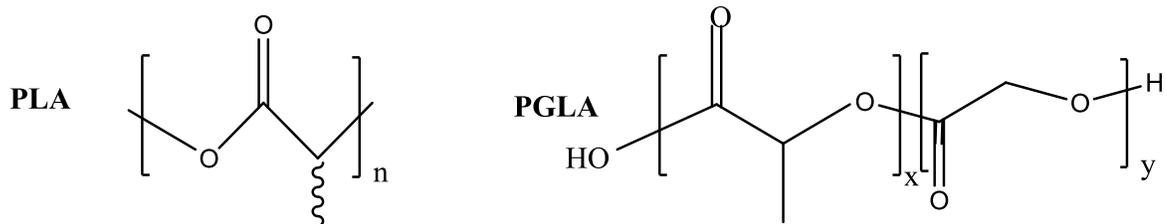
degradación química y enzimática, además la encapsulación ofrece estas otras ventajas: puede

prevenir la agregación y/o cambios conformacionales, aumenta la estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad de péptidos biológicamente activos. Tras su administración, mejora la eficacia y aumenta tiempo de residencia en el lugar de aplicación. Por otro lado, disminuye la toxicidad de los fármacos y favorece la especificidad en este caso de los PAMs [48,49].

1.4. ENCAPSULACIÓN DE PAMS EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

En la búsqueda de nuevas estrategias de administración de los medicamentos, durante los últimos años se ha investigado la posibilidad de encapsular proteínas y péptidos en nanopartículas (NPs) tales como quitosano, gelatina, ácido poli-láctico-co-glicólido (PLGA) [50] y el ácido poli-láctico (PLA) [51, 52] (Fig. 5), entre otros, debido a las ventajas anteriormente mencionadas [48,49].

Figura 5. Estructura general de los polímeros de PLA y PLGA.



RAMESAN, Mt, *et al.* Role of nanoparticles on polymer composites. *Micro and Nano Fibrillar Composites*, 2017, p.301-326. [52]

La encapsulación de péptidos y proteínas en nanoestructuras ha sido desarrollada por diversos métodos incluyendo emulsificación-polimerización, polimerización interfacial, evaporación por solvente, “*salting out*”, coacervación, combinación de procesos de sonificación y tecnología capa a capa y partículas funcionalizadas en la superficie, entre otras. La metodología de síntesis depende de las propiedades físicoquímicas de los PAMs [53,54]. En la tabla 3 se resumen los diferentes

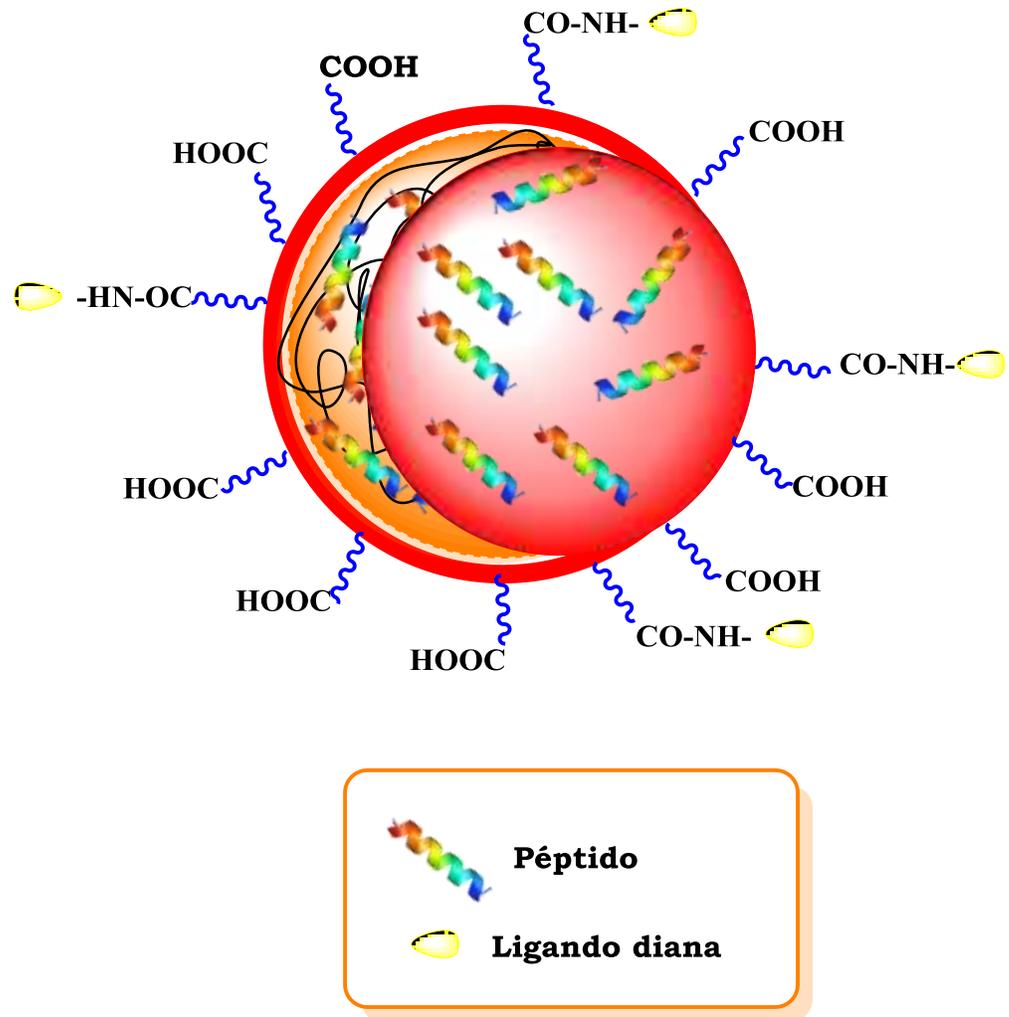
estudios que se han centrado en los soportes poliméricos como transportadores de péptidos, proteínas y fármacos utilizando varios métodos de encapsulación.

Tabla 3. Nanovehículos para la encapsulación de péptidos, proteínas y fármacos.

Nanovehículo	Péptido o proteína	Método de encapsulación	Referencia
<i>Quitosa</i>	Insulina	Gelación Ionotrópica	SARMETO, <i>et al</i> [55]
	Ciclosporina A	Gelación Ionotrópica	DE CAMPOS, <i>et al</i> [56]
	BSA	Coacervación	XIE, <i>et al</i> [57]
<i>Gelatina</i>	Paclitaxel	Desolvatación	LU, <i>et al</i> [58]
	Didanosina	Doble desolvatación	KAUR, <i>et al</i> [59]
	Fosfato de Cloroquina	Evaporación de solvente	BAJPAI, <i>et al</i> [60]
	BSA bFGF	Doble emulsión Emulsión	LI, <i>et al</i> [61]
<i>PLA</i>	hGF2	Doble emulsión/evaporación de solvente	PATEL, <i>et al</i> [62]
	Proteína C	Doble emulsión	ZAMBAUX, <i>et al</i> [63]
	BSA Hemoglobina	Doble emulsión Doble emulsión	LEE, <i>et al</i> [64] SHENG, <i>et al</i> [65]
<i>PGLA</i>	Insulina	Evaporación de solvente	KUMAR, <i>et al</i> [66]
	Estradiol	Evaporación de solvente	SAHANA, <i>et al</i> [67]
	Taxol	Emulsión-Difusión	DANHIER, <i>et al</i> [68]
	2-Aminocromona	Nanoprecipitación	LABHASETWAR, <i>et al</i> [69]
	Timopentina	Evaporación de solvente	YIN, <i>et al</i> [70]
	Dexametosona	Método de doble emulsión- evaporación de solvente Evaporación de solvente	GÓMEZ-GAETE, <i>et al</i> [71]

En la figura 6 se puede apreciar un posible modelo de la formación de nanocápsulas o nanoesferas poliméricas usando como principio activo péptidos sintéticos. El fármaco puede adsorberse o puede encontrarse disuelto internamente en la matriz polimérica.

Figura 6. Posible modelo de encapsulación de las nanopartículas de PLGA y PLA con péptidos bioactivos.



GÓMEZ-GAETE, Carolina, *et al.* Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmacology*, 2007, vol. 331, p.153–159. [71].

Capítulo 2

DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

RESUMEN

Los PAMs son candidatos importantes para el desarrollo de nuevos antibióticos. Se expresan por el huésped para eliminar patógenos invasores y aumentar la respuesta inmune [72]. Estos efectos beneficiosos de los PAMs están determinados por sus propiedades físicas: poseen secuencias de cadena corta (<50 aminoácidos), son catiónicos (carga neta media +3) y tienen un contenido hidrofóbico promedio del 42% [73]. La cationicidad y la hidrofobicidad de los PAMs constituyen elementos críticos para generar una estructura de carácter anfipático. De esta manera los PAMs catiónicos se dirigen hacia las membranas bacterianas aniónicas ricas en fosfatidilglicerol (PGs, por sus siglas en inglés) [74, 75]. Sin embargo, cabe mencionar que hasta el momento la evaluación de muchos PAMs catiónicos ha fracasado en ensayos clínicos debido a varios inconvenientes que limitan fuertemente su aplicabilidad, tales como degradación, citotoxicidad y alto costo de producción [76].

Por lo tanto, para superar las limitaciones de los péptidos nativos, el diseño racional *in silico* de PAMs se convierte en una estrategia prometedora que reduce drásticamente los costos de producción y el tiempo requerido para la evaluación de la actividad y la toxicidad. Entre los métodos de optimización que representan una herramienta versátil y potente para el diseño de PAMs se encuentran los algoritmos genéticos (AG). Esta técnica de programación es un método de optimización adaptativo basado en las ideas evolutivas de la selección natural y genética. Los AG siguen el principio de acercamiento adaptativo de la naturaleza al ambiente, en el cual el proceso de la evolución se realiza por la generación o la

mutación sucesiva y solamente los individuos más aptos sobreviven [6]. En este método se determinan propiedades fisicoquímicas cuantificables, llamados descriptores, de la estructura primaria de los péptidos. Por ejemplo, carga neta, punto isoeléctrico (pI), índice de inestabilidad e hidrofobicidad, entre otras. Los descriptores se usan para relacionar estas propiedades con la actividad biológica.

Además del diseño computacional antes mencionado, han surgido estrategias de diseño racional basadas en el alineamiento de secuencia tomando una secuencia de PAM como plantilla. En estudios previos [78–81] se han modificado en la secuencia un único aminoácido, con el objetivo de identificar las posiciones y los residuos que son importantes para la actividad antimicrobiana. Algunos péptidos como cecropina, magainina, temporina, protegrina y lactoferricina, se han utilizado como plantillas de PAMs [82–86]. En la mayoría de los casos, la fuente de su actividad se ha investigado con base en que la carga y el carácter anfipático resultan cruciales para la actividad antimicrobiana [87]. En general, ha sido evidente que cuando se comparan dos estudios de sustitución de aminoácidos, los remplazos que favorecen la actividad varían de acuerdo con la secuencia plantilla, y las sustituciones análogas pueden tener efectos sustancialmente distintos en diferentes posiciones de la secuencia primaria.

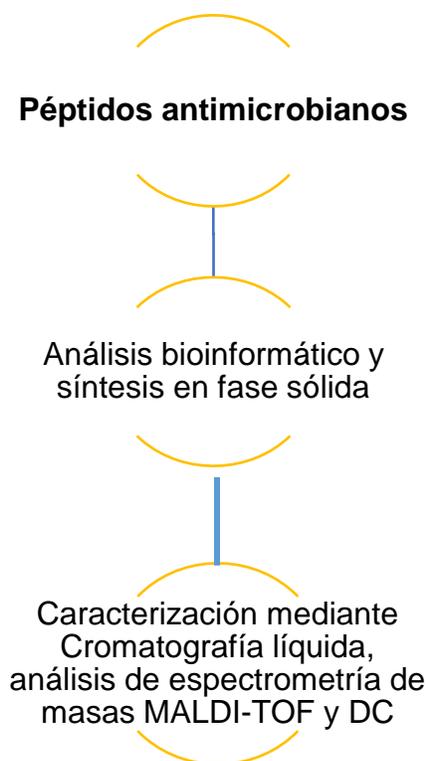
El objetivo del presente estudio fue desarrollar nuevas secuencias de PAMs catiónicos utilizando la combinación de herramientas computacionales *in silico* y determinar la relación que existe entre las propiedades fisicoquímicas de los péptidos con la modificación de algunos aminoácidos en diferentes regiones de la secuencia. Por lo tanto, se diseñaron seis posibles péptidos con actividad antimicrobiana, a partir del algoritmo genético denominado DEPRAMs, el cual fue desarrollado como parte de una tesis doctoral de una estudiante vinculada al grupo de investigación [88]. Estos péptidos fueron denominados GIBIM-P1 a GIBIM-P6. Posteriormente, de estas 6 secuencias diseñadas se tomaron 4 como

plantilla para crear 12 análogos con el fin de aumentar la actividad antimicrobiana teniendo en cuenta las características fisicoquímicas.

Posteriormente se realizó la predicción de la estructura secundaria teórica de los 18 PAMs catiónicos, con base en los datos PEP-FOLD 3.5. Luego fueron sintetizados manualmente en fase sólida utilizando la metodología Fmoc/tbu. Finalmente, los PAMs se purificaron mediante RP-HPLC y, se caracterizaron utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF y DC, confirmando una estructura secundaria α -hélice en todos los casos.

2.1. METODOLOGÍA

En el esquema 1 se muestra la metodología general para el diseño, síntesis y caracterización de los PAMs.



Esquema 1. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 2.

2.1.1 Materiales

Los Fmoc-L-aminoácidos fueron adquiridos de IRIS Biotech GmbH (Germany). La resina Rink-amida, los reactivos y disolventes orgánicos para la síntesis de péptidos fueron obtenidos de Merck Novabiochem (Germany). El 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) y el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Agua MilliQ con una resistividad de 18.3 M Ω a 25°C fue usada la preparación de todas las soluciones.

2.1.2 Diseño de péptidos

La predicción de péptidos antibacterianos fue una estrategia de optimización basada en algoritmos genéticos [89], que realiza una búsqueda de péptidos antimicrobianos con rangos establecidos de carga, hidrofobicidad, punto isoeléctrico y el índice de inestabilidad. La Ecuación 1 para la optimización está dada por:

$$\min f(x_1, x_2, x_3, x_4) = (x_1 - 4)^2 + (x_2 - 9.5)^2 + x_3^2 + x_4$$

$$s. t. \quad 0 < x_1 < 8; \quad 7 < x_2 < 12; \quad -1.5 < x_3 < 1.5; \quad x_4 < 40 \quad (1)$$

Donde x_1 , x_2 , x_3 y x_4 son la carga, el punto isoeléctrico, la hidrofobicidad y el índice de inestabilidad, respectivamente.

Este software fue elaborado por la Dra. Nydia Paola Rondón en su tesis doctoral [88].

2.1.3 Análisis bioinformático y selección de los péptidos análogos

En este trabajo, se diseñaron 12 análogos a partir de cuatro de los péptidos obtenidos con el algoritmo genético, mediante el uso de los resultados de la alineación entre los péptidos y las proteínas homólogas que se encuentran en la

base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Las proteínas homólogas fueron obtenidas mediante la herramienta BLASTp [90, 91] y el alineamiento múltiple de las secuencias homólogas de los péptidos se realizó utilizando la herramienta Clustal W [92, 93].

La síntesis de los 18 péptidos con posible actividad antimicrobiana, se realizó teniendo en cuenta que no presentaban una homología superior al 87% con los péptidos antimicrobianos reportados en la base de datos “Colección de Secuencias y Estructuras de Péptidos Antimicrobianos”, CAMP, por sus siglas en inglés, y que mostraban una estructura secundaria α -hélice en el modelo computacional.

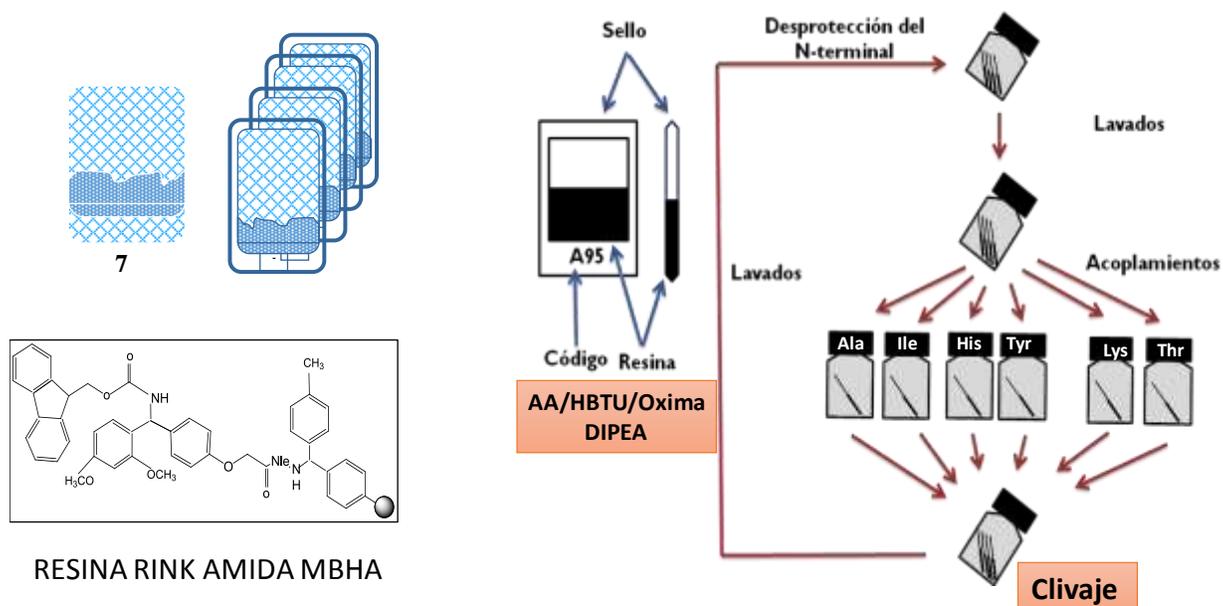
2.1.4 Síntesis de péptidos en fase sólida y purificación

Los péptidos se sintetizaron manualmente mediante Síntesis Química en Fase Sólida (SPSS, por sus siglas en inglés) empleando la estrategia Fmoc en bolsitas de té de polipropileno desarrollada por Houghten (Fig. 7) [94]. Para la síntesis se usó la resina Rink amida 4-MBHA como soporte polimérico (Malla 100-200, carga: 0,63 meq/g) y Fmoc-L-aminoácidos [95–96]. Los ciclos de desprotección del grupo alfa-amino (Fmoc/tbu) se llevaron a cabo por tratamiento con 20% de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF) (Esquema 2). Las reacciones de acople de los aminoácidos se realizaron con exceso molar de hexafluorofosfato de 2- (1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y oxyma[®] en DMF. El reactivo N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) se utilizó como neutralizador *in situ*. Los pasos de desprotección y acoplamiento se controlaron mediante el ensayo de azul de bromofenol al 1% p/v. La estructura química de los reactivos utilizados para la síntesis se muestra en los anexos A a D.

Los péptidos se purificaron mediante columnas C-18 mediante extracción en fase sólida (SPE) usando columnas 500mg para 5 mg de péptido con diferentes porcentajes de 10, 20, 30, 40% de Acetonitrilo (ACN) y analizados luego en una

columna analítica C18 Xbridge BEH130 130Å, (3.5 μm, 4.6 mm X 150 mm) utilizando como solventes : (A) H₂O con TFA 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contenía TFA al 0,1% (v / v) como fase móvil con el programa de

Figura 7. Etapas principales de la síntesis de péptidos Fmoc/tbu. Las bolsas que contenían la resina fueron tratadas juntas para los pasos de lavado y desprotección, mientras los acoplamientos individuales fueron desarrollados en paralelo según era necesario para las diferentes secuencias peptídicas.

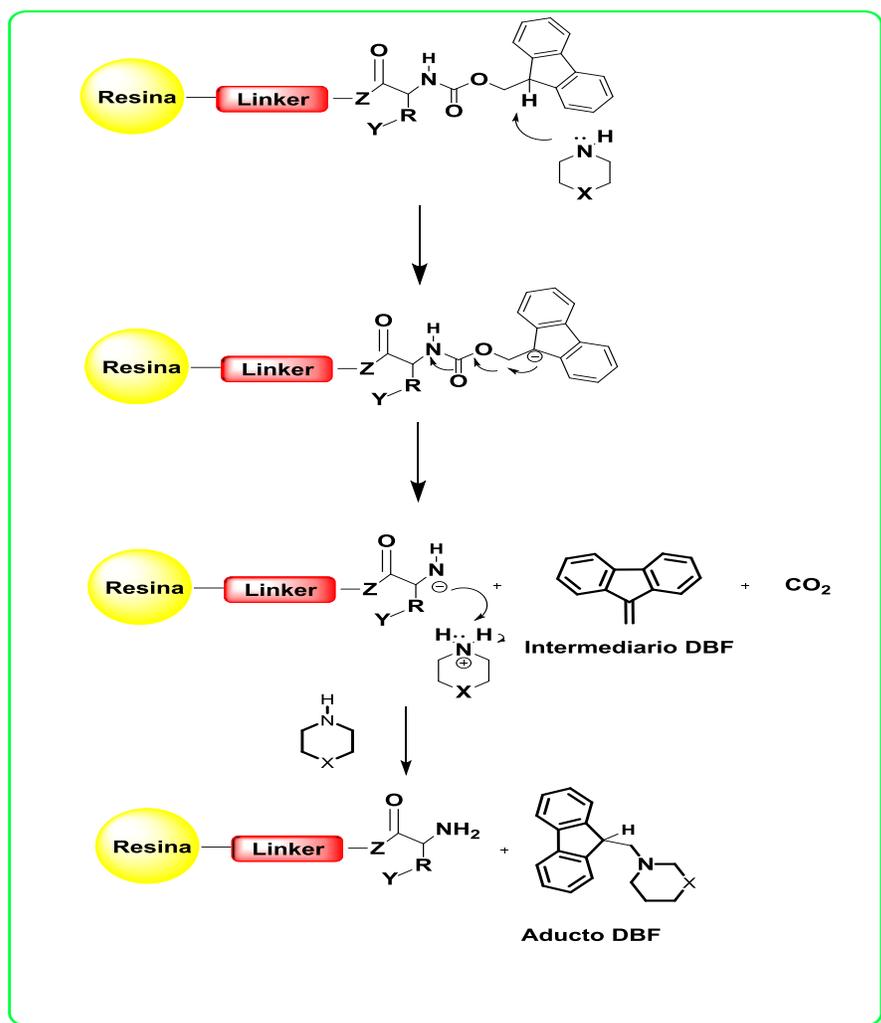


gradiente: 5-70% 7 minutos con de B a flujo de 1 mL /min, detección a una longitud de onda (λ) de 220 nm [97].

2.1.5 Caracterización de los péptidos sintéticos

La masa molar de los péptidos purificados se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF como se ha descrito previamente [98, 99], usando un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtrem en modo reflectrón y utilizando el ACC como matriz. Los espectros obtenidos corresponden a la sumatoria de 2000 espectros individuales acumulados y la potencia del láser se ajustó en un rango entre 5-10% del umbral de ionización. El análisis de los espectros se realizó con el programa FlexAnalysis, de Bruker.

La estructura secundaria de los péptidos fue determinada por espectroscopía de DC como se ha publicado preliminarmente [101, 102]. Esto se llevó a cabo en un espectrómetro de DC (J-815, Jasco Corporation, Japón). Los péptidos se ajustaron a una concentración 0,2 mM con solución al 30% (v/v) de TFE.



Esquema 2. Eliminación del grupo Fmoc/tbu por aminas secundarias para la formación de un grupo NH₂ libre en la SPSS. R= cadena de aminoácidos; Y= grupo protectores de cadena laterales; Z= O, NH; X= CH₂, NH y N(CH₃) [100].

La elipticidad molar $[\theta]$ para cada péptido se calculó mediante la Ecuación 2:

$$[\theta] = 3298.2 \Delta\epsilon; (2)$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de cada péptido.

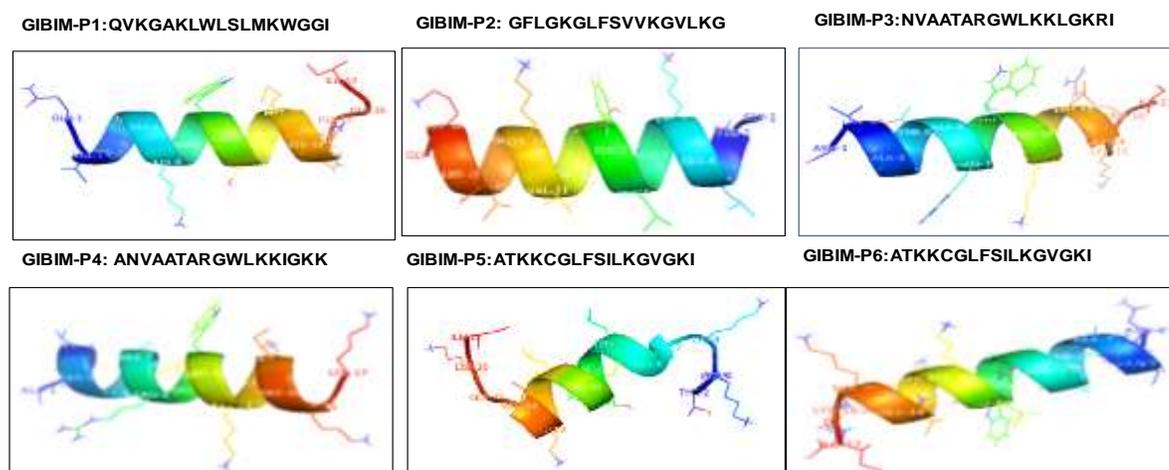
La concentración de los péptidos se determinó midiendo la absorbancia de las soluciones a 280 nm usando la ecuación de Lambert-Beer [102].

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1 Diseño de péptidos y análogos

Los péptidos GIBIM-P1, GIBIM-P2, GIBIM-P3, GIBIM-P4, GIBIM-P5 y GIBIM-P6 fueron diseñados por el algoritmo genético DEPRAMs y seleccionados como plantilla para el desarrollo de 12 nuevos análogos. La estructura secundaria α -hélice fue la herramienta de selección de estos péptidos, la cual fue simulada en el servidor PEP-FOLD 3.5 (Fig. 8).

Figura 8. Simulación de la estructura secundaria de los péptidos diseñados usados como secuencia original. La estructura secundaria fue simulada en línea usando el servidor de predicción PEP-FOLD 3.5: <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>.



Posteriormente, a partir del análisis bioinformático, se determinó que, en el diseño de análogos, los péptidos GIBIM-P1 y GIBIM-P6 no presentaban secuencias de proteínas homólogas. No obstante, en la Tabla 4 se presenta el número de acceso de las proteínas homólogas de los péptidos GIBIM-P2 a GIBIM-P5, las cuales fueron alineadas usando la herramienta de Clustal W (<http://>

www.ebi.ac.uk/clustalw) para determinar los aminoácidos conservados en la secuencia.

La secuencia de los péptidos inicialmente diseñados y de sus análogos se muestra en la Tabla 5. Las modificaciones en la secuencia de los péptidos GIBIM-P2 a GIBIM-P5 para diseñar los análogos se realizaron con el fin de aumentar la carga neta positiva, la hidrofobicidad y el porcentaje de probabilidad de ser un PAM, propiedades fisicoquímicas que está directamente relacionado con la actividad antimicrobiana [103–105].

GIBIM-P2	GIBIM-P3	GIBIM-P4	GIBIM-P5
P0C5X3.1	gb 8265	P14954.1	P84596.1
P0C5X4.1	P82592.2	Q95VE8	P85054.1
P0C5X2.1	P08377.1	Q06589	P0C5X2.1
P0C5X5.1	P14956.1	P08376.2	P83951.2
P0C5X2.1	P08375.1	P08375.1	P84274.1
P84263.1	P08376.2	P08377	ABG76543.1
P85055.1	P14954.1	GIBIM-P4	P0C8T9.1
P40846.1	GIBIM-P3		
ABG76289.1			
ABG76543.1			
CAI91310.1			

Tabla 4. Número de acceso en el GenBank de proteínas homologas a los péptidos GIBIM-P2 a GIBIM-P4.

La cationicidad de las PAMs representa el principal factor de contacto con la superficie bacteriana de carga opuesta a través de interacciones electrostáticas para facilitar su acción [106–108]. Además, la presencia de aminoácidos específicos en la posición precisa en la cadena peptídica es igualmente crucial para la expresión de la actividad antimicrobiana. Esto sucede probablemente debido a que los aminoácidos, poseen una gran variedad de propiedades fisicoquímicas, cada uno con su único grupo funcional de cadena lateral. Adicionalmente, la asignación de aminoácidos en la posición precisa de la cadena peptídica aseguraría la integridad estructural y la estabilidad de los PAMs de forma

conservada, para garantizar la interacción específica con la diana. En cuanto a la hidrofobicidad, esta característica les permite a los péptidos penetrar en las células e inducir la lisis de las membranas [109]. Además, un aumento en la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de los PAMs se correlaciona con su baja selectividad y toxicidad hacia las células mamíferas. Del mismo modo, la estructura anfipática de los PAMS facilita su interacción con la membrana celular y su posterior inserción en la matriz de los fosfolípidos [110].

Por lo anterior, en el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P3A6K, GIBIM-P5T2K y GIBIM-P5S9K, los residuos de alanina (A), treonina (T) y serina (S), respectivamente fueron reemplazados por lisina (K) para aumentar el carácter catiónico de los péptidos. En el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P2G17I, GIBIM-P2G17L, GIBIM-P4A1I, GIBIM-P4A1V y GIBIM-P4N2F, el aminoácido subrayado se cambió por isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y fenilalanina (F), respectivamente para aumentar su hidrofobicidad. Finalmente, los péptidos GIBIM-P2G13N, GIBIM-P3A3G, GIBIM-P3T5S y GIBIM-P5F8W, el aminoácido subrayado fue sustituido por asparagina (N), glicina (G), S y triptófano (W), respectivamente para aumentar la probabilidad de ser péptido antimicrobiano (PAP).

Los 18 PAMs diseñados, presentaron un PAP mayor al 96% e índice de inestabilidad <40, asegurando con este parámetro que los péptidos tendrían un tiempo de vida media *in vivo* mayor a 16 h [111], excepto para el péptido GIBIM-P3A6K (Tabla 5). Además, las características fisicoquímicas, tales como punto isoeléctrico (pI) y el promedio del índice de hidropatía (GRAVY, por sus siglas en inglés) de los péptidos diseñados y sus análogos se encuentran registrados en la Tabla 5.

Los péptidos GIBIM-P6, GIBIM-P3, GIBIM-P4 y los análogos de estos dos últimos obtuvieron la mayor carga neta positiva (entre 5 y 6), seguidos del péptido GIBIM-P5 y sus análogos (carga neta entre 4 y 5). No obstante, los péptidos con el mayor carácter hidrofóbico fueron GIBIM-P2G17I y GIBIM-P2G17L con un índice de

hidropatía de 1.18 y 1.14, respectivamente. En la figura 9, se presenta la estructura secundaria simulada de los péptidos análogos. Por otra parte, estas modificaciones

en las secuencias peptídicas originales no afectaron la estructura secundaria α -hélice de los doce análogos, conservando la misma estructura de carácter anfipática (Fig. 9 y 10).

2.2.2 Síntesis simultánea mediante la estrategia Fmoc/tBu y caracterización de los PAMs diseñados

Los 18 péptidos se sintetizaron mediante la metodología Fmoc/tbu en bolsitas de té y una parte de los péptidos se marcaron con el fluorocromo de rodamina en la región N-terminal. La secuencia y estructura química de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos se encuentra en el anexo E. Luego, se purificaron por RP-HPLC obteniéndose en todos los cromatogramas una señal principal, sin presencia de deleciones (Anexo F). El producto final (Fig. 11) se obtuvo con un grado de pureza aproximadamente del 95-98%, según el área bajo la curva calculada, ya que no se cuentan con patrones. Además, se presentaron diferentes tiempos de retención indicando que los péptidos interactuaban de forma diferentes con la fase estacionaria de la columna C_{18} (Tabla 5).

En todos los casos fue posible confirmar la secuencia primaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos mediante el análisis de masas MALDI-TOF como se muestra en el anexo G. La masa molecular teórica y experimental de cada péptido se encuentra registrado en la Tabla 5.

Los resultados obtenidos a partir del análisis por esta técnica sugieren que los péptidos fueron sintetizados satisfactoriamente, ya que los datos experimentales de

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados y sus análogos.

Péptido	Secuencia	Carga Neta	T _R (min)	MW(Da)	[M+H] ⁺ (Da)	PAP(%) ^a	pI	Ind. Inest. ^b	GRAVY ^c
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSLMKWGGI-NH₂	3	1.91	1913.10	1914.33	96.5	10.30	5.65	0.28
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH₂	3	1.91	1704.03	1706.52	99.3	10.30	-17.25	0.89
GIBIM-P2G17I	GFLGKGLFSVVKGVKLG I -NH ₂	3	1.91	1760.10	1762.66	99.5	10.30	-17.25	1.18
GIBIM-P2G17L	GFLGKGLFSVVKGVKLG L -NH ₂	3	1.93	1760.10	1762.74	99.5	10.30	-17.25	1.14
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVK N VKLG-NH ₂	3	1.92	1761.06	1764.78	99.3	10.30	-12.26	0.71
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKLGKRI-NH₂	5	1.89	1880.15	1882.95	96.7	12.02	23.13	-0.29
GIBIM-P3A3G	NV G AATARGWLKKLGKRI-NH ₂	5	1.90	1866.13	1869.99	96.4	12.02	13.14	0.42
GIBIM-P3T5S	NVAA S ARGWLKKLGKRI-NH ₂	5	1.89	1866.13	1868.10	97.2	12.02	23.13	-0.29
GIBIM-P3A6K	NVAAT K RGWLKKLGKRI-NH ₂	6	1.88	1938.19	1939.26	98.0	12.03	42.31	-0.62
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKIGKK-NH₂	5	1.90	1811.10	1812.20	98.7	11.33	3.95	-0.37
GIBIM-P4A1I	I NVAATARGWLKKIGKK-NH ₂	5	1.89	1853.13	1853.78	99.3	11.33	3.95	-0.21
GIBIM-P4A1V	V NVAATARGWLKKIGKK-NH ₂	5	1.88	1839.11	1839.86	98.9	11.33	3.95	-0.23
GIBIM-P4N2F	A F VAAATARGWLKKIGKK-NH ₂	5	1.89	1844.10	1846.91	98.5	11.33	3.95	0.00
GIBIM-P5	ATKKCGLFSILKGVGKI-NH₂	4	1.89	1762.04	1762.96	97.0	10.04	-4.23	0.56
GIBIM-P5T2K	A K KKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	5	1.89	1789.10	1791.10	96.6	10.20	-4.23	0.37
GIBIM-P5S9K	ATKKCGLF K ILKGVGKI-NH ₂	5	1.90	1803.11	1804.19	96.0	10.20	-18.06	0.38
GIBIM-P5F8W	ATKKCGL W SILKGVGKI-NH ₂	4	1.90	1801.05	1802.24	97.0	10.04	9.70	0.35
GIBIM-P6	NVAATARGWLKKIGKKI-NH₂	5	1.89	1853.13	1855.43	98.5	11.33	-1.04	-0.212

^aPorcentaje de probabilidad de ser un péptido antimicrobiano

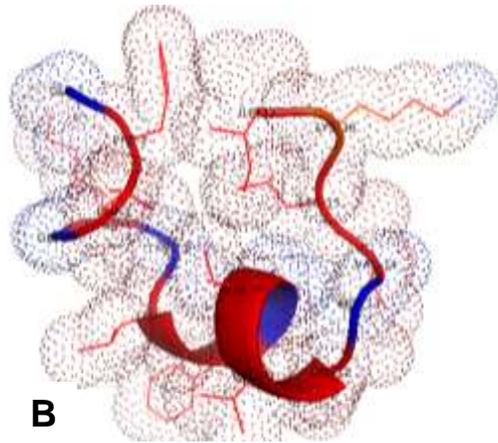
^bÍndice de inestabilidad

^cPromedio del índice de Hidropatía

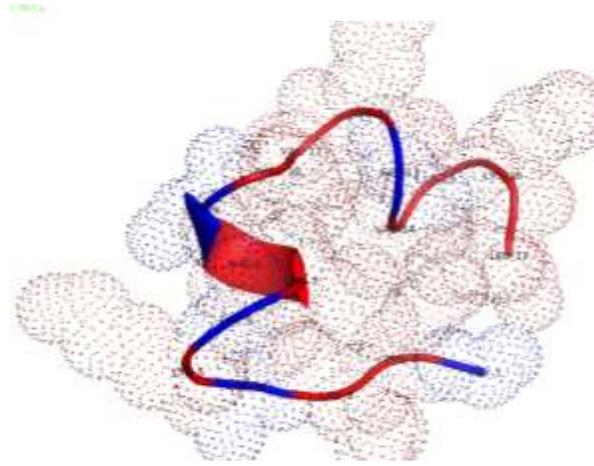
Figura 9. Estructura secundaria simulada de los péptidos análogos. A) Análogos de GIBIM-P2 y B) Análogos de GIBIM-P3. Los residuos hidrofóbicos se muestran en rojo y los hidrofílicos en azul. La estructura secundaria fue simulada en línea usando el servidor de predicción PEP-FOLD 3.1: <http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>

A

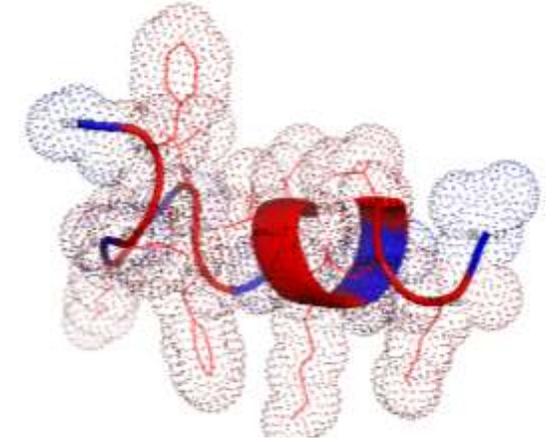
GIBIM-P2G17I: GFLGKGLFSVVKGVLKI



GIBIM-P2G17L: GFLGKGLFSVVKGVLKL

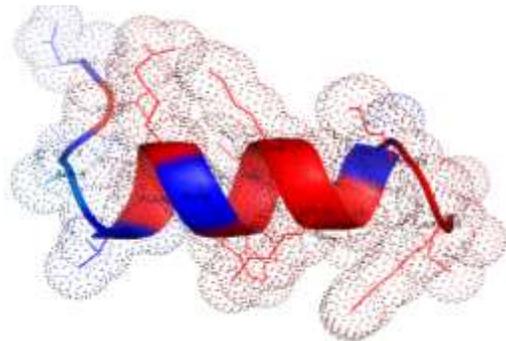


GIBIM-P2G13N: GFLGKGLFSVVKNVLKG

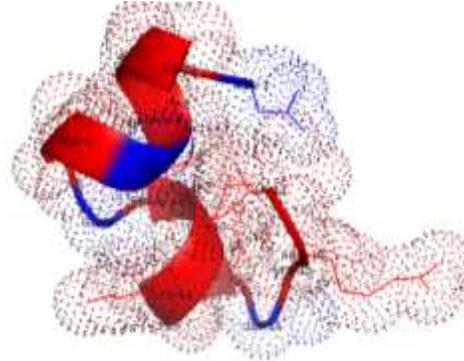


B

GIBIM-P3A3G: NVGATARGWLKKGKRI



GIBIM-P3T5S: NVAASSARGWLKKGKRI



GIBIM-P3A6K: ATKKCGLWSILKGVGKI

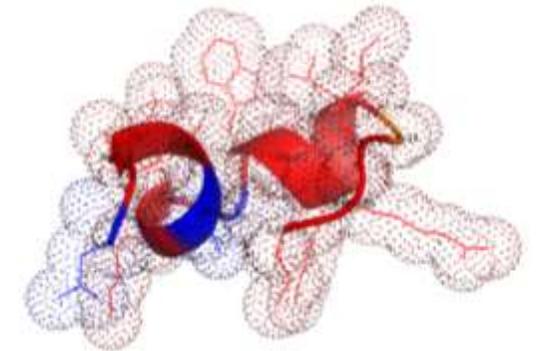


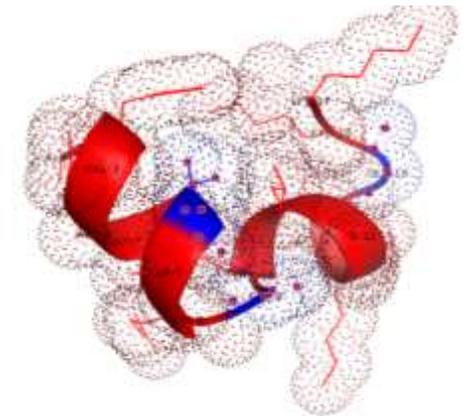
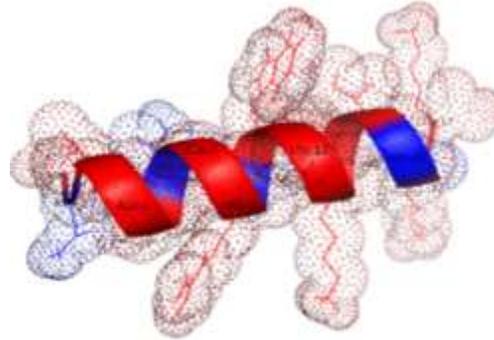
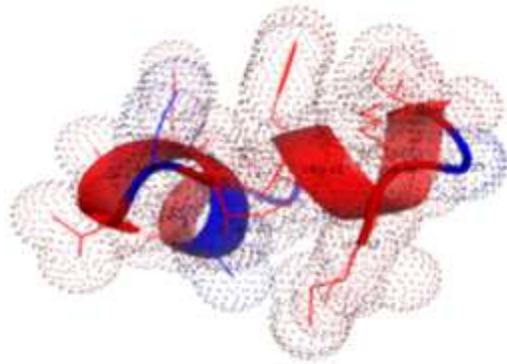
Figura 10. Estructura secundaria simulada de los péptidos análogos. A) Análogos de GIBIM-P4 y B) Análogos de GIBIM-P5. Los residuos hidrofóbicos se muestran en rojo y los hidrofílicos en azul. La estructura secundaria fue simulada en línea usando el servidor de predicción PEP-FOLD 3.1: <http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>

A

GIBIM-P4A1I: INVAATARGWLKKIGKK

GIBIM-P4A1V: VNVAATARGWLKKIGKK

GIBIM-P4N2F: FNVAATARGWLKKIGKK



B

GIBIM-P5T2K: AKKKCGLFSILKGVGKI

GIBIM-P5S9K: ATKKCGLFKILKGVGKI

GIBIM-P5F8W: ATKKCGLFKILKGVGKI

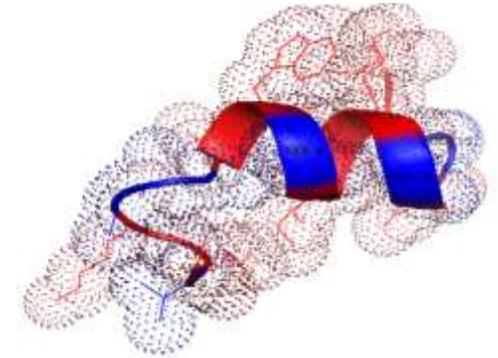
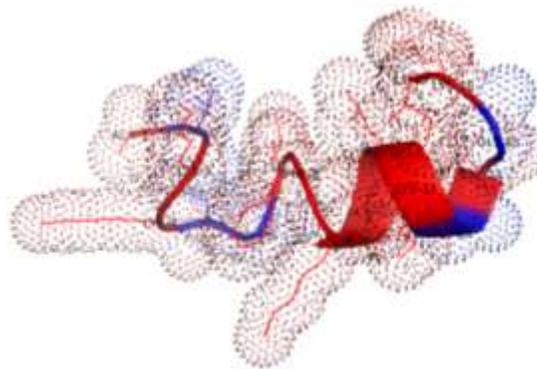
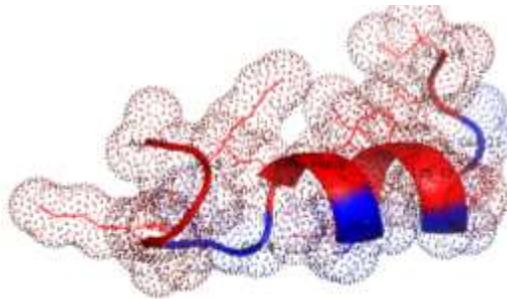


Figura 11. Péptidos sintéticos obtenidos por la metodología F-moc.



m/z (unidades de masa) para cada uno fueron acordes con sus respectivas masas moleculares obtenidas teóricamente.

Por otro lado, la proyección de la rueda helicoidal de Schiffer-Edmundson fue determinada para cada péptido como se muestra en las figuras 12 y 13 (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>), en donde el residuo más hidrofóbico es verde, y la cantidad de verde disminuye proporcionalmente a la hidrofobicidad, con cero de hidrofobicidad codificada como amarillo. Los residuos cargados positivamente son de color gris y los residuos hidrófilos están codificados en naranja. El diagrama revela una conformación de carácter anfipático para los péptidos, mostrando que todos los residuos de aminoácidos hidrófilos de estos compuestos están situados en un lado, mientras que los residuos de aminoácidos hidrófobos están en el otro lado de la hélice.

Además, con relación a la estructura secundaria de los péptidos sintéticos y análogos, se determinó el espectro de DC en condiciones simuladas de membrana en presencia de TFE/H₂O a una concentración de 30 %v/v. Los péptidos adoptaron

Figura 12. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos GIBIM-P1 A GIBIM-P4A1V. Por defecto, se presenta los residuos hidrófilos como círculos, residuos hidrófobos como rombos, potencialmente cargados negativamente como triángulos y potencialmente con cargas positivas como pentágonos.

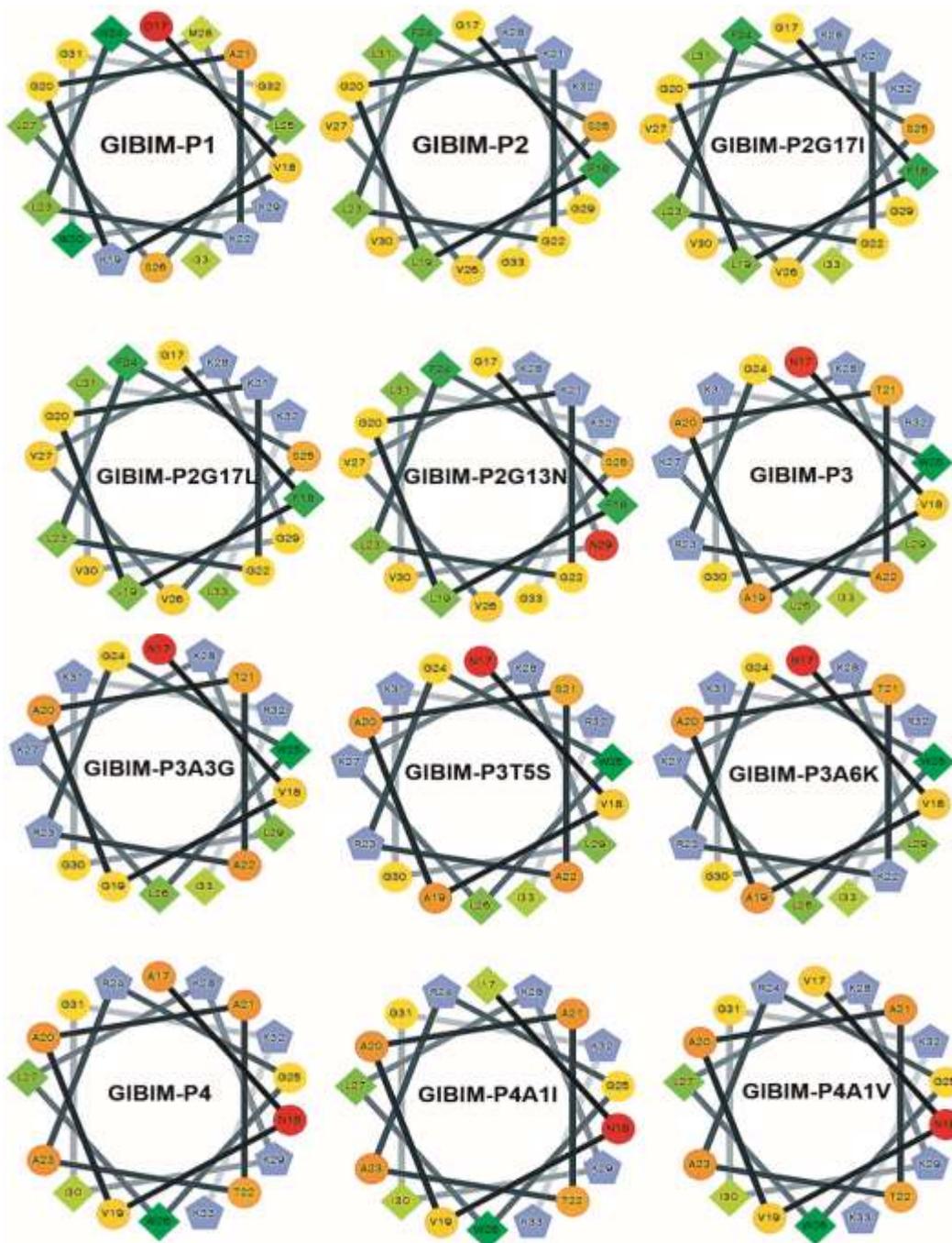
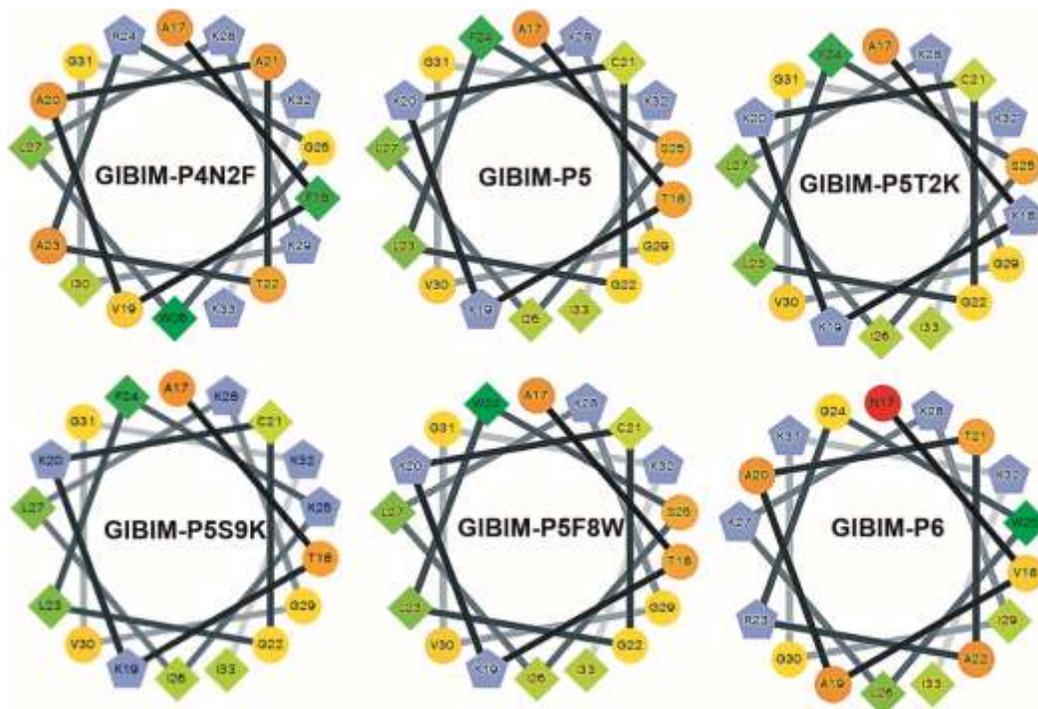


Figura 13. Proyecciones de rueda helicoidal de los péptidos GIBIM-P4N2F a GIBIM-P6. Por defecto, se presenta los residuos hidrófilos como círculos, residuos hidrófobos como rombos, potencialmente cargados negativamente como triángulos y potencialmente con cargas positivas como pentágonos.



una estructura α -hélice, exhibiendo un mínimo de dos bandas negativas a 205 y 215 nm, lo que indica que adoptan una estructura α -hélice bien definida como se ha registrado en investigaciones previas [112–114]. Como ejemplo se presentan en las figuras 14 y 15 los espectros de DC de los péptidos diseñados y análogos de GIBIM-P2, respectivamente. La estructura secundaria se ha establecido como un prerequisite para la actividad antimicrobiana [112,113].

En la tabla 6 se observa que todos los péptidos tuvieron un porcentaje helicoidal mayor al 2.4%, siendo el análogo GIBIM-P2G17L con menor estructura helicoidal. Mientras que el péptido GIBIM-P3 exhibió la mayor estructura helicoidal, la cual fue tomada como referencia (100%). Estos resultados indicaron que la cara hidrófoba no disruptiva a lo largo de la cara no polar del péptido estabiliza la estructura helicoidal

Figura 14. Espectros de DC de los péptidos diseñados. Los valores de tres scans se promediaron por muestra, y las concentraciones de péptido se fijaron a 150 μM .

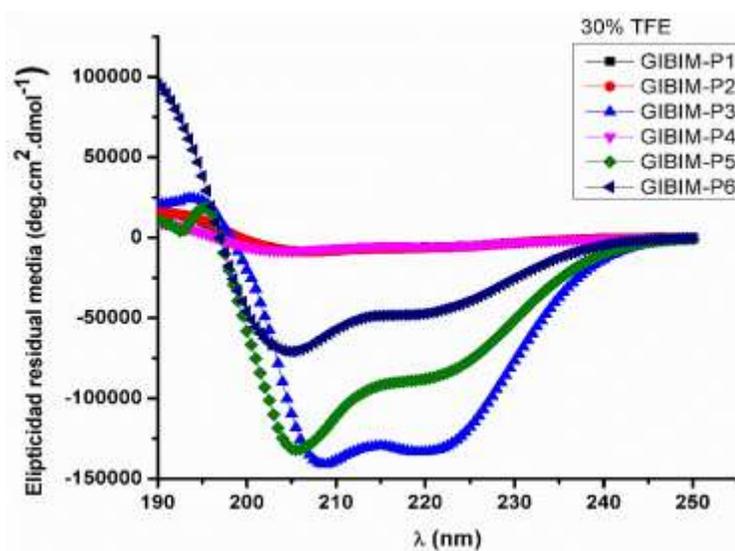


Figura 15. Espectros de DC de los péptidos análogos a GIBIM-P2. Los valores de tres scans se promediaron por muestra, y las concentraciones de péptido se fijaron a 150 μM .

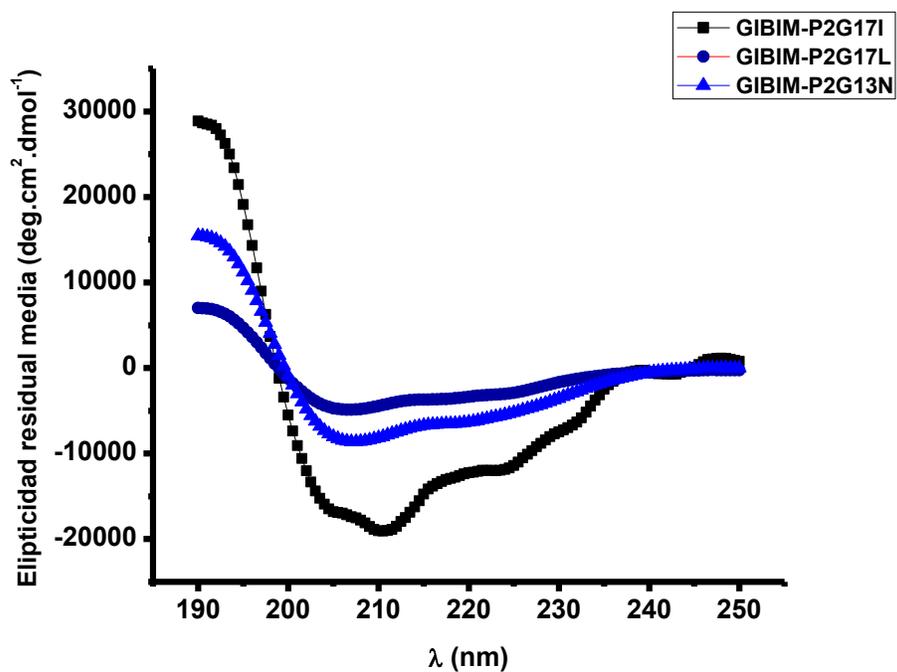


Tabla 6. Datos del DC dicrósmo circular de los péptidos.

Péptido	[θ]₂₂₂	% Hélice
GIBIM-P1	-5584.01	4.3
GIBIM-P2	-6078.55	4.6
GIBIM-P2G17I	-11985.6	9.2
GIBIM-P2G17L	-3162.54	2.4
GIBIM-P2G13N	-5916.88	4.5
GIBIM-P3	-130804	100.0
GIBIM-P3A3G	-85721.2	65.5
GIBIM-P3T5S	-5493.67	4.2
GIBIM-P3A6K	-8515.4	6.5
GIBIM-P4	-5253.31	4.0
GIBIM-P4A1I	-4241.47	3.2
GIBIM-P4A1V	-82558.7	63.1
GIBIM-P4N2F	-40880.2	31.3
GIBIM-P5	-85015.5	65.0
GIBIM-P5T2K	-34259.1	26.2
GIBIM-P5S9K	-23084	17.6
GIBIM-P5F8W	-19221.3	14.7
GIBIM-P6	-44706.5	34.2

*La elipticidad residual media [θ]₂₂₂ (deg.cm².mol⁻¹) a una longitud de onda de 222 nm fue medida a 25 °C.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS GIBIM-P1 A GIBIM-P6 Y ANÁLOGOS

RESUMEN

Los PAMs constituyen agentes terapéuticos muy interesantes frente a enfermedades infecciosas, debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana, baja tendencia a desarrollar resistencia, rápida eliminación de patógenos, una variedad de mecanismos de acción y sinergismo con antibióticos clásicos [115–117].

Se han desarrollado diferentes estudios basados en la búsqueda de nuevos péptidos con propiedades mejoradas que incluyen actividad, en muchos casos la estabilidad y biodisponibilidad [118–120]. Un ejemplo de ellos es el PAM MSI-78, desarrollado a partir de la magainina-2, producido por “Genaera Corporation”, con acción antibacteriana mejorada, incluso contra bacterias multirresistentes [121]. Por ejemplo, la actividad del péptido hLF1-11 (GRRRRSVQWCA), derivado de la lactoferrina (LF) humana, mejoró su actividad en relación con la LF entre tres a seis veces, si frente a SARM, *Acinetobacter baumannii* multirresistente (AbMDR) y *Candida albicans* invasiva resistente a fluconazol. El potente efecto antimicrobiano de LF1-11 se atribuye a las dos primeras argininas en la región N-terminal de la LF humana [122]. Asimismo, tres péptidos análogos derivados de lactoferrampina (LFampin) mostraron una actividad mejorada con respecto a la secuencia original, frente a *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica [123]. La optimización del PAM pudo

conseguirse, realizando una sola sustitución de W por T en la posición 9 de la secuencia del péptido con carácter anfipático RI16 en la cara hidrófoba, aumentando actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* [124].

Por otro lado, los PAMs son también excelentes candidatos para el diseño de nuevos agentes antiprotozoarios [125, 126]. Sin embargo, esta posibilidad no ha sido plenamente investigada o explotada. Las razones de la falta de investigación en esta área pueden atribuirse, en parte, al hecho de que muchas infecciones parasitarias son más prevalentes en los países en vía desarrollo y que la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios es considerada como una prioridad relativamente baja por las compañías farmacéuticas. Sin embargo, los PAMs poseen varios atributos atractivos como agentes potenciales antileishmaniales, incluyendo la falta de toxicidad hacia las células de mamífero en concentraciones requeridas para matar parásitos de *Leishmania*.

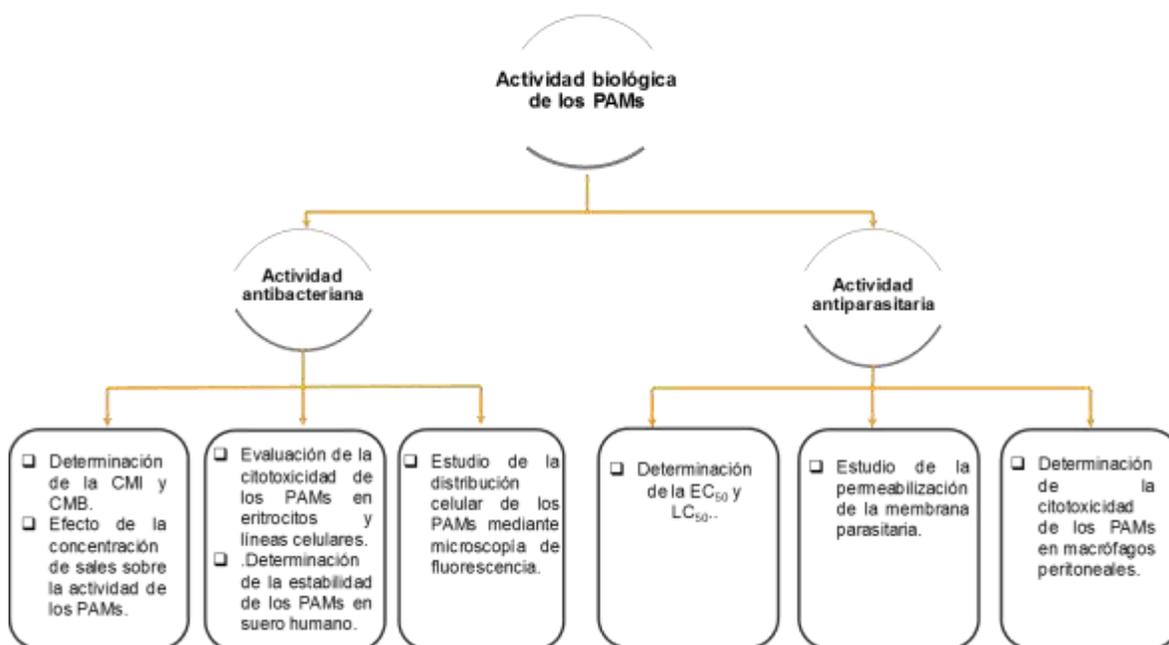
Además, algunos estudios indican que los PAMs ejercen su actividad antileishmanial a través de una interrupción de las membranas biológicas, un mecanismo que es considerablemente diferente de los utilizados por los otros medicamentos disponibles. Este nuevo mecanismo de acción puede proporcionar agentes antileishmaniales basados en PAMs con la capacidad de superar la resistencia observada con los fármacos existentes, permitiendo así su uso potencial en terapias de combinación [127].

En el presente capítulo se presentan los resultados relacionados con la evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos diseñados GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos, frente a *E. coli* O157: H7, SARM y *P. aeruginosa*. Asimismo, se evaluó la actividad antiparasitaria de los PAMs frente a *Leishmania* y la actividad hemolítica frente a eritrocitos de carnero. Además, se estudió la estabilidad de los péptidos más activos frente a las enzimas proteolíticas y sales presentes en suero

fisiológico. Adicionalmente, se determinó permeabilización de la membrana bacteriana y parasitaria frente a los péptidos más activos, mediante el ensayo de absorción de Sytox Green. También, se observó la distribución celular del péptido GIBIM-P5S9K en las cepas patógenas mediante microscopía de fluorescencia. Por lo anterior, se determinó que algunos péptidos análogos y diseñados pueden ser considerados como candidatos a agentes antimicrobianos.

3.1 METODOLOGÍA

En el Esquema 3 se muestra la metodología general que se llevó a cabo para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos diseñados.



Esquema 3. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 3.

3.1.1. Materiales y reactivos

Las tres cepas bacterianas *E. coli* O157: H7, *P. aeruginosa* y SARM fueron donadas por la Escuela de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. La línea celular de tipo epitelial de carcinoma de pulmón humano A549 y HepG2 fue donada por el "Laboratorio

de oxidación de cultivos celulares y biológicos" de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (Brasil). Los parásitos promastigotes de *Leishmania donovani* (L. donovani) y amastigotes de *Leishmania pifanoi* fueron donados por el Dr. Luis Rivas del Centro de Investigaciones biológicas (CSIC, Madrid, España).

Los medios de cultivo Müller Hilton (MH), infusión de cerebro y corazón (BHI) y Luria Bertani (LB) fueron adquiridos de Oxoid (Basingstoke, Inglaterra). El medio M199 fue adquirido de GIBCO (Invitrogen, CA). Los reactivos de Lisostafina, Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), Dimetilsulfoxido (DMSO) y Tritón X-100 fueron adquiridos de Sigma (Sigma, ST Louis, MO). El antibiótico de Ofloxacina fue adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania). Los péptidos fueron disueltos en solución tampón fosfato (1 mM, pH=7.2)

3.1.2. Determinación de la actividad antibacteriana de los PAMs

El método de microdilución para la estimación de los valores de CMI se realizó en placas multipocillo de ELISA de acuerdo con los protocolos publicados por otros autores con algunas modificaciones [123].

Inicialmente, se preparó un preinóculo de SARM en caldo MH y de las cepas gram-negativas, *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa*, en LB agitando el caldo bacteriano a una velocidad de 200 rpm a 37°C durante 14h. Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando el preinóculo bacteriano en microplacas tipo ELISA que previamente contenían los PAMs diseñados y análogos a diferentes concentraciones (entre 0.5 y 80 µM) a 37°C con una agitación de 200rpm durante 8h. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración de péptido que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI₉₉ corresponden a las dosis que inhiben el 99% de crecimiento bacteriano.

Posterior a la determinación de la CMI, se estableció la CMB. Se utilizaron los cultivos de SARM que fueron inhibidos por los péptidos durante la determinación de CMI. Se tomaron

muestras de estos cultivos y se inocularon en el caldo de cultivo Infusión de cerebro-corazón (BHI) en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas.

A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó la siembra en superficie de cajas de Petri que contenían BHI agar con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de CMB se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con péptido). Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.3. Evaluación de las sales sobre la actividad antibacteriana de los PAMs

Para evaluar la susceptibilidad salina de los péptidos más activos, se determinó la actividad antimicrobiana en presencia de diferentes concentraciones de sales que se encuentran presentes en el suero fisiológico: NaCl 150 mM, KCl 4,5 mM y 1mM de MgCl₂ [124]. Una solución a una concentración inicial de 200 mM de cada sal se esterilizó y se llevó a la concentración final fisiológica deseada para el ensayo a un volumen de 200 µL en cada pocillo de la microplaca. La determinación de la CMI se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 3.1.2. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.4. Determinación de la CMI del enantiómero D-GIBIM-P5F8W

Por otro lado, con el fin de comprobar si la quiralidad del péptido GIBIM-P5F8W tiene un papel fundamental en la actividad antimicrobiana, su enantiómero D-GIBIM-P5F8W fue sintetizado y donado por el grupo del Grupo de Investigación de Química Combinatoria para el Desarrollo de Nuevos Compuestos dirigido por el Dr. Fernando Albericio (Barcelona, España). El enantiómero D-aminoácido fue caracterizado estructural (Anexo H) y funcionalmente determinando la actividad de la misma forma como se realizó con el enantiómero L [128]. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.5 Determinación del grado de hemólisis de los PAMs en eritrocitos de carnero

La actividad hemolítica de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos se determinó midiendo la hemólisis en eritrocitos carnero inducida por estos compuestos, como se ha realizado en previos estudios [129]. Como control positivo se utilizó una suspensión que contenía los eritrocitos y Tritón X-100 al 1%. Esta combinación produce el 100% de hemólisis.

El porcentaje de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación 3:

Hemolisis (%) = $(A_s - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$ (3), donde A_s es la absorbancia de la muestra, A_{100} es la absorbancia de los eritrocitos lisados completamente en 0,1% Tritón X-100 y A_0 es la absorbancia en ausencia completa de hemólisis. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.6 Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de los PAMs

La citotoxicidad de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana se determinó *in vitro*, de acuerdo con el método publicado por Fernández-Reyes, Nakhjavani y col. [129, 130]. Para el ensayo se cultivó una línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 y HepG2 en medio Eagle Modificado (EMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Se colocaron 7500 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 mL en medio; después se incubaron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C, durante 24 h. La viabilidad celular se determinó midiendo absorbancia a 550nm en un lector de microplacas (Thermo). El control positivo de lisis celular se realizó con Triton X-100 al 0,1%, el cual ocasionó una lisis del 100%. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.7 Determinación de la estabilidad de los PAMs GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en suero humano

Se determinó la estabilidad de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en suero humano de acuerdo con lo descrito por Nguyen, Kim y col., [131, 132] con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó una suspensión que contenía los PAMs a

una concentración final de 100 μ M y suero humano deslipidado al 10%, y se incubó a 37°C durante 360 min. A continuación, se tomaron alícuotas de 500 μ l de estas soluciones en diferentes momentos y se centrifugaron en ultrafiltros Amicon de 3kDa para separar el suero y el péptido. Los péptidos se cuantificaron usando RP-HPLC. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

3.1.8 Estudio de la distribución celular del péptido GIBIM-P5S9K mediante microscopía confocal de fluorescencia

Las cepas de *E. coli* O157: H7, *P. aeuroginosa* y SARM fueron incubadas en la presencia del péptido GIBIM-P5S9K marcados con Rodamina en un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP5 II (Berlín, Alemania) para determinar la distribución celular de estos compuestos. Alícuotas de cultivos bacterianos en la fase logarítmica media se centrifugaron (2500 g x 5 min) y se resuspendieron en la presencia de los péptidos marcados con Rodamina en tampón salino isotónico (PBS) durante 1.5 horas. Las células bacterianas fueron marcadas con el fluorocromo de TO-PRO®-3. La fluorescencia se observó usando los filtros apropiados. Las imágenes fueron analizadas el software por Leica Aplicación Suite fluorescencia avanzada (LAS AF) en un formato de 512x512 píxeles [133].

Por otro lado, con el fin de evidenciar el amplio espectro de actividad de los péptidos, éstos fueron evaluados en parásitos amastigotes de *Leishmania pifanoi* y promastigotes de *Leishmania donovani* para determinar si también presentaban actividad antiparasitaria. La sección experimental que se presenta a continuación fue desarrollada en el grupo de investigación de péptidos antibióticos eucarióticos adscritos al Centro de investigaciones Biológicas, el cual está dirigido por el Dr. Luis Ignacio Rivas López y se encuentra ubicado en la ciudad de Madrid, España.

3.1.9 Determinación de la actividad antiparasitaria de los PAMs

La metodología para determinación de la actividad antiparasitaria, fue la descrita por Silva y col.,[134]. Los parásitos ensayados fueron *Leishmania donovani* y

Leishmania pifanoi, a una densidad de 2×10^7 parásitos/mL en una solución salina de Hanks (137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 4.2 mM NaHCO_3 y 0.4 mM Na_2HPO_4 , pH = 7.2) suplementada con D-glucosa 10 mM. La actividad del péptido GIBIM-P1, GIBIM-P6 y análogos se determinó a una concentración de 25 μM mediante la inhibición de la reducción del MTT a corto plazo (4h) y bajo condiciones de proliferación (72h). La EC_{50} se definió como la concentración efectiva de péptido que causa el 50% de inhibición de la reducción de MTT a 4 h de incubación y el LC_{50} determinó como la concentración de péptido que causa 50% de inhibición en la proliferación de *Leishmania*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones de esterilidad.

3.1.10 Evaluación de la permeación de la membrana bacteriana y parasitaria causada por los PAMs

Se utilizó la sonda verde fluorescente SYTOX para determinar la permeabilización de la membrana bacteriana y parasitaria como se ha publicado previamente [129, 135]. Para esto, se transfirieron alícuotas de 100 μl del cultivo bacteriano (1×10^6 UFC/ml) y de la suspensión celular (2×10^7 parásitos/mL) con SYTOX verde 1 μM en Hanks + glucosa a una placa negra de 96 pocillos y se incubaron a la temperatura necesaria para el crecimiento de cada microorganismo. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Polarstar Galaxy ($\lambda_{\text{exc}} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$). Una vez alcanzada la fluorescencia basal, se añadieron los péptidos a una concentración de 25 μM a estos pocillos y la fluorescencia se monitoreó durante 40 min. La permeabilización máxima (100%) de bacterias patógenas gram-negativas, SARM y los parásitos se obtuvo mediante la adición de 4 μM del péptido CAME(1-8) M (118) más 0,1% de Tritón X-100, Lisostafina (0,07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de concentración final) más 0,1% de TX-100 y Triton X-100 al 0.1%, respetivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.1.11 Determinación de la citotoxicidad de los péptidos en macrófagos peritoneales

Los macrófagos fueron obtenidos del peritoneo de ratones BALB/c sacrificados por dislocación cervical, que fueron manipulados en todo momento bajo condiciones

de esterilidad. Los macrófagos peritoneales BALB/c se resuspendieron a una densidad final de 10⁶ células/mL en medio de cultivo desprovisto de rojo fenol. Se sembraron luego en una microplaca de cultivo de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se incubaron con los péptidos más activos a diferentes concentraciones durante 4 h A 37 °C. La citotoxicidad se evaluó utilizando el ensayo colorimétrico de reducción de MTT y se expresó como el porcentaje del valor obtenido para las células de control [136].

3.1.12 Análisis estadístico

Los datos experimentales se representan como media ± desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se examinaron con análisis unidireccional de la varianza utilizando el sistema SPSS 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se consideró que $p < 0,05$ indica una diferencia estadísticamente significativa.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 Actividad antibacteriana

Los péptidos catiónicos diseñados inhibieron el crecimiento de la bacteria Gram-positiva MRSA y de las bacterias Gram-negativas *E. coli* O157: H7 y *P. aeruginosa* de una manera dosis dependiente de la concentración (Tabla 7). En general, al menos once de los 18 péptidos evaluados mostraron ser activos frente a las cepas patógenas a una concentración igual o inferior a 100 µM. En todos los ensayos de actividad antibacteriana la ofloxacina fue usada como control positivo ya que es un fármaco de amplio espectro usado frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

El péptido diseñado a partir del algoritmo genético con mayor actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas fue GIBIM-P6, con un CMI₉₉ de 5.0 µM frente a *E. coli* O157: H7, y 10 µM contra SARM y *P. aeruginosa*. En segundo lugar, los tres PAMs GIBIM-P4, GIBIM-P3 y GIBIM-P5 presentaron una CMI₉₉ de 50 µM frente a *E. coli* O157: H7, 25 µM frente a SARM y 10 µM frente a *P.*

aeruginosa, respectivamente. Con el diseño de los PAMs análogos estos valores resultaron aún mejores. Por ejemplo, los PAMs análogos GIBIM-P5F8W y GIBIM-P5S9K, con una CMI₉₉ de 5.0 y 25 µM frente a *S. aureus*, respectivamente; 50 y 100 µM frente a *E. coli* O157: H7 y más interesante aún 10 µM frente a *P. aeruginosa*. Los análogos antes comentados, se diseñaron a partir de la sustitución de un aminoácido de la secuencia del péptido GIBIM-P5, con lo cual se logró aumentar hidrofobicidad (cambiando F por W) y carga (cambiando S por K).

Por el contrario, algunas modificaciones fueron desfavorables y disminuyeron la actividad de los análogos con respecto al péptido tomado como referencia. Un ejemplo es el análogo GIBIM-P2G17L que presentó una menor actividad comparada con el péptido GIBIM-P2, esto debido a que la CMI₉₉ del análogo fue mayor a 100 µM. Los resultados indican que las sustituciones en la región C-terminal no producen efecto sobre la hidrofobicidad y por lo tanto no afectan la actividad antimicrobiana. Sin embargo, otros estudios han demostrado que este tipo de sustituciones pueden afectar la estabilidad del PAM [137].

Por otro lado, la actividad de los PAMs GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P4 presentaron importantes valores de CMI₉₉ de 50 µM y 25 µM frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente. Cabe resaltar que todos los PAMs diseñados y sintetizados se encontraban en la región C-terminal amidados, con el fin de neutralizar la carga negativa creada por el grupo ácido COOH C-terminal. Esta modificación se añade para evitar la degradación enzimática, favorecer la imitación de proteínas nativas y en algunos casos, evitar la unión del extremo C-terminal de los péptidos con iones hidrógeno u otros grupos reactivos, que podrían ocasionar interferencia en los ensayos [138].

Los PAMs son moléculas altamente específicas, por este motivo pueden interactuar de forma diferente con las bacterias patógenas afectando la actividad. Por ejemplo,

Tabla 7. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.

Péptido	Secuencia	<i>E. coli</i> O157:H7 (μM)		SARM (μM)		<i>P. aeruginosa</i> (μM)		Hemólisis (μM)	Toxicidad en macrófagos (μM)
		MIC ₉₉	MBC	MIC ₉₉	MBC	MIC ₉₉	MBC	HC ₅₀	EC ₅₀
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSLMKWGGI-NH₂	50	>100	25	>100	>100	>100	> 50	10.0
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH₂	100	>100	75	>100	>100	>100	> 50	-----
GIBIM-P2G17I	GFLGKGLFSVVKGVK I -NH ₂	50	>100	75	>100	>100	>100	> 50	-----
GIBIM-P2G17L	GFLGKGLFSVVKGVK L -NH ₂	>100	>100	50	100	>100	>100	> 50	4.0
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVK N VKLG-NH ₂	100	>100	100	>100	100	>100	> 50	8.0
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKGKRI-NH₂	50	100	25	75	>100	>100	> 50	>25
GIBIM-P3A3G	NV G ATARGWLKKGKRI-NH ₂	75	>100	100	>100	50	>100	> 50	-----
GIBIM-P3T5S	NVAAS S ARGWLKKGKRI-NH ₂	100	>100	75	>100	75	>100	> 50	-----
GIBIM-P3A6K	NVAAT K RGWLKKGKRI-NH ₂	75	100	>100	>100	100	>100	> 50	-----
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKGK-NH₂	50	75	50	75	100	>100	> 50	-----
GIBIM-P4A1I	I NVAATARGWLKKGK-NH ₂	>100	>100	50	100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P4A1V	V NVAATARGWLKKGK-NH ₂	50	>100	75	>100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P4N2F	F VVAATARGWLKKGK-NH ₂	75	>100	100	>100	50	>100	> 50	-----
GIBIM-P5	ATKCCGLFSILKGVGKI-NH₂	100	>100	100	>100	10	>100	> 50	-----
GIBIM-P5T2K	K KKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	50	>100	75	100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P5S9K	ATKCCGLF K ILKGVGKI-NH ₂	10	50	25	75	10	>100	> 50	4.0
GIBIM-P5F8W	ATKCCGL W SILKGVGKI-NH ₂	0,5	10	5,0	50	10	75	> 50	2.5
GIBIM-P6	NVAATARGWLKKGK-NH₂	5,0	25	10	25	10	>100	> 50	13,0
Ofloxacina		8,8	>8,8	3,6	>5,5	2,8	5,5	-----	-----

Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

si comparamos la actividad de los PAMs (Tabla 7) frente a las dos cepas gram-negativas, *P. aeruginosa* y *E. coli* O157:H7, podemos observar que presentan un mayor efecto sobre esta última cepa. Esto puede ser debido a que *P. aeruginosa* posee una permeabilidad de membrana externa extremadamente escasa, haciendo que las bombas de eflujo sea un mecanismo de defensa contra estas moléculas [139].

Los PAMs GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P5S9K presentaron alta actividad antibacteriana contra MRSA, alcanzando valores comparables a los de otros péptidos cíclicos anfifílicos y sus análogos, que han sido diseñados contra patógenos multirresistentes; específicamente, el péptido cíclico [R4W4], el PAM más potente contra SARM descrito hasta la fecha con una CMI₉₉ de 2,67 µg/mL [140].

Asimismo, se demostró la capacidad de la estrategia propuesta para diseñar y optimizar péptidos; el GIBIM-P5S9K aumentó diez veces la actividad antimicrobiana comparada con el péptido de original GIBIM-P5 contra *E. coli* y cuatro veces contra el MRSA y fue más eficiente que el GIBIM-P5T2K frente a estas bacterias. Las modificaciones en GIBIM-P5T2K y en GIBIM-P5S9K se hicieron en la cara hidrófoba de la hélice α . En ambos casos el reemplazo fue similar, Thr y Ser fueron cambiados por Lys. Los resultados sugieren que el aumento de la actividad antimicrobiana no se debe exclusivamente al aumento de la carga positiva global del péptido, sino a la distribución de cargas positivas a lo largo de la estructura del péptido. De hecho, GIBIM-P3A6K (con la carga neta positiva más alta (+6)) no aumentó su actividad en comparación con GIBIM-P3 a pesar de que el efecto electrostático entre el péptido y la membrana bacteriana es impulsado por las interacciones iónicas entre los grupos catiónicos del péptido y la cabeza aniónica de los fosfolípidos como se ha publicado previamente [141]. Esto es muy importante teniendo en cuenta que tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas, desarrollan diferentes estrategias para generar

resistencia a los PAMs, aunque tienen estructuras celulares envolventes distintas [142].

Los PAMs GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P4N2F, presentaron menor actividad que otros péptidos de composición similar [124], posiblemente porque la ubicación de los residuos de Trp en la secuencia no permite la interacción π -catión, con una estabilización concomitante de los anillos indoles aromáticos y una mayor actividad antibacteriana [143–145]. Además, la presencia del anillo aromático indol podría producir una despolarización de la membrana bacteriana por la presencia de este sistema de conjugación.

En el caso de GIBIM-P5F8W tiene un porcentaje de homología del 92% en 11 aminoácidos con el péptido antimicrobiano anfíbio escuelentin [146]. Este péptido potenció su actividad 220 veces comparado con el péptido inicial GIBIM-P5 frente a *E. coli* O157:H7 ($MIC_{99}=0.5 \mu M$) y SARM ($MIC_{99}=5.0 \mu M$), respectivamente (Figura 19 y 20). La sustitución del aminoácido de Trp en una de las regiones hidrófobas (Tabla 7) juega un papel crucial en el aumento de la actividad y ha sido estudiada por otros autores [147–148]. Este resultado implica la importancia particular del aminoácido de Trp en la región media de la secuencia peptídica, que demuestran que este residuo no sólo se divide más favorablemente en la interfase de membrana, sino que también es más hidrófobo y tiene una mayor afinidad por fases hidrofóbicas voluminosas que otros residuos aromáticos [149].

Otro PAM muy activo fue GIBIM-P6, que exhibió actividad frente a *E. coli* O15:H7 con un CMI_{99} de $5,0 \mu M$. Asimismo, frente SARM y *P. aeruginosa* presentó actividad con un CMI_{99} de $10 \mu M$ para ambas cepas. Sin embargo, este compuesto se oxidaba fácilmente a temperatura ambiente y su manipulación a nivel experimental era muy complicado.

En este contexto, combinando un método que utiliza un modelo computacional para correlacionar las propiedades fisicoquímicas de un péptido y un diseño

racional identificando los aminoácidos conservados se obtuvieron 6 péptidos con la mejor actividad antimicrobiana; cuatro péptidos diseñados (GIBIM-P3, GIBIM-P4, GIBIM-P5 y GIBIM-P6) y dos péptidos análogos (GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W), siendo los dos últimos candidatos, los que exhibían mayor actividad. Cabe destacar que algunos de los péptidos diseñados presentaron actividad antibacteriana comparable o superior a los péptidos como Cecropin B, Cecropin P1 y Hecpidin [150, 151]. Adicionalmente, el péptido GIBIM-P5S9K tiene un 92% de homología en 10 aminoácidos con el péptido antimicrobiano anfíbio esculentina (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2n6m>). Esto significa que de alguna manera, el algoritmo puede imitar la evolución impulsada por la naturaleza en algunos PAMs.

En cuanto a la CMB, sólo el péptido GIBIM-P5F8W fue bactericida contra *P. aeruginosa* y por lo menos seis de los dieciocho péptidos presentó dicho efecto frente a *E. coli* O157:H7 y SARM.

Por otra parte, uno de los múltiples obstáculos para la implementación del uso de PAMs en clínica, es el la reducción del potencial antibacteriano del péptido cuando se encuentra en presencia de sales fisiológicas [124, 152]. Por lo tanto, se determinó que la actividad antimicrobiana de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en presencia de sales a las concentraciones fisiológicas. Como vemos en la Tabla 8 los péptidos presentaron el mismo efecto antibacteriano independiente de la sal. Sin embargo, los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W disminuyeron su actividad frente a la cepa bacteriana de *E. coli* O157:H7 en presencia de la sal de magnesio ($MgCl_2$) a una concentración de 1mM. Estudios previos [152] han mostrado que la unión del péptido-lípido es más fuerte a concentraciones más bajas de sal. Los péptidos alteran los lípidos, pero este efecto disminuye a medida que aumenta la concentración de sal. Además, es probable que los residuos catiónicos de los péptidos compitan con los cationes mono y divalentes de las sales para los mismos sitios de unión en la región de la cabeza hidrofóbica del lípido y por esta razón disminuyan su actividad.

Tabla 8. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en presencia de sales

Péptidos	<i>E. coli</i> O157:H7				SARM				<i>P. aeruginosa</i>			
	Control	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Control	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Control	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺
GIBIM-P5S9K	10	10	10	12.5	25	25	25	25	10	10	10	10
GIBIM-P5F8W	0.5	0.5	0.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	10	10	10	10

Por otro lado, con el objetivo de estudiar el mecanismo de unión del péptido GIBIM-P5F8W a la membrana la actividad antimicrobiana del enantiómero D del péptido se comparó con la de su enantiómero L frente a las cepas patógenas de *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa*. Esto se debe a que como se ha publicado previamente [150] la quiralidad de la membrana celular requeriría una quiralidad peptídica específica para que estas moléculas sean activas, pero si la actividad de los enantiómeros D y L son similares sugiere que el mecanismo antimicrobiano de estas moléculas no implica una interacción estereoselectiva con una enzima quiral, lípido o receptor de proteína. Como se observa en la tabla 9, los valores de la CMI₉₉ del péptido GIBIM-P5F8W frente a *P. aeruginosa* fueron iguales, sugiriendo que la quiralidad no es un factor determinante en la actividad y que la membrana celular es su diana principal. No obstante, en el caso de las cepas *E. coli* O157:H7 y SARM parece que la interacción quiral entre el péptido GIBIM-P5F8W- y la superficie de la membrana está mediada por receptores favoreciendo el reconocimiento del enantiómero L.

3.2.2 Toxicidad *in vitro* de péptidos activos

Para ser útiles en la aplicación terapéutica, los PAMs necesitan ser selectivos hacia las células eucariotas, por tal razón se evaluó la toxicidad en eritrocitos y en líneas celulares.

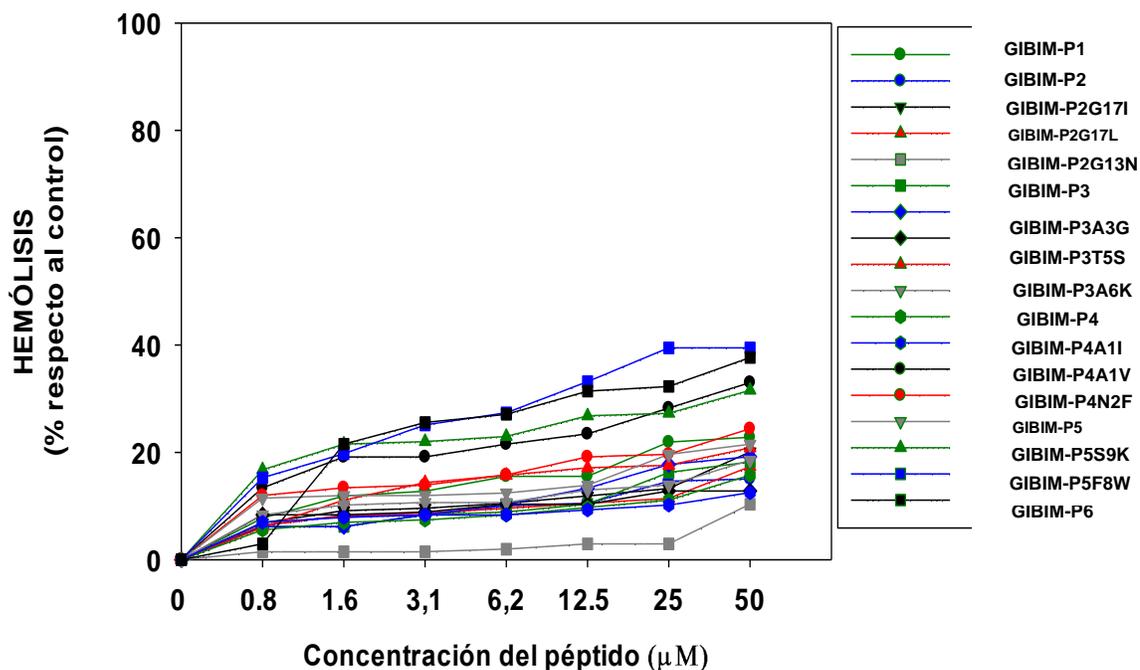
Tabla 9. Actividad antibacteriana de los enantiómeros del péptido GIBIM-P5F8W

Péptido	<i>E. coli</i> O157:H7		SARM		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC ₉₉ (μM)					
	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero
	L	D	L	D	L	D
GIBIM-P5F8W	0.5	25	10	25	10	10

Péptido	<i>E. coli</i> O157:H7		SARM		<i>P. aeruginosa</i>	
	MBC ₉₉ (μM)					
	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero	Enantiómero
	L	D	L	D	L	D
GIBIM-P5F8W	10	50	50	>100	75	10

Ninguno de estos péptidos presentó actividad hemolítica superior al 40% a 50 μM, siendo la concentración más alta ensayada (Figura 16), ya que estas moléculas se consideran hemolíticas cuando a una concentración de 25 μM se ha producido mayor a igual al 50% de hemólisis con respecto al control [129].

Figura 16. Actividad hemolítica de los péptidos diseñados y análogos a diferentes concentraciones frente a eritrocitos de carnero. La desviación estándar fue muy baja. Los ensayos se repitieron por triplicado en tres experimentos independientes.



Por otro lado, para la evaluación del efecto citotóxico de los PAMs se realizó el ensayo con la línea celular A549 de tejido pulmonar, la cual fue incubada en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos GIBIM-P3, GIBIM-P4, GIBIM-P5, GIBIM-P5S9K, GIBIM-P5F8W y GIBIM-P6 (Fig. 17A). Estos péptidos no mostraron ninguna citotoxicidad detectable incluso a 100 μ M, a excepción del péptido GIBIM-P5F8W que presentó un porcentaje de células viables por debajo del 50% (36.8%) a 100 μ M (que es doscientas a diez veces mayor que la CMI_{99} para las cepas evaluadas). Además, la viabilidad de esta línea celular incubada con el péptido GIBIM-P5S9K a 100 μ M (que es cuatro veces mayor que la CMI_{99}), fue del 50% en comparación con las células no tratadas. Los péptidos son considerados citotóxicos cuando a una concentración cuatro veces mayor por encima del MIC_{99} presentan un porcentaje de células viables menor al 50% [130]

Adicionalmente, en la evaluación de la citotoxicidad de los PAMs más activos frente a las células HepG2 de carcinoma humano se observó que los péptidos GIBIM-P3 y GIBIM-P4 promovieron el crecimiento celular en algunas concentraciones evaluadas (Fig. 17B). Estos resultados son similares a los obtenidos por Li y col.,[39] en los cuales el péptido GRP (VPLPAGGGTVLTKMYPR GNHWAVGHLM-NH₂) sirve como un mitógeno para las células HepG2, dando lugar a una proliferación mejorada, reducción de la apoptosis y la aceleración de la progresión del ciclo celular. Por su parte, los péptidos GIBIM-P5, GIBIM-P5S9K, GIBIM-P5F8W y GIBIM-P6 presentaron un porcentaje de viabilidad celular de 94.5%, 90.7%, 88.6% y 72.3%, respectivamente. Los ensayos citotóxicos *in vitro* demostraron que los péptidos evaluados no presentaron efectos sobre la viabilidad de hematocitos, las líneas celulares A549 y HepG2.

Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos más activos, GIBIM-P5S9K, GIBIM-P5F8W, pueden servir como agentes terapéuticos frente a infecciones por

causadas por los microorganismos de *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa*, porque presentan una alta actividad antimicrobiana y un bajo efecto citotóxico.

3.2.3 Evaluación de la estabilidad en suero de los PAMs GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W

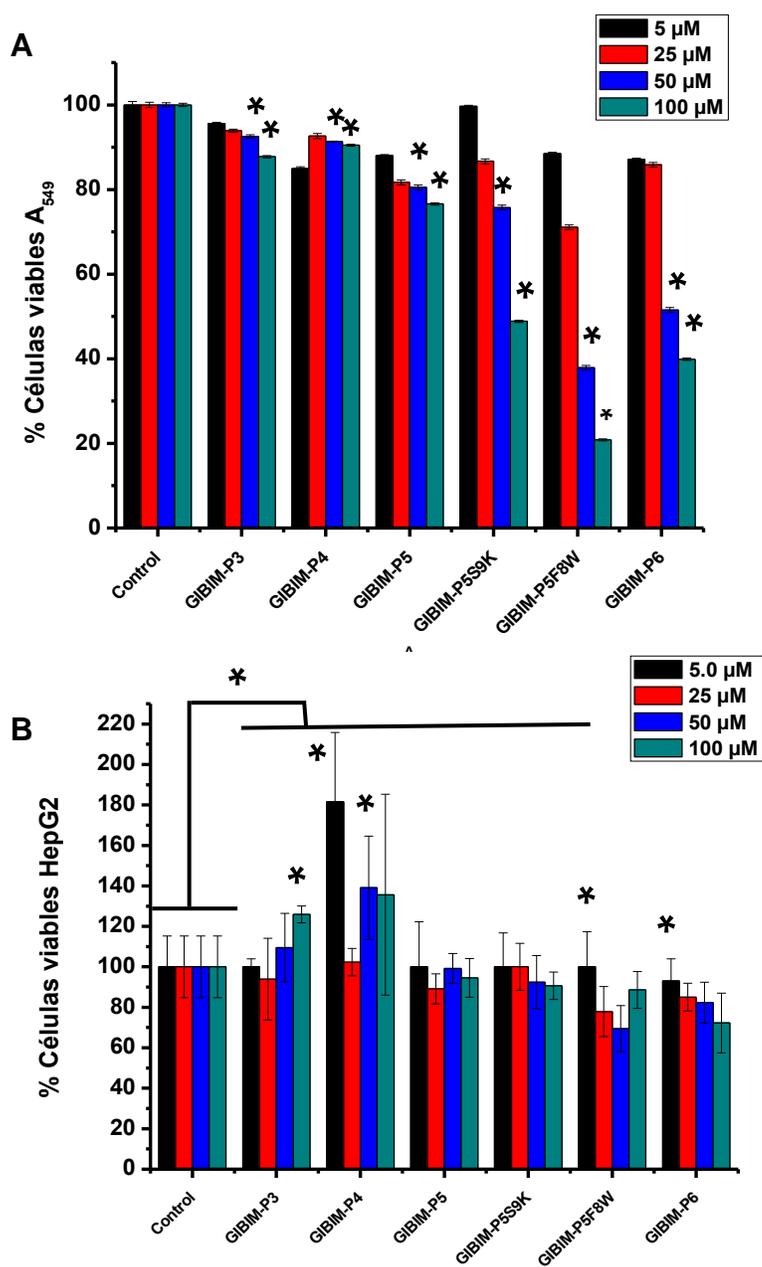
Los péptidos sintéticos a menudo carecen de la estabilidad conformacional requerida para ser un fármaco exitoso; por lo tanto, la determinación de la estabilidad del péptido en el suero constituye un ensayo de selección muy importante. La estabilidad del péptido en suero puede determinarse de forma sencilla mediante RP-HPLC tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [154].

En la figura 18 se observan los cromatogramas de los péptidos L-GIBIM-P5S9K y los enantiómeros del péptido D,L-GIBIM-P5F8W en presencia de suero humano al 10%. En ellos se pueden observar el inicio de la degradación de los péptidos L-GIBIM-P5S9K y L-GIBIM-P5F8W (Fig. 18 A a D) causada por enzimas proteolíticas (Tripsina; Quimotripsina; Pancreatina; pepsinas, enzimas digestivas, entre otras) presentes en el suero. La degradación de estos compuestos se ve marcada con la aparición de nuevas bandas de absorción a diferentes tiempos de retención evidenciando la escisión del enlace péptidico. La degradación de los péptidos L-GIBIM-P5S9K y L-GIBIM-P5F8W en el suero fue muy similar, esto se debe a que el índice de hidropatía de los dos compuestos es muy cercano (Tabla 5, Cap. 2) y su afinidad con la columna C-18 es muy similar. No obstante, el péptido D-GIBIM-P5F8W permaneció muy estable comparado con su enantiómero L (Fig. 18 E y F). Estos resultados son acordes a los obtenidos por Youngblood y col., [154]

3.2.4 Evaluación de la interacción del péptido GIBIM-P5S9K con la membrana bacteriana mediante microscopía de fluorescencia

Se determinó la localización intracelular del péptido RhoGIBIM-P5S9K en las cepas de *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa*, mediante el uso de microscopía de fluorescencia confocal. Inicialmente, se realizó un ensayo de seguimiento en el tiempo a una concentración de 50 μM en la cepa de SARM, donde se observó el

Figura 17. Citotoxicidad de los péptidos más activos en líneas celulares. A) línea celular A₅₄₉ y B) línea celular HepG2. Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *P<0.05.



péptido a nivel intracelular (Fig. 19). Luego, se optimizaron las variables tiempo y concentración, en 1,5 horas de incubación y 25 μ M, respectivamente. El péptido RhoGIBIM-P5S9K se localizó en la superficie de las bacterias, pero no en el interior del citoplasma bacteriano (Fig. 19A y B). Curiosamente, en las bacterias Gram-positivas, SARM, el péptido se observó en la membrana y en el citoplasma de forma simultánea (Fig. 19C).

3.2.5 Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos

La actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos se evaluó para determinar su acción frente a especies de *Leishmania* como modelo eucariota. La actividad antileishmania *in vitro* se evaluó frente a amastigotes de *L. pifanoi*. midiendo la proliferación y la viabilidad del parásito después de la exposición a diversas concentraciones de los péptidos.

El efecto leishmanicida de los péptidos se evaluó mediante la inhibición de la capacidad de reducción de MTT de los parásitos (apartado 3.1.9). Todos los péptidos ensayados inhibieron la viabilidad de los parásitos a una concentración de 25 μ M sobre promastigotes de *L. donovani*, en el ensayo a corto plazo (4 h) mientras que en la proliferación (72 h) el efecto antimicrobiano para algunos compuestos disminuyó (véase Fig. 20B). Interesantemente, los péptidos GIBIM-P2G17L, GIBIM-P2G17L Y GIBIM-P5T2K mostraron ser activos frente al parásito, sin tener un efecto significativo frente a las bacterias. Sin embargo, los péptido GIBIM-P5F8W, GIBIM-P5S9K y GIBIM-P6 siguieron siendo compuestos activos biológicamente frente a los parásitos y las bacterias. No obstante, los amastigotes son, en general, más resistentes a los péptidos que los promastigotes (Véase Fig 20 y 21), ya observado en trabajos anteriores con otros análogos de cecropina A-melitina [155] y mostrándose de la misma forma con estos compuestos. Los datos

muestran que el efecto final de los péptidos en amastigotes requiere una incubación superior a 72 h y que dicho efecto es irreversible..

Figura 18. Cinética de estabilidad de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en suero humano. A) GIBIM-P5S9K de 15 a 120 min, B) GIBIM-P5S9K de 240 a 300 min, C) L-GIBIM-P5F8W de 15 a 120 min, D) L-GIBIM-P5F8W de 240 a 300 min, E) D-GIBIM-P5F8W de 15 a 120 min y F) L-GIBIM-P5F8W de 240 a 300 min.

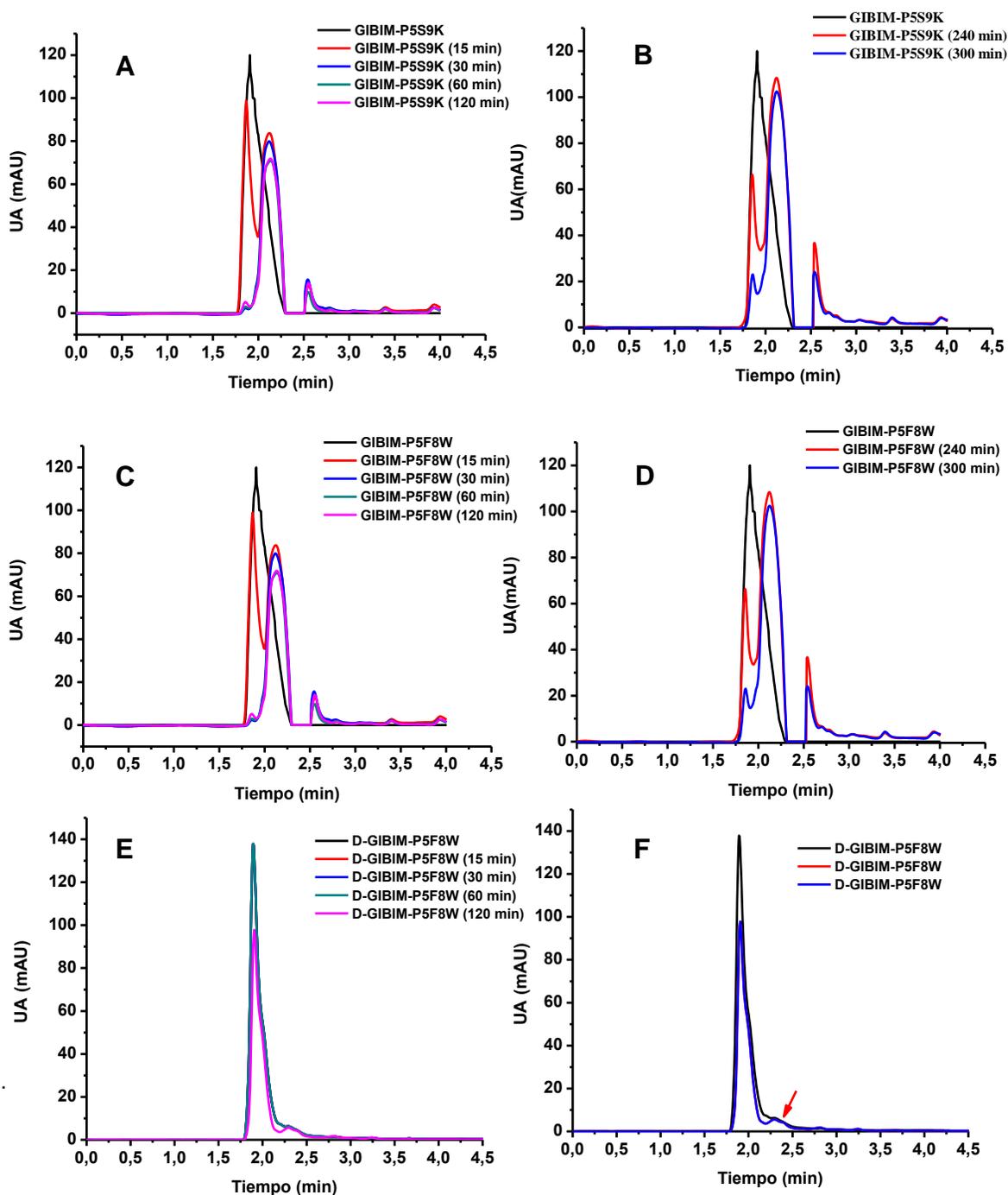
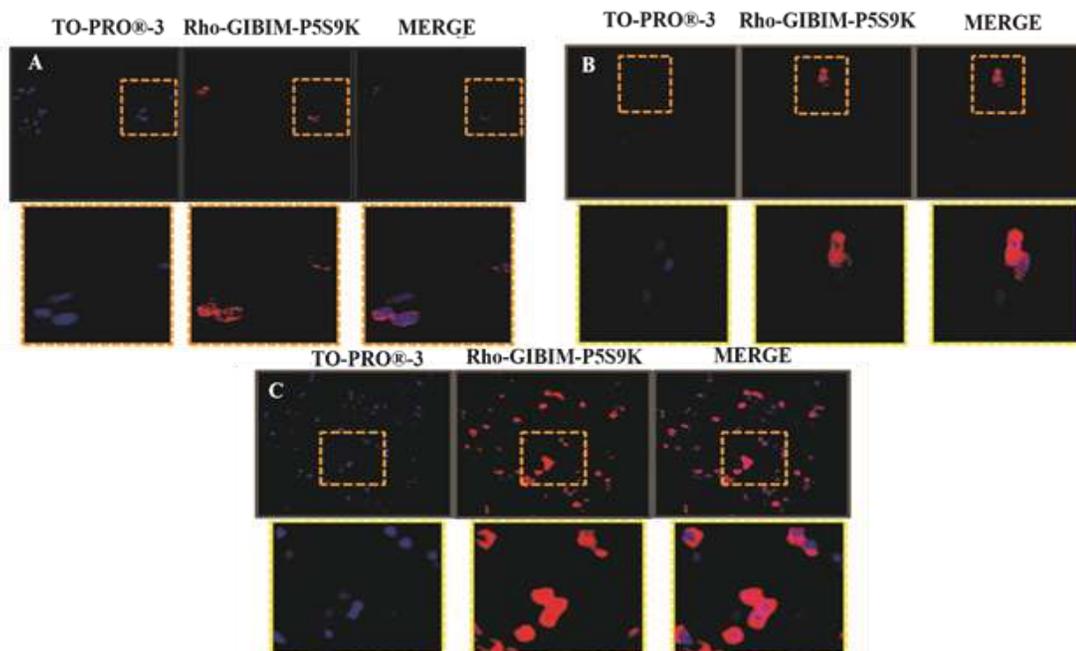
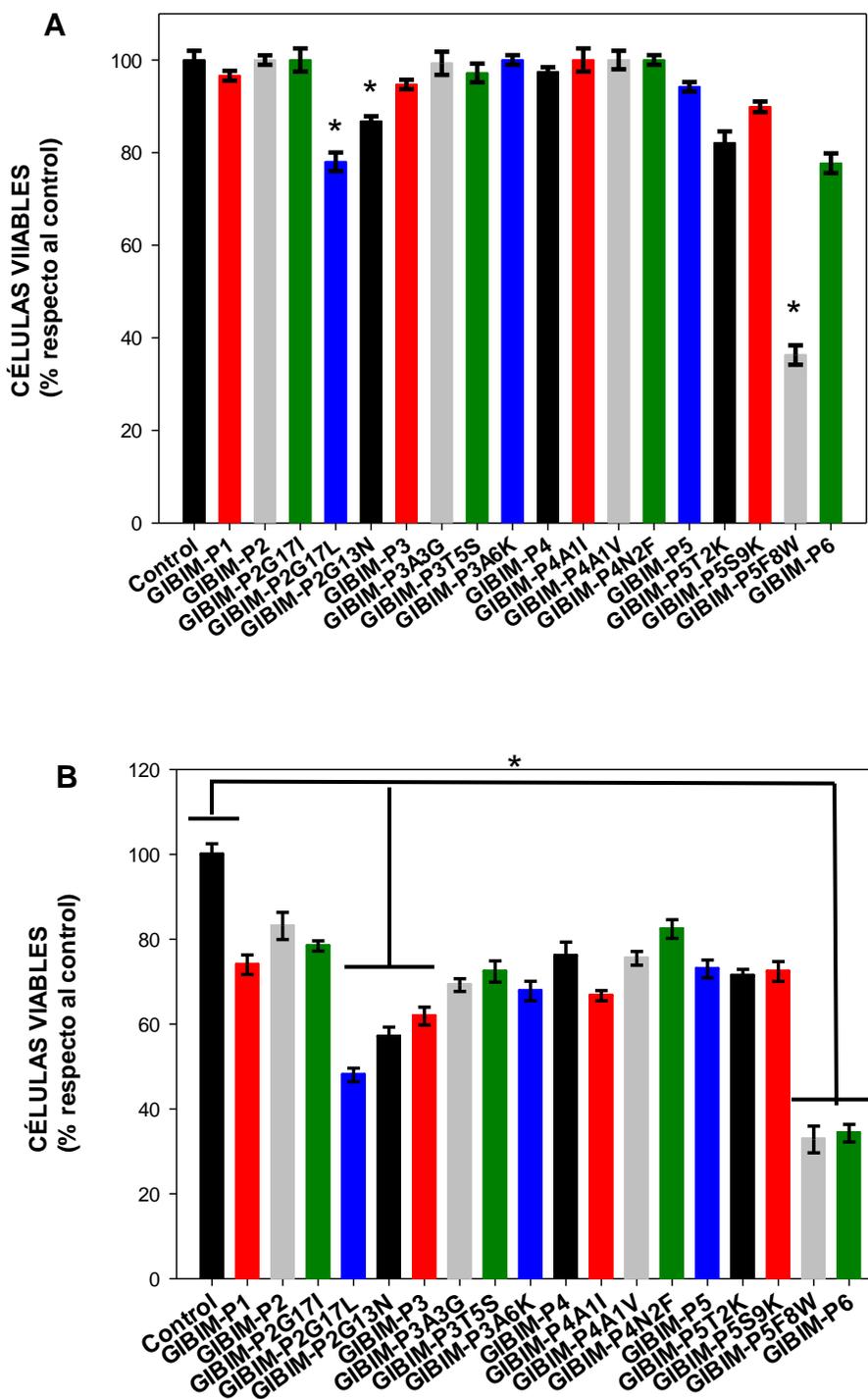


Figura 19. Localización celular de GIBIM-P5F8W en bacterias. Panel (A) *E. coli* O157: H7, (B) *P. aeruginosa* y (C) SARM. Se usaron imágenes de microscopía de barrido láser confocal de células *E. coli* O157: H7 tratadas con GIBIM-P5F8W como coprocesador de ADN (Rho-GIBIM-P5S9K) y TO-PRO®-3 fluoróforo. Las longitudes de onda utilizadas fueron $\lambda_{\text{EXC}} = 642 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{EM}} = 661 \text{ nm}$ para TO-PRO®-3 y $\lambda_{\text{EXC}} = 554 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{EM}} = 579 \text{ nm}$ para péptido rodaminado.



La tabla 10 muestra los valores de EC_{50} y LC_{50} en ensayos en *Leishmania*, definidas como la concentración de péptido que inhibe la reducción de MTT en un 50%, tras 4h de incubación (EC_{50}) o tras ensayo de proliferación (LC_{50}), respecto al control sin tratamiento de los diferentes péptidos para amastigotes calculados a partir de las curvas de inhibición de reducción de MTT y el porcentaje de células viables en promastigotes a corto plazo y en la proliferación. En los amastigotes a 32°C en ausencia o presencia de diversas concentraciones de los péptidos sintéticos en el medio de crecimiento tanto GIBIM-P5F8W como GIBIM-P6 causaron una disminución dependiente de la dosis en el número de parásitos de *L. pifanoi* después de una exposición de 72 h, con una inhibición significativa del crecimiento del parásito a $0.45 \mu\text{M}$ en ambos compuestos. Otros péptidos destacados fueron GIBIM-P5S9K, GIBIM-P5T2K, GIBIM-P4, GIBIM-P3 y GIBIM-P2G17L con una LC_{50} de 4.76, 3.4, 0.57, 5.7 y 3.2, respectivamente. Estos valores de LC_{50} se encuentran

Figura 20. Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 sobre A) amastigotes de *L. pifanoi* y B) promastigotes de *L. donovani* a 25 μM . Inhibición a 4h. *P<0.05.



muy cercanos y en algunos casos muy por debajo de péptidos como Temporina A, Temporina B, Bombinin H2 y H4 con LC_{50} de 14.6, 7.1, 11.0 y 5.6 μM , respectivamente [127].

3.2.6 Permeación de la membrana bacteriana causada por los péptidos diseñados y análogos

En presencia de SYTOX green, *E. coli* O157: H7 fue incubada con todos los péptidos a una concentración de 25 μM . En el caso de SARM y *P. aeruginosa* se evaluó el ingreso de la sonda a diferentes concentraciones con el péptido GIBIM-P5S9K. El aumento de la fluorescencia de la sonda SYTOX con el tiempo, evidenció la permeabilidad que provocaban los péptidos a la membrana bacteriana. En todos los casos se observó una cinética rápida de ingreso a la bacteria de *E. coli* O157:H7 de todos los péptidos (Fig. 22). Excepto a GIBIM-P4 y GIBIM-P41V, todos los péptidos permeabilizaron la membrana interna de bacterias de manera dependiente de su concentración en un rango micromolar. Llamen la atención los péptidos GIBIM-P2G17L y GIBIM-P5F8W que alcanzaron un 100% de fluorescencia igual que el péptido CAME tomado como control indicando que pueden tener un efecto muy potente en un corto tiempo y que podrían presentar un mecanismo de acción similar de formación de poros.

La figura 23 muestra la variación de fluorescencia de la sonda Sytox tras la adición del péptido GIBIM-P5S9K a diferentes concentraciones en las cepas de *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa* tras 30 min de incubación. Se observó que el péptido fue capaz de permear la membrana a concentraciones tan bajas de 0.1 μM , muy por debajo de la CMI_{99} .

3.2.7 Ensayo de permeabilización de la membrana citoplásmica de *Leishmania* frente a los PAMs

Los péptidos GIBIM-P1 y GIBIM-P6 y sus análogos causaron permeabilización de

Figura 21. Actividad antiparasitaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 sobre A) amastigotes de *L. pifanoi* y B) promastigotes de *L. donovani* a 25 μ M en proliferación. Inhibición a 72h. *P<0.05.

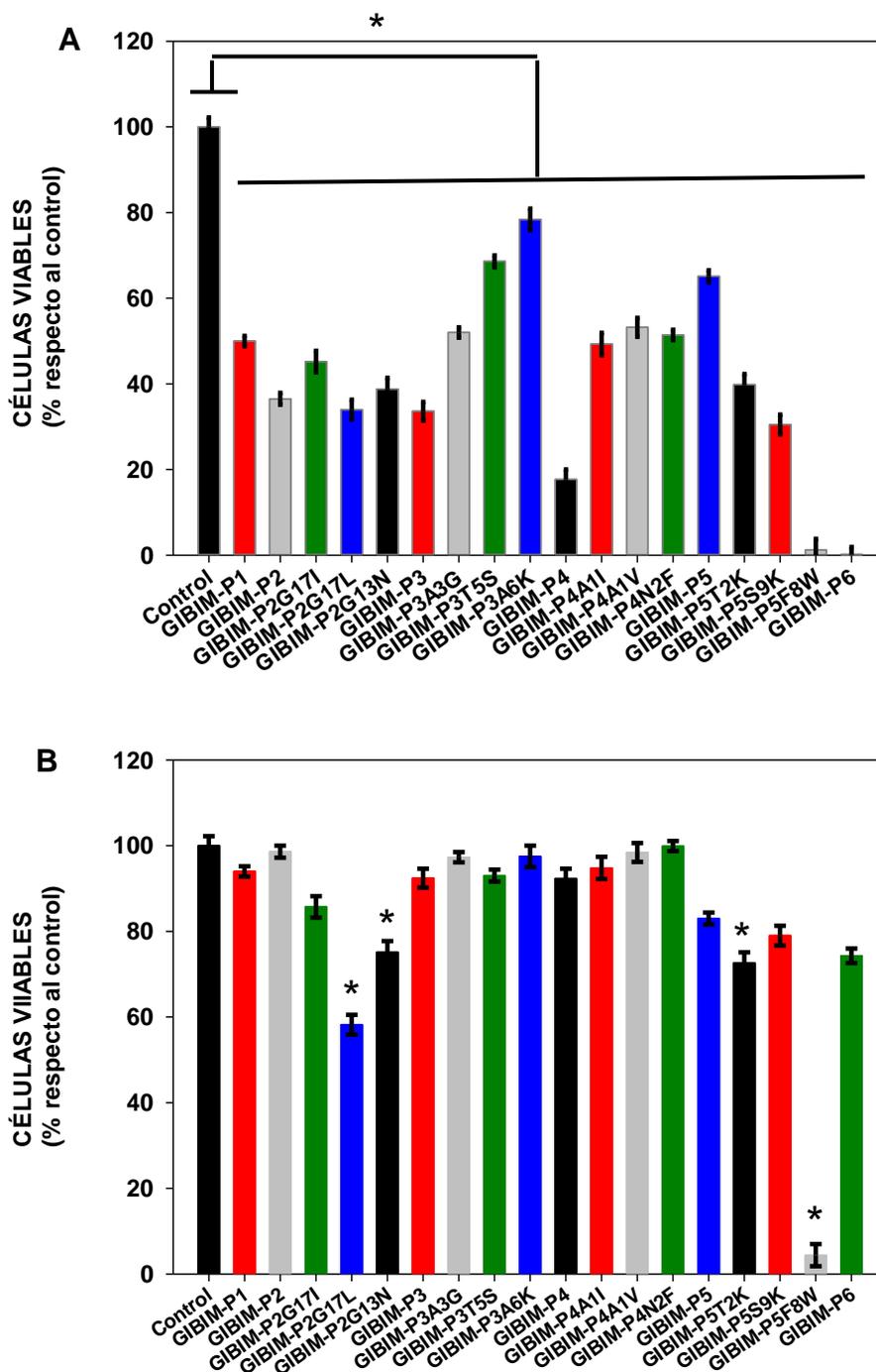


Tabla 10. Actividad antileishmania de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos.

Péptido	Secuencia	<i>Promastigotes L. donovani</i>		<i>Amastigotes L. pifanoi</i>	
		%células viables 4h (25µM)	%células viables 72h (25µM)	EC ₅₀ (µM)	LC ₅₀ (µM)
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSMKWGGI-NH₂	96.6 (±0.1)	94.0 (±0.4)	>50 (±0.2)	23.7(±0.2)
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH₂	100.0 (±0.5)	98.6 (±0.6)	>50 (±0.8)	8.6(±0.4)
GIBIM-P2G17I	GFLGKGLFSVVKGVKLI-NH ₂	100.0 (±0.2)	85.7 (±1.2)	>50(±0.8)	5.8(±0.5)
GIBIMP2G17L	GFLGKGLFSVVKGVKL-NH ₂	78.1 (±0.1)	58.2 (±0.18)	24.4(±0.1)	3.2(±0.8)
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVKNVLKG-NH ₂	86.8 (±0.1)	75.1 (±0.3)	34.4(±0.8)	11.4(±0.2)
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKGKRI-NH₂	94.7 (±0.7)	92.4 (±0.4)	50.0(±0.6)	5.7(±0.1)
GIBIM-P3A3G	NV G AATARGWLKKGKRI-NH ₂	99.3 (±0.5)	97.3 (±0.2)	>50.0(±0.1)	33.5(±0.6)
GIBIM-P3T5S	NVAAS S ARGWLKKGKRI-NH ₂	97.2 (±0.6)	93.0 (±0.2)	>50.0 (±0.2)	41.6(±0.3)
GIBIM-P3A6K	NVAAT K RGWLKKGKRI-NH ₂	100.0 (±0.5)	97.5 (±0.3)	>50.0(±2.0)	>50.0(±0.2)
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKGK-NH₂	97.4 (±0.2)	92.3 (±0.2)	43.2(±0.3)	0.57(±0.8)
GIBIM-P4A1I	I NVAATARGWLKKGK-NH ₂	100.0 (±0.1)	94.8 (±0.4)	38.5(±0.2)	21.8(±1.2)
GIBIM-P4A1V	V NVAATARGWLKKGK-NH ₂	100.0 (±0.1)	98.4 (±0.1)	46.5(±1.0)	51.8(±0.2)
GIBIM-P4N2F	F VAAATARGWLKKGK-NH ₂	100.0 (±0.1)	99.9 (±0.1)	>50.0(±1.2)	>50.0(±0.4)
GIBIM-P5	ATKKCGLFSILKGVGKI-NH₂	94.2 (±0.2)	83.0 (±0.4)	>50.0(±0.5)	43.0(±0.7)
GIBIM-P5T2K	K KKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	82.1 (±0.2)	72.6 (±0.1)	>50.0(±0.6)	3.4(±0.5)
GIBIM-P5S9K	ATKKCGL F ILKGVGKI-NH ₂	89.9 (±0.1)	79.0 (±0.3)	42.9(±1.3)	4.8(±0.2)
GIBIM-P5F8W	ATKKCGL W SILKGVGKI-NH ₂	36.3 (±0.1)	4.4 (±0.2)	16.0(±1.2)	0.45(±0.8)
GIBIM-P6	NVAATARGWLKKGK-NH₂	77,7 (±0.1)	74.3 (±0.7)	7.8(±0.5)	0.45(±0.6)

la membrana plasmática del amastigote. La figura 24 representa el porcentaje de fluorescencia tras 30 min de incubación con los péptidos a 25 μ M. Esta concentración fue seleccionada por ser representativa conforme a los resultados obtenidos en la actividad antiparasitaria. Cabe resaltar que los péptidos GIBIM-P2G17L y GIBIM-P2G17I fueron los péptidos que mayor porcentaje de fluorescencia registraron, seguidos de los péptidos GIBIM-P6 y GIBIM-P5F8W.

De acuerdo con los resultados publicados, aún no se han dilucidado completamente los mecanismos de acción de los PAMs. Sin embargo, ambos mecanismos (a nivel de membrana e intracelularmente), han sido demostrados en diferentes estudios. En este estudio se logró demostrar la disrupción de la membrana en *Leishmania* promastigotes y amastigote tratados con los péptidos Temporinas A y B, mediante la técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM) [127]. Estudios similares

también confirmaron que otros PAMs, como Bombinin, actuaron a través de este mecanismo [156]. Este modo de acción primario puede proporcionar medicamentos basados en PAMs con una gran ventaja sobre los tratamientos actuales. Para que la resistencia frente a los PAMS se llegara a desarrollar, los parásitos de *Leishmania* necesitarían alterar estructura de membrana y/o composición de fosfolípidos, y tales modificaciones serían difíciles de lograr. En la figura 25 se observa que la permeabilización lograda por los péptidos con mayor actividad antileishmanicidal a 25 μ M, es consistentemente superior en promastigotes que en amastigotes. El PAM GIBIM-P3 es el péptido que produce una permeabilización temprana a los 10 minutos, mientras que el GIBIM-P4 puede funcionar por un mecanismo de translocación en promastigotes.

3.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de los PAMs en macrófagos peritoneales

La figura 26 muestra la cinética de toxicidad en macrófagos peritoneales de ratones de los péptidos más activos. Encontramos que los péptidos más tóxicos fueron

Figura 22. Incremento de la fluorescencia de Sytox green tras la adición de los PAMs a *E. coli* O157:H7. A) péptidos de GIBIM-P1 a GIBIM-P3A6K y B) péptidos de GIBIM-P4 a GIBIM-P6. Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

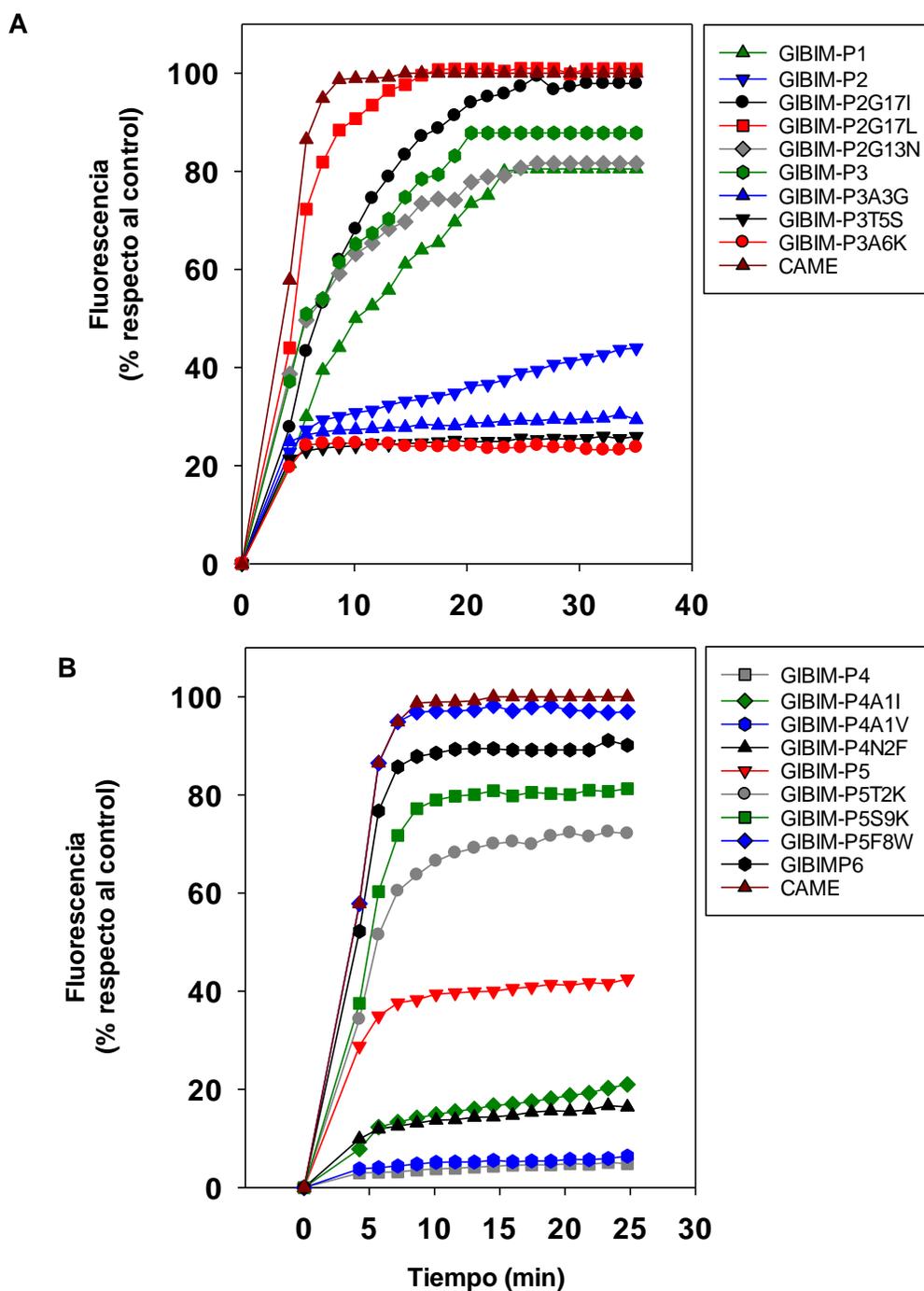


Figura 23. Incremento de la fluorescencia de Sytox Green tras la adición del péptido GIBIM-P5S9K a diferentes concentraciones. A) *E. coli* O157:H7, B) SARM y C) *P. aeruginosa*. Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

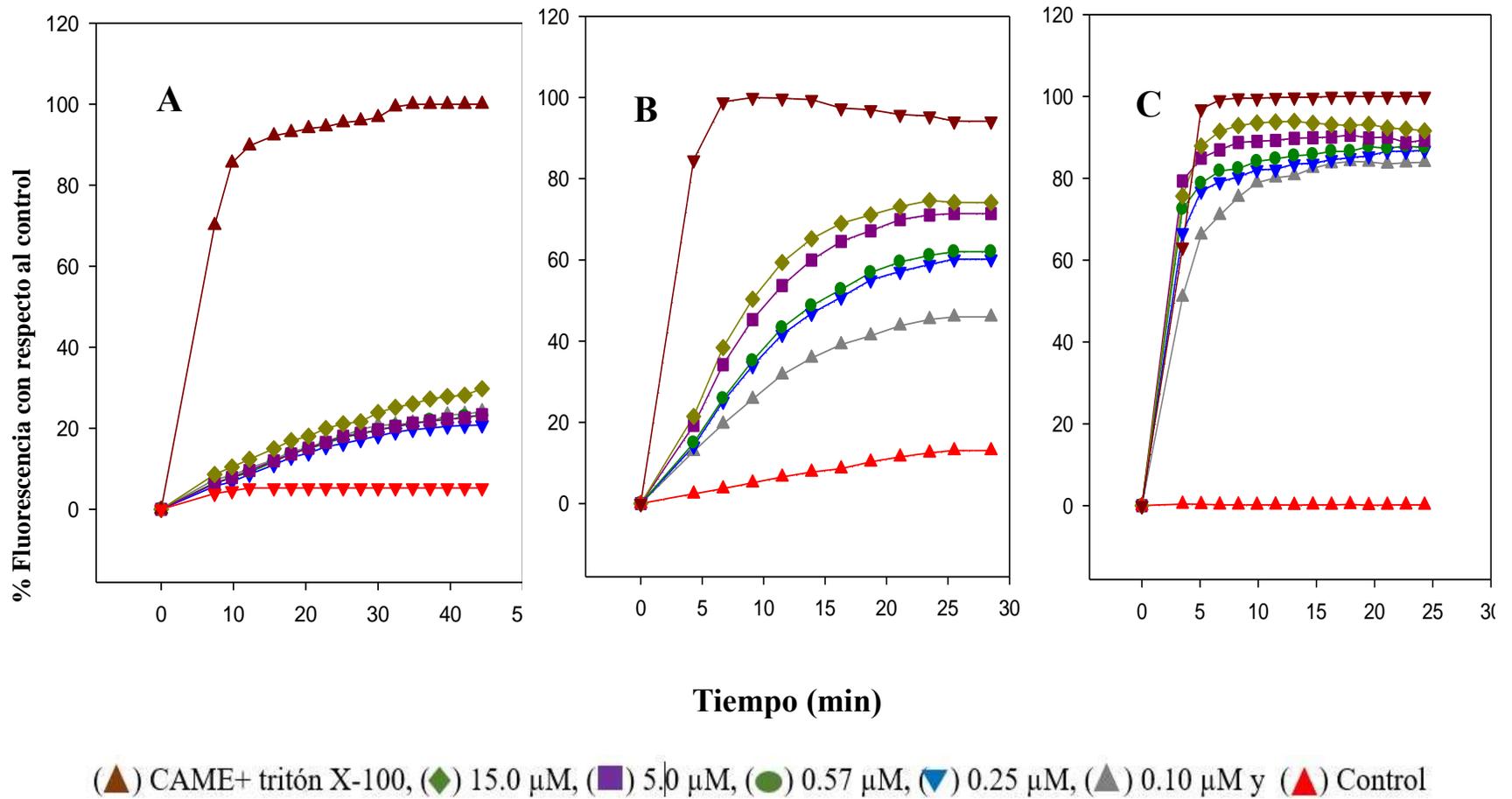
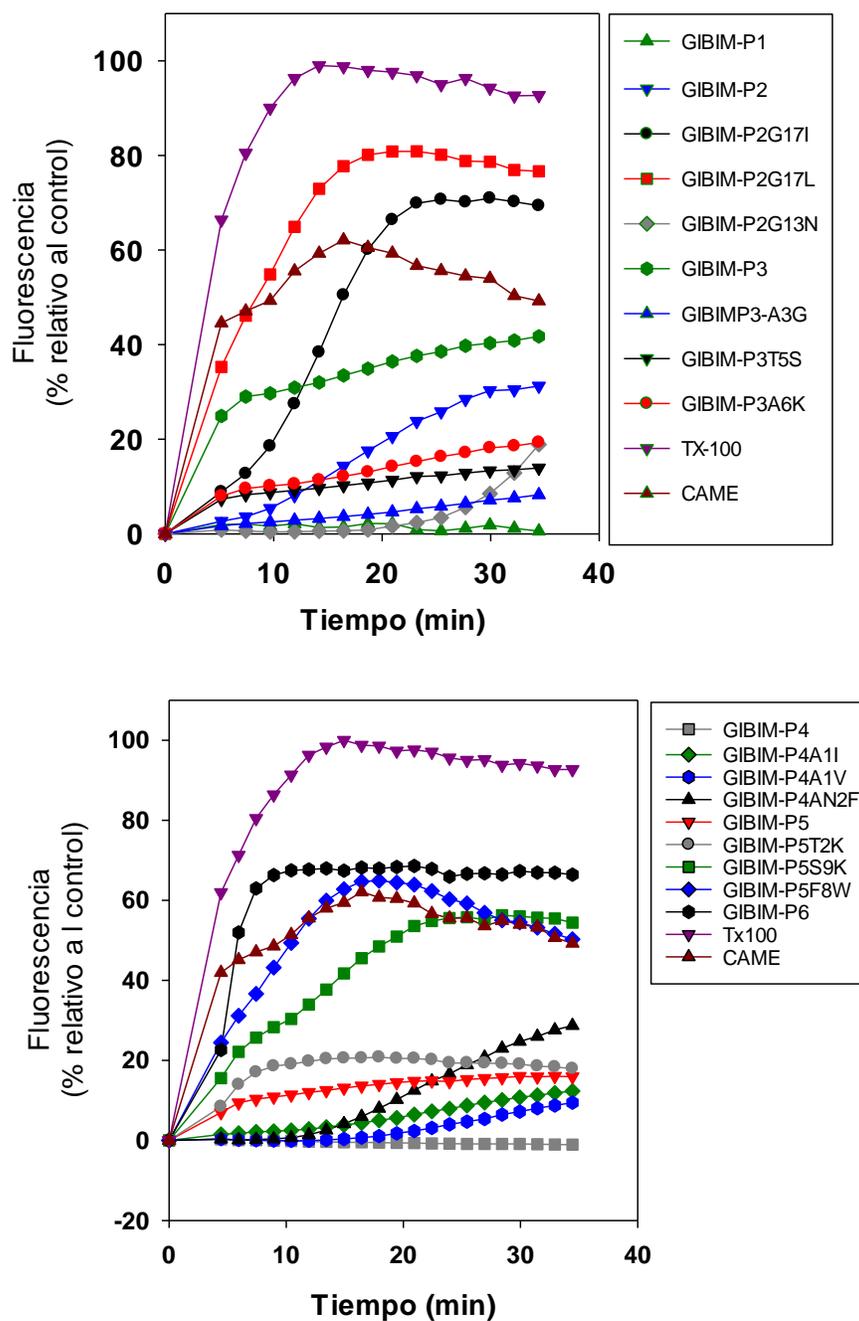


Figura 24. Fluorescencia de SYTOX Green en amastigotes de *L. pifanoi* tras incubación (30 min) con el péptido a una concentración final de 25 μM . Los valores se refieren al 100% de fluorescencia obtenido con 0.1% de Triton-X100.



GIBIM-P2G17L Y GIBIM-P5F8W a una concentración de 25 μM . Sin embargo, para este último esa concentración es cincuenta veces mayor a la concentración que el péptido presenta actividad biológica. El péptido que presentó la menor toxicidad fue GIBIM-P3.

Figura 25. Fluorescencia de SYTOX Green en A) amastigotes de *L. pifanoi* y B) promastigotes de *L. donovani* y tras incubación (30 min) con los péptidos más activos a una concentración final de 25 μM . Los valores se refieren al 100% de fluorescencia obtenido con 0.1% de Triton-X100.

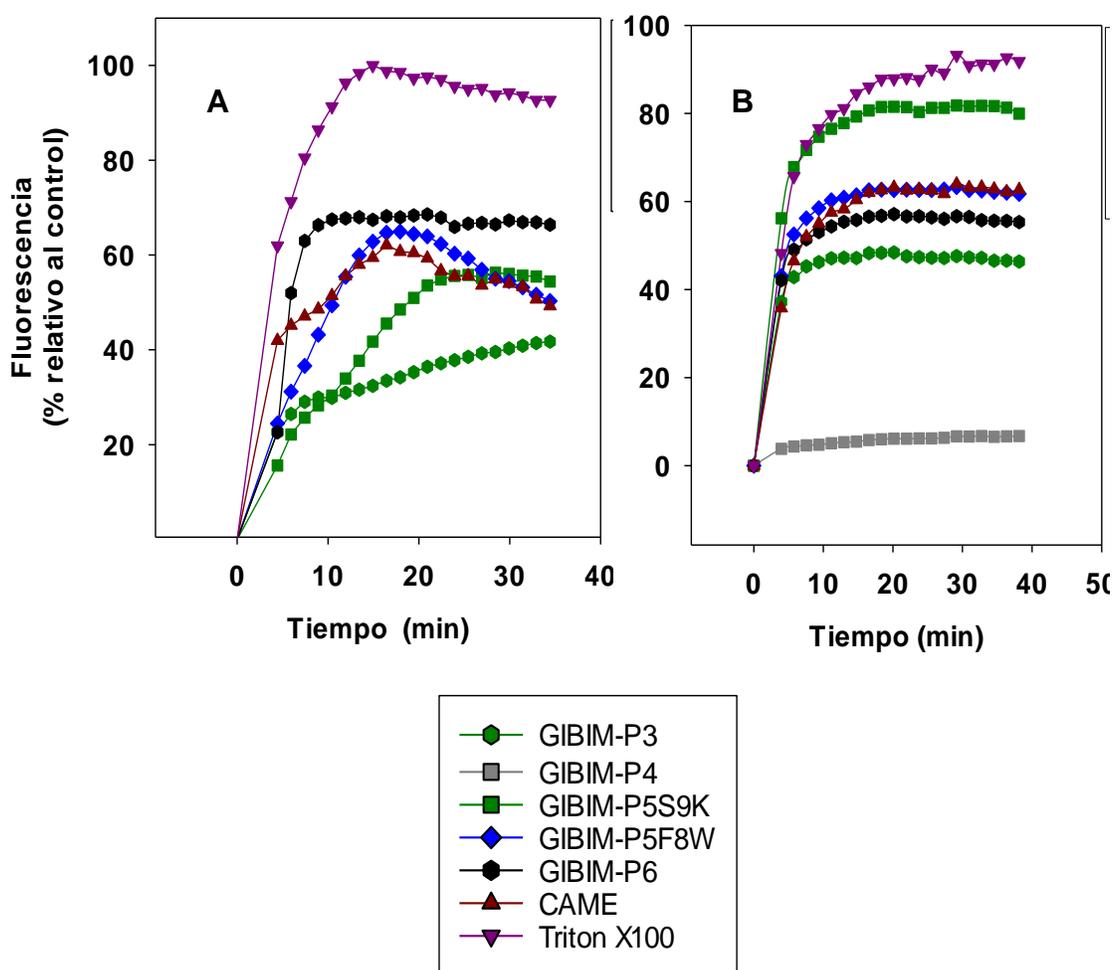
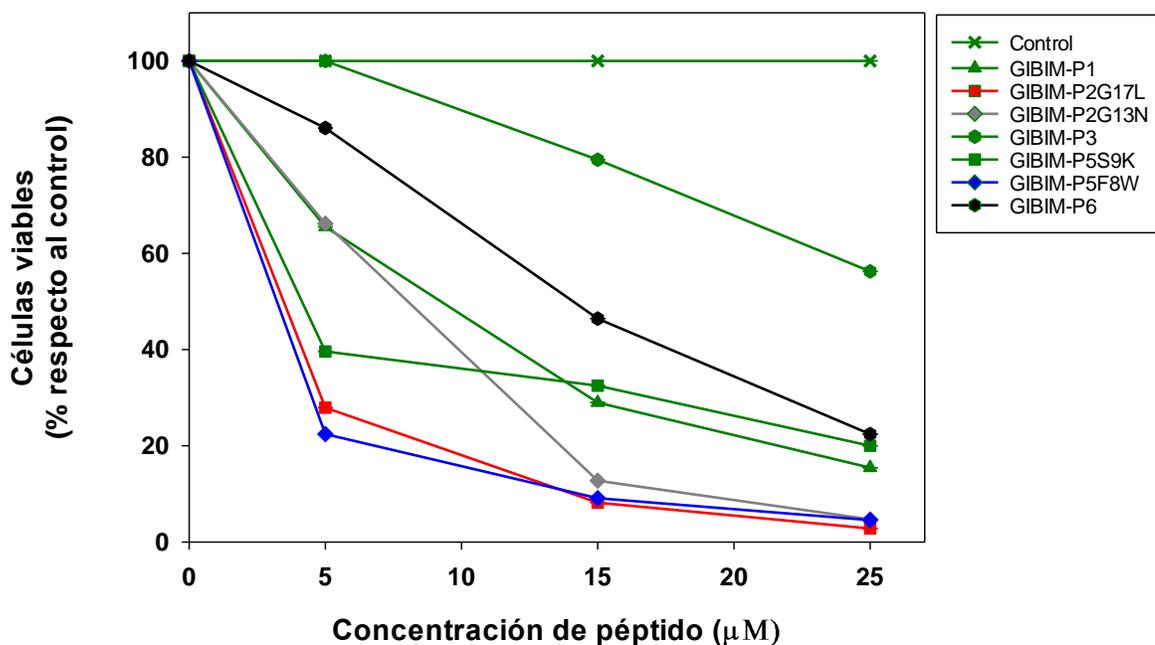


Figura 26. Toxicidad de los PAMs en macrófagos peritoneales que exhibieron la mayor inhibición en amastigotes y promastigotes overnight. La desviación estándar fue muy baja.



Capítulo 4

ENCAPSULACIÓN DEL PÉPTIDO GIBIM-P5S9K EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

RESUMEN

Actualmente se están desarrollando nanovehículos como sistemas para la liberación de péptidos, proteínas y genes por dos razones principales: *i*) actúan como escudo contra un entorno biológico agresivo y *ii*) como un portador que puede cruzar epitelios [157–159]. En este sentido, las NPs poliméricas se han propuesto como un sistema de entrega de moléculas biológicamente activas, demostrando ventajas significativas sobre otros sistemas de liberación [160].

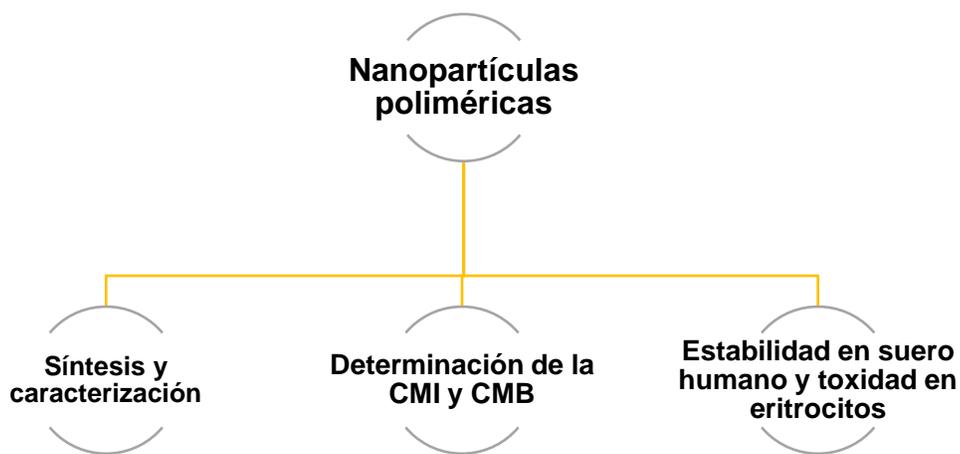
Las Nps poliméricas son sólidos coloidales de conjuntos poliméricos que pueden ser utilizados como portadores de fármacos [161]. Pueden clasificarse como: 1) *nanoesferas* cuando el fármaco está uniformemente disperso a lo largo de la matriz polimérica (típicamente como una solución sólida), o 2) *nanocápsulas* cuando el fármaco está en el núcleo, ya sea como solución acuosa u oleosa [162]. Además, se han desarrollado diferentes técnicas para preparar NPs cargadas con péptidos y proteínas como, por ejemplo: evaporación emulsión / disolvente, emulsión doble, diseminación disolvente, coacervación, nanoprecipitación, gelificación ionotrópica, precipitación por sales [163–166]. También, las NPs se han preparado a partir de polímeros sintéticos y naturales [167]; NPs de polímeros naturales se han utilizado para aplicaciones biomédicas a pesar de su variada pureza y la frecuente reticulación necesaria para aumentar su estabilidad [161]. En particular, las NPs derivadas del PLA o del PLGA se utilizan ampliamente en la liberación controlada de fármacos encapsulados porque son biodegradables, biocompatibles y han sido aprobados por la FDA como sistema de entrega de

fármacos vía parenteral [162, 168, 169]. Adicionalmente, el polímero PLGA y la concentración de las NPs puede ser modificada para controlar la estructura de las partículas, el grado de encapsulación, las posibles aplicaciones, la vía de administración, la liberación del fármaco y la velocidad de degradación [170, 171]

En esta tesis se sintetizaron NPs de PLA PLGA cargadas con el PAM GIBIM-P5S9K, uno de los péptidos más estables y con menor citotoxicidad, utilizando la técnica de doble emulsión-disolvente [172]. Las NPs fueron caracterizadas mediante DLS, potencial Zeta y microscopía de barrido electrónico (SEM, por sus siglas en inglés) para determinar su tamaño, carga superficial y morfología, respectivamente. Además, se evaluó y comparó la actividad antimicrobiana *in vitro* del PAM libre y el PAM cargado en las NPs frente, a SARM, *E. coli* O157: H7 y *P. aeruginosa*.

4.1 METODOLOGÍA

En el esquema 4 se muestra la metodología general para la síntesis, caracterización y actividad de las NPs de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K.



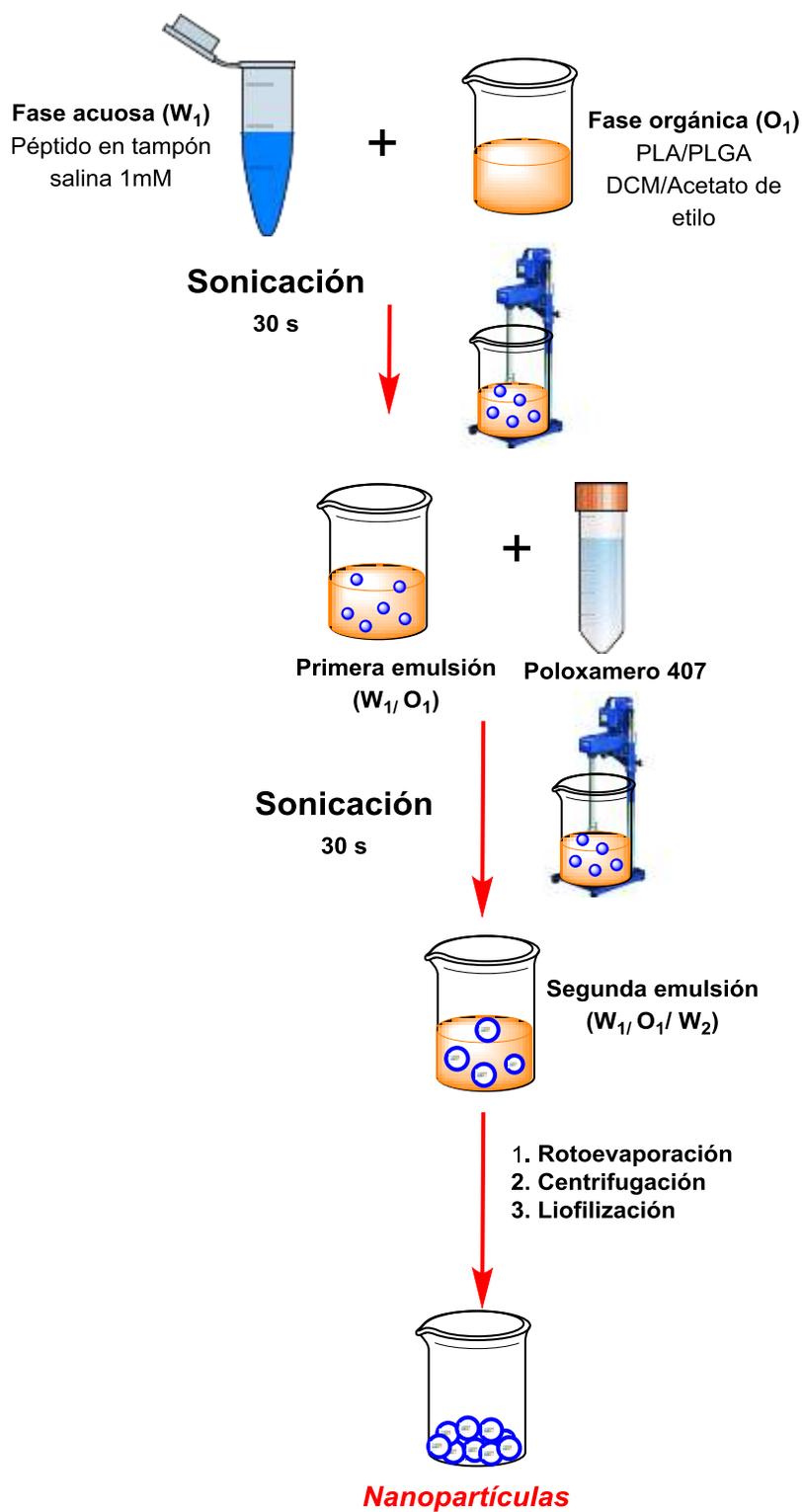
Esquema 4. Metodología general de la propuesta de investigación descrita en el capítulo 4.

4.1.1 Materiales y reactivos

El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA 50:50, PM 38000-54000 Da), polivinil alcohol (PVA, 99+%), poloxamero 407, el ácido láctico (PLA 98%), polietilenimina (PEI 50 %v/v en solución acuosa, PM 2000), glucosa (C₆H₁₂O₆ 95%) fueron comprados de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri). Acetonitrilo (ACN), Metanol (MetOH) y Diclorometano (DCM) fueron obtenidos de MERCK. Todos los reactivos usados eran de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Las soluciones fueron preparadas con agua Milli-Q.

4.1.2 Preparación de nanopartículas poliméricas

Los NPs se prepararon siguiendo la metodología de doble emulsión con evaporación del solvente según Cohen-Sela y col., con algunas modificaciones [172]. Se dispersaron 1 mL de solución de péptido GIBIM-P5S9K (fase W₁) (1 mg/mL) en 4 mL de DCM que contenía 10 mg de PLA ó 4 mL de acetato de etilo que contenía 10 mg de PLGA (fase O). Las fases W₁ y O se mezclaron vigorosamente durante 30 s para formar una emulsión W₁/O simple usando un homogeneizador-dispersor (IKA Ultra-turrax T-18) a velocidad máxima (15500 rpm). Esta primera emulsión se dispersó entonces en 10 mL de solución de tensioactivo Poloxamer 407 al 1% (fase W₂). La suspensión se homogeneizó después a 15500 rpm durante 30 s para obtener emulsión doble W₁/O/W₂. Finalmente, se eliminó el DCM y el acetato de etilo en un evaporador rotativo convencional. De este modo, para garantizar una NPs cargadas positivamente a la superficie que facilita una interacción electrostática con la membrana bacteriana se adicionó polietilenimina (PEI). Esta suspensión se centrifugó a 22.000xg para obtener las NPs, las cuales se lavaron con PBS 1mM y liofilizaron. A continuación, las NPs se resuspendieron medio acuoso para realizar los ensayos siguientes. En el esquema 5 se muestra la metodología de síntesis de las NPs de PLA y PLGA.



Esquema 5. Metodología general de la síntesis de nanopartículas [172].

4.1.3. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las NPs

El tamaño y la carga de las nanopartículas se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS) y el potencial Z en un Zetasizer Nano Series Nano-zs90 equipado con láser de 633 nm a 25 ° C que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y el índice de polidispersidad (Pdl, siglas en inglés) fue inferior a 0.3. La microscopía de SEM en STEM y el modo convencional se utilizó para determinar la morfología y confirmar tamaños de nanopartículas recubiertas de oro en el microscopio FEI Quanta 650 en el Laboratorio de Microscopía, Parque Tecnológico de Guatiguará, Universidad Industrial de Santander, Colombia [173].

Las nanopartículas de PLGA y PLA obtenidas también fueron caracterizadas mediante espectroscopia infrarroja utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker-Tensor 27, con celda ATR Platimun A225/Q de cristal de diamante. Las muestras líquidas se purificaron previamente a su medición de manera que sólo se observaran bandas de absorción en el espectro infrarrojo correspondientes a grupos funcionales presentes en la muestra. El espectro fue tomado en un ancho espectral entre 4000 y 600 cm^{-1} [174].

4.1.4 Determinación de la eficiencia de encapsulación del péptido GIBIM-P5S9K en las NPs poliméricas de PLGA y PLA

La eficiencia de encapsulación (EE) de los PAMs en las NPs se determinó mediante un método de cuantificación indirecta por espectroscopía UV-Vis a 220 nm utilizando una curva de calibración estándar del péptido GIBIM-P5S9K (Anexo I). El porcentaje de la EE se calculó como se muestra en la ecuación 4.

$$\%EE = (A - B / A) * 100\% \quad (4)$$

Donde A es la cantidad de péptido inicial utilizada para la síntesis de las NPs y B es la cantidad de péptido que quedaba en el sobrenadante una vez que las NPs eran purificadas por centrifugación [175].

4.1.5 Determinación de la CMI y la CMB de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K

La actividad bactericida se evaluó utilizando el método de microdilución en caldo [176, 177]. Este ensayo se realizó de la misma forma como el que se realizó con el péptido libre (véase apartado 3.1.3 del capítulo 3). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los controles fueron: 1) medio de crecimiento, 2) medio de crecimiento más bacterias, 3) medios de crecimiento, bacterias y Ofloxacina y 4) medios de crecimiento, bacterias y nanopartículas no cargadas.

4.1.6. Liberación *in vitro* del péptido GIBIM-P5S9K

Se diluyeron las NPs de PLA y PLGA cargadas con los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W (2 mL de suspensión) en PBS (20 mL) 50 mM, pH = 7,4 y se incubaron a 37°C bajo agitación magnética (180 rpm). En puntos de tiempo predeterminados, se retiró una muestra de la suspensión de las NPs (0.2 mL), se centrifugó a 22000x g y se cuantificó la cantidad de GIBIM-P5S9K en el sobrenadante a 220 nm en un Nanodrop ND-100 Thermo Scientific [178]. El volumen del ensayo se mantuvo constante añadiendo 0.2 mL de PBS pH 7.4, después de cada extracción de la muestra. Los ensayos de liberación se llevaron a cabo por triplicado.

4.1.7. Evaluación de la estabilidad de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K en suero humano

Para evaluar la estabilidad de las NPs bajo las condiciones fisiológicas, se resuspendieron 3.0 mg de NPs liofilizadas en 1,5 mL de suero humano (HS) al 10% v/v en PBS. Las suspensiones se incubaron a 37 ° C, se analizaron muestras de esta suspensión mediante el tamaño de las NPs y el potencial a intervalos de

tiempo fijos (0, 60, 120 y 240 min) para determinar las agregaciones, los cambios en las propiedades físicas (particularmente el ζ -Pot), y el crecimiento dimensional producido por la adsorción de proteínas séricas en la superficie de las partículas [179].

4.1.8. Actividad hemolítica de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K sobre eritrocitos humanos

La actividad hemolítica de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K se determinó como se ha realizado en previos estudios [180] midiendo la hemólisis en eritrocitos humanos que contenía una concentración de 2×10^7 eritrocitos/mL en PBS. Como control positivo se utilizó una suspensión que contenía una concentración de los eritrocitos de 2×10^7 eritrocitos/mL en PBS y Tritón X-100 al 1%. Esta combinación produce el 100% de hemólisis. El porcentaje de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación 5:

Hemólisis (%) = $(A_s - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$ (5), donde A_s es la absorbancia de la muestra, A_{100} es la absorbancia de los eritrocitos lisados completamente en 0,1% Tritón X-100 y A_0 es la absorbancia en ausencia completa de hemólisis. Todos los ensayos se realizaron independientemente por triplicado.

4.1.9. Análisis estadístico

Los datos experimentales se representan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se examinaron con análisis unidireccional de la varianza utilizando el sistema SPSS 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se consideró que $p < 0,05$ indica una diferencia estadísticamente significativa.

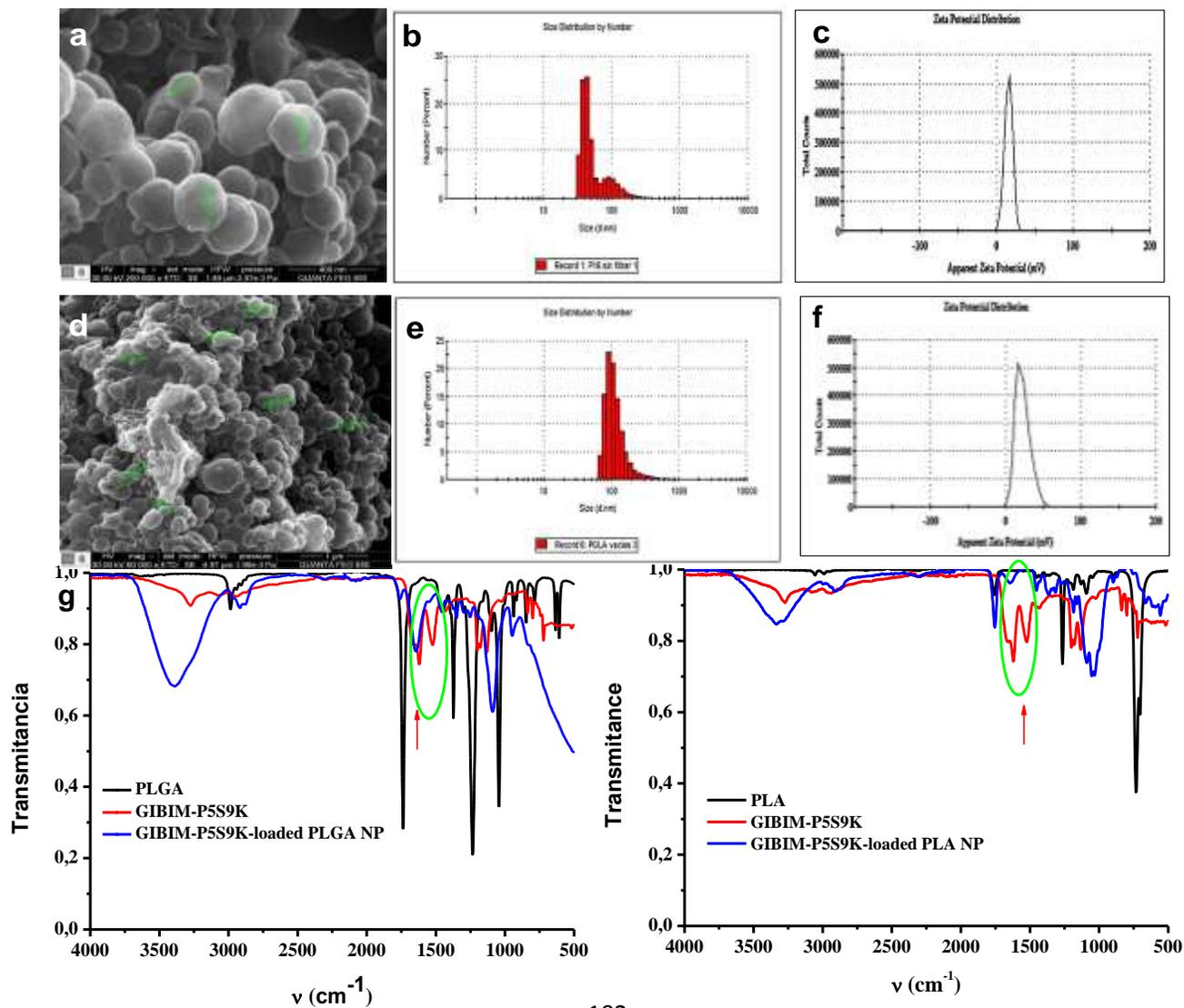
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 Síntesis y propiedades fisicoquímicas de las NPs de PLA y PLGA

Las NPs cargadas con el péptido GIBIM P5S9K se prepararon teniendo en cuenta que las formulaciones de fármacos a nanoescala permiten una interacción

farmacológica más efectiva con las membranas bacterianas y potencian la biodisponibilidad del fármaco en sitios de infección [181, 182]. Las NPs de PLA y PLGA se seleccionaron como vehículo de GIBIM-P5S9K. La preparación de NPs se realizó con el método de doble emulsión-disolvente de evaporación considerando las propiedades del péptido GIBIM-P5S9K, PLA y PLGA. Esta técnica ha sido considerada una de las técnicas más adecuadas para la encapsulación de moléculas solubles en agua, tales como los péptidos y proteínas [183]. Las NPs de PLA y PLGA obtenidas en este trabajo fueron entre 350 nm y 250 nm de diámetro con índice de polidispersidad $<0,3$ como se determinó por DLS y SEM (Figura 27). Estos resultados indicaron que la población de partículas era homogénea con una distribución de tamaño monomodal (Fig. 27 (b) y (e)); y eran similares a las NPs de PLA- y PLGA-NPs cargadas con péptidos obtenidos en otros trabajos de investigación. Por ejemplo, Derman y col., [184] obtuvieron NPs libres y nanopartículas PLGA encapsuladas con el péptido W-1 y L19 con un tamaño promedio de $183,9 \pm 12,1$ nm, $221,7 \pm 15,8$ nm e índice de polidispersidad de $0,107 \pm 0,08$, $0,135 \pm 0,12$, respectivamente; Mathew y col., [185] sintetizaron nanopartículas monodispersas de curcumina recubierta de PLGA soluble en agua con tamaños entre 150 y 200 nm mediante el método de evaporación-emulsión de disolvente. Chereddy y col., [186] prepararon nanopartículas de PLGA cargadas de LL37 con tamaño, PDI, potencial zeta y eficiencia de encapsulación de 304 ± 10 nm, $0,18 \pm 0,01$, $-21,0 \pm 2,5$ mV y $70,2\% \pm 3,3$ respectivamente por emulsión W/O/W- Técnica de evaporación del disolvente. Patel y col., [174] evaluaron los potenciales de alquil poliglucósido (APG) como tensioactivo/ estabilizador alternativo en la preparación de nanopartículas cargadas de péptidos por método de evaporación

Figura. 27. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. a, b y c) NPs de PLA; d, e y f) NPs de PLGA; g) IR de las NPs.



con disolvente de doble emulsión; Sus nanopartículas PLGA presentan un rango de tamaño entre $100,1 \pm 3,57$ - $401,0 \pm 1,11$ nm y nanopartículas PLA $102,3 \pm 1,97$ - $419,0 \pm 1,82$. Estos resultados indican que las nanopartículas sintetizadas en este trabajo presentan el tamaño y la forma muy similares a los informes anteriores con péptidos encapsulados.

Las NPs fueron cubiertas con una delgada capa de oro y exhibieron una morfología esférica con diámetros entre 300-400 nm para PLA y 200-300 nm para PLGA, observándose dispersión homogénea según se determinó mediante SEM (Fig 27 (a) y (d)). El tamaño de partícula es una de las características más importantes porque está relacionado con la estabilidad, captación celular, perfil de liberación, tasa de degradación y biodistribución [187, 188].

Las NPs se estabilizaron usando el tensioactivo no iónico poloxamer 407 (es un copolímero que consiste en una mezcla de un compuesto hidrofóbico de polipropilenglicol unido a un compuesto hidrófilico de polietilenglicol) y polietilenimina (PEI). El poloxamer 407 tiene carácter anfipático ya que puede interactúa con la superficie de las NPs a través del polipropileno hidrófobo y con el medio acuoso a través del polietilenglicol, pero presenta un efecto sobre las NPs y es que disminuye su potencial zeta [189]. Por esta razón, se utilizó PEI al 0.05% p/V para aumentar la carga superficial positiva de las NPs de PLA y PLGA. Esto se debe a la alta densidad de grupos amino primarios, que al aumentar la carga superficial positiva de las NPs aumentó la interacción con la membrana bacteriana, que posee una carga negativa [190]. De hecho, el potencial zeta fue de +22 y +30 mV para las NPs de PLA y PLGA, respectivamente (Fig. 27 (c) y (f)). Además, después del tratamiento con PEI el efecto antibacteriano de este compuesto se evaluó frente a las cepas patógenas a la misma concentración con la que se adicionó para la aumentar la carga superficial de las NPs. Esto se realizó con el fin de garantizar que no interfería con el efecto de los nanocompuestos (datos no mostrados).

Además, para determinar si el péptido se encontraba encapsulado o adsorbido a la superficie de las NPs, se determinaron los espectros FT-IR (Fig. 27g) de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K, el péptido GIBIM-P5S9K libre, el PLGA y el PLA en el intervalo de 4000-750 cm^{-1} ; estos tres últimos fueron tomados como control para comparar el espectro FT-IR de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K. El PLGA mostró bandas de absorción tales como vibración de tensión del grupo CH alifático (2850-2950 cm^{-1}), vibraciones de tensión simétrica (ν_s) y asimétrica (ν_{as}) del grupo funcional carbonilo C=O (1700-1800 cm^{-1}) y estiramiento C - O (1050-1250 cm^{-1}). La muestra de péptido libre mostró los picos principales aportados por los grupos funcionales de moléculas tales como estiramiento de OH de ácido carboxílico (2500-3000 cm^{-1}), amina superpuesta y estiramiento NH de amida (3300-3500 cm^{-1} y 3500-3700 cm^{-1}) y estiramiento de amida unida al C=O (1600-1690 cm^{-1}). Las bandas de absorción anteriormente mencionadas fueron tomadas como referencia y comparadas con el espectro FT-IR de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K.

Los resultados revelaron que el espectro FTI-R del PLA y PLGA puros fue muy similar al de las NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K, esto indica que una cantidad de péptido no se encuentra principalmente adsorbido sobre la superficie de las NPs y que puede encontrarse en solución en el núcleo de las NPs. Además, la banda principal de estiramiento del grupo amida N-H del péptido cargado en las NPs a 1600-690 cm^{-1} se redujo significativamente a pesar de que la cantidad de péptido era la misma en ambas muestras.

Por otro lado, el porcentaje de EE del péptido GIBIM-P5S9K en las NPs fue similar a otros fármacos encapsulados con esta metodología [186, 181] y fue mayor en las NPs de PLA- (75,1%) que en las NPs de PLGA (55,3%). (Tabla 11) [191].

El núcleo de las NPs de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K no se analizó, limitando la clasificación de estos nanocompuestos ya sea como nanocápsulas o como nanoesferas, esto debido a los costos del ensayo de crioSEM. La cuantificación del péptido encapsulado se realizó por RP-HPLC a partir de una curva de calibración (ver Anexo I).

Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas de las NPs de PLA y PLGA.

Nanopartículas	Tamaño promedio (d.nm)	PdI*	Potencial Zeta (mV)	Porcentaje de encapsulación (%)
GIBIM-P5S9K-cargado en PLA	352.6 ± 3.2	0.19 ± 0.02	+29.4 ± 1.5	75.1% ± 1.5
PLA	311.2 ± 5.2	0.33 ± 0.05	+14.4 ± 0.1	ND
GIBIM-P5S9K-cargado en PLGA	258.3 ± 3.5	0.25 ± 0.1	+22.7 ± 0.3	55.3% ± 2.0
PLGA	280.5 ± 9.5	0.32 ± 0.1	+15.6 ± 0.3	ND

* PdI: índice de polidispersión

ND: No determinado

4.2.2 Actividad antibacteriana de las NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K y NPs vacías

La actividad antimicrobiana del PAM GIBIM-P5S9K cargado en NPs de PLA o PLGA se determinó utilizando el método de microdilución en caldo debido a la sensibilidad del ensayo [172]. Además, a las NPs vacías (sin el péptido GIBIM-P5S9K) cargadas superficialmente con PEI al 0.05% p/v y con el poloxamer 407 también se les evaluó su actividad. Las NPs de PLA- o PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K presentaron una inhibición significativa del crecimiento de *E. coli* O157: H7, SARM y *P. aeruginosa*, de una manera dependiente de la dosis (Fig. 28), incluso a una concentración de péptido de 0.5 µM. No hubo diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de las bacterias tratadas con las NPs de PLA o PLGA cargadas con el péptido, excepto en la actividad de las NPs de PLA cargadas frente a *E. coli* O157: H7 (MIC₅₀ <0.5 µM) y su actividad fue mayor que la actividad de las NPs de PLGA cargadas (MIC₅₀ entre 1 y 10 µM).

Figura. 28. Actividad antibacteriana de las nanopartículas cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K. A) NPs de PLA frente a *E. coli* O157:H7; B) NPs de PLA frente a SARM; C) NPs de PLA frente a *P. aeruginosa*; D) NPs de PLGA frente a *E. coli* O157:H7; E) NPs de PLGA frente a SARM; F) NPs de PLGA frente a *P. aeruginosa*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

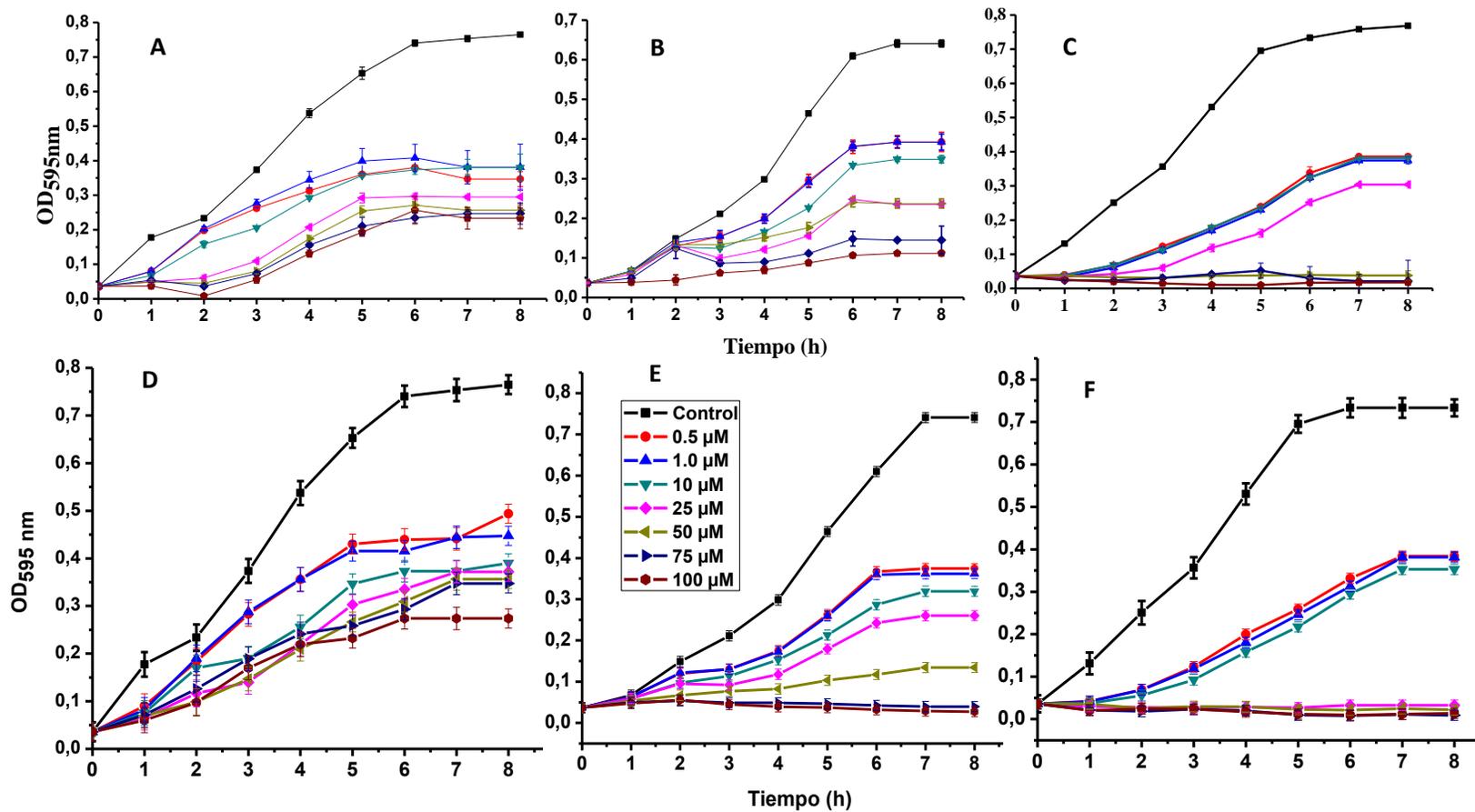


Tabla 12. Actividad antibacteriana de las nanopartículas de PLA y PLGA cargadas y péptido GIBIM-P5S9K libre.

Compuesto	<i>E. coli</i> O157:H7		SARM		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC ₅₀ (μM)	MBC (μM)	MIC ₅₀ (μM)	MBC (μM)	MIC ₅₀ (μM)	MBC (μM)
GIBIM-P5S9K	1.0-10	50	1.0-10.0	75	1.0-10	>100
NPs de PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K	1.0-10	>100	<0.5	>100	<0.5	>100
NPs de PLA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K	<0.5	>100	0.5-1.0	>100	<0.5	>100

En contraste, el péptido libre no presentó actividad antibacteriana a las concentraciones de 0.5 y 1 μM, pero a 10 μM mostró una inhibición del crecimiento bacteriano casi completa (Tabla 7, Cap. 3). Esta mayor actividad antibacteriana de la CMI_{50%} de las NPs de PLA y PLGA cargadas comparada con el péptido libre (Tabla 12) podría implicar una interacción electrostática de la carga superficial positiva de estas NPs (+22 y +30 mV) con la carga superficial negativa de la membrana en las cepas [36-39]. Esta interacción podría ser mediada por el ácido teicoico, lipoteicóticos o lipopolisacáridos y fosfolípidos en la superficie bacteriana [196, 197].

Las NPs de PLA y PLGA no cargadas, no mostraron una inhibición significativa del crecimiento frente a *E. coli* O157:H7, la cual fue tomada como control. El resultado indica que el efecto microbicida es debido netamente al péptido GIBIM-P5S9K (Anexo J).

Además, *P. aeruginosa* fue más susceptible a las NPs de PLA y PLGA cargadas con el péptido (Fig. 38 C y F) teniendo en cuenta que *P. aeruginosa* tiene una carga superficial aniónica menor SARM y *E. coli* con movilidades electroforéticas

de $-1.12 (\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$, $-2(\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$ y $-3(\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$, respectivamente [198]. Esto sugiere que el mayor potencial zeta de la cepa de *P. aeruginosa* puede generar una fuerte interacción electrostática con las NPs de PLA y PLGA cargadas positivamente en comparación con *E coli* y SARM.

4.2.3 Evaluación de la liberación *in vitro* del péptido GIBIM-P5S9K de las NPs de PLA y PLGA

El mecanismo de liberación del fármaco de las nanopartículas generalmente implica tres etapas. En la primera etapa se libera el fármaco unido a la superficie o atrapado en la NP. En la segunda etapa, el fármaco liberado se difunde a través de la matriz polimérica y los poros generados por la degradación de la matriz. Finalmente, en la tercera etapa el fármaco se libera al fluido durante la desintegración de la matriz polimérica [178, 187, 199]. La cinética de la liberación del péptido GIBIM-P5S9K de las NPs poliméricas de PLA y PLGA mostró un proceso de dos fases; la inicial en las primeras 8 horas siendo la liberación del péptido más rápida que la final para ambas NPs. En la fase inicial alrededor de 50% del péptido fue liberado de las NPs de PLA y PLGA con una mayor rapidez para las NPs de PLGA (Fig. 29). Estos resultados son acordes a los obtenidos por Taha y col., donde el péptido rMOMP-187 exhibió un perfil de liberación bifásico con una rápida liberación inicial (20% del péptido en un día) seguido de una liberación lenta sostenida durante un período de tres semanas.

4.2.4 Determinación de la estabilidad de las NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K en suero humano

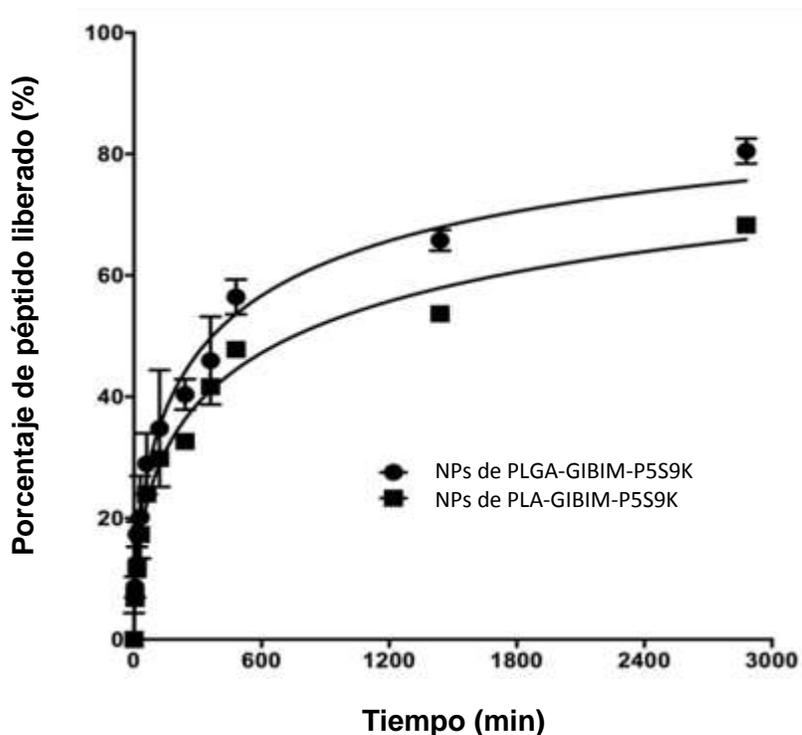
Se evaluó la estabilidad de las NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con péptido GIBIM-P5S9K en suero humano para determinar si había o no cambios en las propiedades físicas. Esto resulta muy crítico cuando el nanocompuesto se entrega por vía intravenosa [179]. Los tamaños de las NPs de PLA y PLGA

cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K fueron evaluadas en suero humano al 10% eran 65% del tamaño en solución acuosa y comenzaron a aumentar a lo largo del tiempo de incubación, alcanzando el 82% y 92% del tamaño en solución acuosa a 240 min para las NPs de PLGA y PLA, respectivamente (Tabla 13). El PDI se situó entre 3.2 y 5.1, lo que indica una población homogénea de NPs durante el tiempo de incubación en suero. La carga superficial de las NPs de PLGA y PLA en suero humano al 10% fue negativa, aumentando a lo largo del tiempo de incubación, especialmente la carga negativa de NPs de PLA, que aumentó en un 50% durante 240 min de incubación en suero. Esto sugiere interacciones entre las NPs y moléculas de suero formando estructuras híbridas. Una de estas moléculas de suero podría ser la albúmina sérica humana (HSA), que es la proteína sérica más abundante y se carga negativamente a pH 7.2. HSA adsorbiéndose a NPs podría explicar el aumento en el tamaño y en la carga de superficie negativa de NPs durante la incubación en suero. Este cambio en las propiedades físicas de las NPs durante la incubación del suero podría ser debido a un efecto osmótico ejercido por las sales presentes en la solución tampón y el suero humano, como se ha informado [179, 200].

Tabla 13. Estabilidad en suero de las NPs de PLA y PLGA cargados con GIBIM-P5S9K.

Tiempo (min)	NPs de PLGA cargadas con GIBIM-P5S9K		NPs de PLA cargadas con GIBIM-P5S9K	
	Tamaño promedio (nm)	Potencial Z (mV)	Tamaño promedio (nm)	Potencial Z (mV)
0	169.3±4.5	-7.15±0.6	139.5±3.2	-9.44±0.5
60	182.2±3.2	-7.17±0.2	146.5±2.1	-12.7±0.3
120	184.8±4.8	-7.65±0.4	163.6±3.2	-14.6±0.3
240	211.9±5.1	-7.67±0.7	194.4±4.0	-14.3±0.4
NPs sin suero	258.3±3.5	+22.7±0.3	352.6±5.2	+29.4±1.53

Figura 29. Liberación *in vitro* del péptido GIBIM-P5S9K de las NPs. Perfil de liberación de nanopartículas poliméricas bajo las mismas condiciones de incubación, pH y velocidad de agitación.

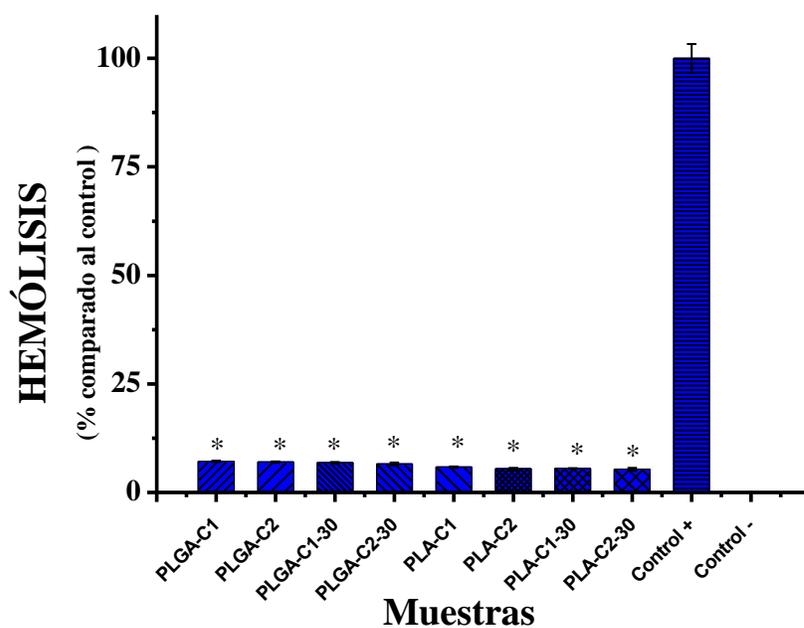


4.2.5 Determinación de la actividad hemolítica de NPs poliméricas de PLA y PLGA cargadas con péptido GIBIM-P5S9K

Los eritrocitos humanos se incubaron con péptido cargado y no cargados de PLA y PLGA a dos concentraciones (0,5 a 1% p/v); Los porcentajes de hemólisis de estas NPs cargadas con el péptido GIBIM-P5S9K fueron inferiores al 10%. Teniendo en cuenta que uno que ocasiona <10% de hemólisis se considera no hemolítica o hemocompatible [180] (Fig. 30), estas NPs se consideran sustancias hemocompatibles y podrían ser administradas por vía parenteral [24]. Además, este resultado sugiere un efecto específico sobre la membrana bacteriana considerando que la diana del péptido es la estructura de la membrana.

Adicionalmente, la actividad hemolítica del péptido encapsulado con relación al péptido libre disminuyó, ya que el porcentaje de hemólisis del péptido no encapsulado fue de 25%. [186, 201].

Figura 30. Actividad hemolítica del péptido GIBIM-P5S9K encapsulado en PLGA y PLA. Las concentraciones finales utilizadas fueron PGLA y PLA para C1 y C2 5 y 0,5 mg/mL, respectivamente. * P <0.05 versus células de viabilidad sin compuesto (control positivo).



5. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un estudio proteómico con técnicas como electroforesis en dos dimensiones que permita identificar las proteínas de membrana implicadas en la actividad antibacteriana y antiparasitaria de los péptidos libres y encapsuladas en cada uno de los polímeros utilizados.
- ✓ Visualizar por microscopía electrónica de transmisión el daño de los péptidos libres y encapsulados a través del tiempo en los microorganismos utilizados como modelo en esta tesis.
- ✓ Determinar el porcentaje de citotoxicidad de los péptidos encapsulados y de las nanopartículas sobre otras líneas celulares relacionadas con la aplicación deseada como células epiteliales, así como también sobre líneas celulares cancerígenas como las células HeLa.
- ✓ Utilizar otra estrategia de protección de péptidos a degradación enzimática como ciclación, glicosilación, bioconjugación, entre otras, para evaluar la eficacia de la encapsulación.
- ✓ Determinar la farmacodinamia de los nanocompuestos encapsulados bajo condiciones experimentales *in vivo* mediante el uso de modelos animales.

6. CONCLUSIONES

- Mediante el diseño *in silico* se obtuvieron 18 moléculas con propiedades fisicoquímicas que son características de péptidos antimicrobianos tales como: PAP mayor al 96%, índice de inestabilidad menor a 40, carga neta catiónica (entre +3 y +6), pI entre 10.04 a 12.03 y GRAVY de -0.62 a 1.14.
- El método de síntesis seleccionado, resultó muy adecuado para la síntesis de péptidos con secuencias cortas (17 Aa), ya que las masas teóricas y experimentales determinadas por espectrometría de masas MALDI-TOF fueron acordes.
- Los péptidos sintetizados presentaron una estructura secundaria α - hélice comprobada por los espectros de DC, exhibiendo dos bandas de absorción a 205 y 215 nm en presencia de TFE al 30%.
- Las sustituciones en la región media de la secuencia del PAM, por aminoácidos que confieren carga o aumento de la hidrofobicidad, inciden positivamente sobre la actividad de los PAMs. Asimismo, las sustituciones de aminoácidos en las regiones C- o N- terminal del PAM no generaron efecto antibacteriano sobre las cepas evaluadas.
- La generación de secuencias *in silico* usando algoritmos genéticos permitió obtener péptidos biológicamente activos, que luego fueron mejorados mediante el análisis bioinformático racional, para su posterior síntesis, pudiendo de esta forma empalmar un trabajo interdisciplinario teórico-práctico.
- La actividad antibacteriana de los PAMS sintetizados frente a *E. coli* fue mayor que la actividad antibacteriana frente a SARM y *P. aeruginosa*. Las concentraciones mínimas inhibitorias alcanzadas frente a *E. coli* fueron de 0.5

μM , 5.0 y 10 μM para los péptidos GIBIM-P5F8W, GIBIM-P6 Y GIBIM-P5S9K, respectivamente siendo valores menores a los publicados en la literatura.

- La toxicidad de los péptidos en eritrocitos produjo un porcentaje de hemólisis menor al 40% a 50 μM . Por su parte, en las líneas celulares de A549 y HepG2 el único compuesto que presentó toxicidad fue GIBIM-P5F8W dejando el 36% de células viable a 100 μM en A549. Además, los péptidos de GIBIM- P3 y GIBIM-P4 indujeron el crecimiento de las células HepG2 a ciertas concentraciones.
- Los péptidos más activos diseñados en esta tesis fueron de amplio espectro, ya que inhibieron los parásitos de *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi* a concentraciones tan bajas de 0.5 μM para el péptido GIBIM-F8W en amastigotes. Cabe resaltar que los péptidos GIBIM-P2G17L y GIBIM-P2G17I también fueron activos frente a los parásitos, sin serlo muy eficazmente frente a las bacterias. Además, presentaron permearon la membrana bacteriana y parasitaria sin el uso de translocación vía receptores, mecanismo de acción que es el más común en fármacos a base de péptido que se encuentran en fase clínica.
- Los PAMs más potentes frente a las bacterias patógenas fueron GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W. Estos péptidos adoptan una estructura α -helicoidal en ambientes diseñados para imitar membranas celulares y son capaces de permear la membrana de bacterias patógenas de una manera dependiente de la dosis. Además, pueden considerarse como compuestos selectivos debido a la baja toxicidad en las células eucariotas.
- Se sintetizaron NPs empleando PLGA y PLA como agentes encapsulantes mediante una ruta de doble emulsión-evaporación de solvente empleando PEI como agente catiónico y Poloxamero 407 como surfactante. Las NPs presentaron morfología esférica con tamaños entre 300-400 nm para PLA y 200-300 nm para PLGA con carga superficial $> 20\text{mV}$ e índice de polidispersidad < 0.3 .

- La encapsulación en nanopartículas poliméricas empleando la metodología de doble emulsión ($W_1/O/W_2$) en matrices de polímeros hidrofóbicos tipo éster se logró alcanzando porcentajes de encapsulación superiores a 50% bajo las condiciones de síntesis y purificación estandarizadas en el presente trabajo.
- Los resultados obtenidos indican que las nanopartículas sintetizadas constituyen un método alternativo y prometedor para el suministro del péptido GIBIM-P5S9K, que fue uno de los más activos, mejorando el MIC_{50} comparado con el PAM libre. Además, alrededor del 50% del péptido se libera *in vitro* durante las primeras 8h.
- El péptido GIBIM-P5S9K encapsulado en las NPs fue estable en suero humano. Los resultados obtenidos indican que las nanopartículas sintetizadas representan un método alternativo prometedor para el suministro del péptido GIBIM-P5S9K y aún más importante como sistema de protección de degradación enzimática.

7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. M. Brogan, E. Mossialos, A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility, *Global. Health.*, 12 (2016) 1–7.
- [2] V. K. Sharma, N. Johnson, L. Cizmas, T. J. McDonald, H. Kim, A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes, *Chemosphere.*, 150 (2016) 702–714.
- [3] J. Carlet, J. L. Mainardi, Antibacterial agents: Back to the future? Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin?. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18 (2012) 1–3.
- [4] WHO, Antimicrobial resistance, *Bull. World Health Organ.*, 61 (2014) 383–394.
- [5] J. Y. Lim, J. Yoon, C. J. Hovde, A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7, *Biotechnol.*, 20 (2010) 5–14.
- [6] P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, R. V. Tauxe, Food-related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.*, 5 (1999) 607–625.
- [7] S. Mattar, J. Visbal, and G. Arrieta, *E. coli* O157: H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en Colombia, *MVZ Córdoba*, 2 (2001) 81–86.
- [8] T. Strateva, D. Yordanov, *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance, *J. Med. Microbiol.*, 58 (2009) 1133–1148.
- [9] J. Meng, S. Zhao, M. Doyle, and S. Joseph, Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157: H7 and O157: NM Isolated from Animals, Food, and Humans, *J. Food*, 61 (1998) 1511–1514.
- [10] M. S. Niederman, Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care, *Crit. Care Med.*, 29 (2001) N114-20.
- [11] A. I. Hidron, J.R. Edwards, J. Patel, T. C. Horan, D. M. Sievert, D.A. Pollock, S. K. Fridkin, NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data

- reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 29 (2008) 996–1011.
- [12] C. A. Alvarez, N. Yomayusa, A. L. Leal, J. Moreno, S. Mendez-Alvarez, M. Ibañez, N. Vanegas, Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia, *Am. J. Infect. Control.*, 38 (210) 315–318.
- [13] N. H. Mann, The potential of phages to prevent MRSA infections, *Res. Microbiol.*, 159 (2008) 400–405.
- [14] A. Pantosti, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health, *Front. Microbiol.*, 3 (2012) 1–12.
- [15] D. Lozano, L. Díaz, M. Echeverry, S. Pineda, S. Máttar, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba, *Universitas Scientiarum*, 1352 (2010) 159–165.
- [16] A. S. Chaudhary, A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotic's discovery, *Acta Pharm. Sin. B.*, 6 (2016) 552–556.
- [17] E. M. Wellington, A.B. Boxall, P. Cross, E. J. Feil, W. H. Gaze, P. M. Hawkey, A. S. Johnson-Rollings, D. L. Jones, N. M. Lee, W. Otten, C. M. Thomas, A. P Williams, The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria, *Lancet Infect. Dis.*, 13 (2013) 155–165.
- [18] J. M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, T. G. Villa, Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria, *Biochem. Pharmacol.*, 133 (2017) 117-138.
- [19] M. Zhu, P. Liu, Z. Niu, Review A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides, *Chinese Chem. Lett.*, 28 (2017) 703-708.
- [20] J. Cruz, C. Ortiz, F. Guzmán, R. Fernández-Lafuente, and R. Torres, Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic

- microorganisms., *Curr. Med. Chem.*, 21 (2014) 2299–321.
- [21] L. S. Tavares, J. V. Rettore, R. M. Freitas, W. F. Porto, A. P. Duque, Jde L Singulani, O. N. Silva, Mde L Detoni, E. G. Vasconcelos, S. C. Dias, O. L. Franco, M de O. Santos., Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds, *Peptides*, 37 (2012) 294–300.
- [22] A. A. Bahar, D. Ren, Antimicrobial peptides, *Pharmaceuticals*, 6 (2013). 1543–1575.
- [23] H. Jenssen, P. Hamill, R. E. W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2006) 491–511.
- [24] S. Kobayashi, K. Takeshima, C. B. Park, S. C. Kim, K. Matsuzaki, Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: Proline as a translocation promoting factor, *Biochemistry*, 39 (2000) 8648–8654.
- [25] C. B. Park, K. S. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, and S. C. Kim, Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (2000) 8245–8250.
- [26] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers.*, 55 (2000) 4–30.
- [27] A. Giangaspero, L. Sandri, A. Tossi, Amphipathic a helical antimicrobial peptides activity, *Biopolymers*, 5600 (2001) 5589–5600.
- [28] G. B. Fields, R. L. Noble, Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35 (2009) 161–214.
- [29] J. M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Adv.*, 4 (2014) 32658–32672.
- [30] J. A. Borgia, G. B. Fields, Chemical synthesis of proteins, *Trends Biotechnol.*, 18 (2000) 243–251.
- [31] M. Aguilar, HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols, *Human*

press, 251 (2004)

- [32] A. P. Il'ina, O. G. Kulikova, D. I. Maltsev, M. S. Krasnov, E. Yu. Rybakova, V. S. Skripnikova, E. S. Kuznetsova, A. K. Buryak, Email author, V. P. Yamskov, A. Yamskov., MALDI-TOF mass spectrometric identification of novel intercellular space peptides, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 47 (2011) 118–122.
- [33] K. Bakshi, M. Liyanage, D. Volkin, C. Middaugh, Circular dichroism of peptides, *Methods Mol. Biol.*, 1088 (2014) 247–253.
- [34] G. Maróti, A. Kereszt, E. Kondorosi, P. Mergaert, Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals, *Res. Microbiol.*, 162 (2011) 363–374.
- [35] V. Teixeira, M. J. Feio, M. Bastos, Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes, *Prog. Lipid Res.*, 51 (2012) 149–177.
- [36] D. Sengupta, H. Leontiadou, A. E. Mark, and S.-J. Marrink, Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder, *Biochim. Biophys. Acta*, 1778 (2008) 2308–2317.
- [37] X. Vila-Farrés, E. Giralt, J. Vila, Update of peptides with antibacterial activity, *Curr. Med. Chem.*, 19 (2012) 6188–98.
- [38] H. Yu, C. Wang, L. Feng, S. Cai, X. Liu, X. Qiao, N. Shi, H. Wang, Y. Wang, Cathelicidin-trypsin inhibitor loop conjugate represents a promising antibiotic candidate with protease stability, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 2600-2617.
- [39] N. Yang, X. Liu, D. Teng, Z. Li, X. Wang, R. Mao, X. Wang, Y. Hao, J. Wang, Antibacterial and detoxifying activity of NZ17074 analogues with multi-layers of selective antimicrobial actions against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 3392-3411.
- [40] A. K. Tripathi, T. Kumari, M. K. Harioudh, P. K. Yadav, M. Kathuria, P. K. Shukla, K. Mitra, J. K. Ghosh, Identification of GXXXXG motif in Chrysopsin-1 and its implication in the design of analogs with cell-selective antimicrobial and anti-endotoxin activities, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 3384-3400.
- [41] A. K. Tripathi, Kumari, A. Tandon, M. Sayeed, T. Afshan, M. Kathuria M, P.

- K. Shukla, K. Mitra, J. K. Ghosh JK, Selective phenylalanine to proline substitution for improved antimicrobial and anticancer activities of peptides designed on phenylalanine heptad repeat, *Acta Biomater.*, 57 (2017) 170-186.
- [42] Y. Gao, D. Wu, L. Wang, C. Lin, C. Ma C, X. Xi, M. Zhou, J. Duan, O. R. P. Bininda-Emonds, T. Chen, C. Shaw, Targeted Modification of a Novel Amphibian Antimicrobial Peptide from *Phyllomedusa tarsius* to Enhance Its Activity against MRSA and Microbial Biofilm, *Front. Microbiol.*, 8 (2017) 1–9.
- [43] J. S. Kim, J. H. Joeng, Y. Kim, Design, Characterization, and Antimicrobial Activity of a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactophorin, *J Microbiol Biotechnol.*, 27 (2017) 759–767.
- [44] B. Liu, H. Huang, Z. Yang, B. Liu, S. Gou, C. Zhong, X. Hang, Y. Zhang, J. Ni, R. Wang, Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy, *Peptides*, 88 (2017) 115–125
- [45] L. Gottler, A. Ramamoorthy, Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan – A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed From Magainin Lindsey, *Biochim Biophys Acta.*, 1788 (2009) 1680–1686.
- [46] A. Trotti, A. Garden, P. Warde, P. Symonds, C. Langer, R. Redman, T. F. Pajak, T. R. Fleming, M. Henke, J. Bourhis, D. I. Rosenthal, E. Junor, A. Cmelak, F. Sheehan, J. Pulliam, P. Devitt-Risse, H. Fuchs, M. Chambers, B. O'Sullivan, K. K. Ang, .A multinational, randomized phase iii trial of iseganan hcl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 58 (2004) 674–681.
- [47] W. T. Jellema, D. P. Veerman, R. J. De Winter, K. H. Wesseling, S. J. Van Deventer, C. E. Hack, J. J. van Lieshout, *In vivo* interaction of endotoxin and recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23): Hemodynamic effects in a human endotoxemia model, *J. Lab. Clin. Med.*, 140 (2002) 228–235.

- [48] S. C. Yadav, A. Kumari, R. Yadav, Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation, *Peptides*, 32 (2011) 173–187.
- [49] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine*, 2 (2006) 53–65.
- [50] T. D. Dziubla, A. Karim, V. R. Muzykantov, Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis, *J. Control. Release*, 102 (2005) 427–439.
- [51] J. A. Y. R. Joshi, R. P. Patel, role of biodegradable polymers, *Academic Science*, 4 (2012) 74-81.
- [52] M. T. Ramesan, K. Suhailath, Role of nanoparticles on polymer composites, *Micro and Nano Fibrillar Composites*, (2017) 301-326.
- [53] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 75 (2010) 1–18.
- [54] A Brandelli, Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides, *Mini Rev. Med. Chem.*, 12 (2012) 731–741
- [55] B. Sarmiento, A. Ribeiro, F. Veiga, P. Sampaio, R. Neufeld, D. Ferreira, Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery, *Pharm. Res.*, 24 (2007) 2198–2206.
- [56] A M. De Campos, A Sánchez, M. J. Alonso, Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A, *Int. J. Pharm.*, 224 (2001) 159–68.
- [57] J. Xie, C. H. Wang, Encapsulation of Proteins in Biodegradable Polymeric Microparticles using Electrospray in the Taylor Cone-Jet Mode, *Biotechnol Bioeng.*, 97 (2007) 1278–1290.
- [58] Z. Lu, T. Yeh, M. Tsai, J. L. Au, M. G. Wientjes, Paclitaxel-Loaded Gelatin Nanoparticles for Intravesical Bladder *Cancer Therapy*, 10 (2004) 7677–7684.
- [59] A. Kaur, S. Jain, A. K. Tiwary, Mannan-coated gelatin nanoparticles for

- sustained and targeted delivery of didanosine: in vitro and in vivo evaluation, *Acta Pharm.*, 58 (2008). 61–74.
- [60] A. K. Bajpai, J. Choubey, Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 17 (2006) 345–358.
- [61] S.-H. Li, S.-X. Cai, B. Liu, K.-W. Ma, Z.-P. Wang, X.-K. Li, In vitro characteristics of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres incorporating gelatin particles loading basic fibroblast growth factor, *Acta Pharmacol. Sin.*, 27 (2006) 754–759.
- [62] A. R. Patel, S. Kulkarni, T. D. Nandekar, P. R. Vavia, Evaluation of alkyl polyglucoside as an alternative surfactant in the preparation of peptide-loaded nanoparticles, *J. Microencapsul.*, 25 (2008) 531–540.
- [63] M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, E. Dellacherie, C. Vigneron, Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *J. Control. Release*, 60 (1999) 179–188.
- [64] S. H. Lee, Z. Zhang, S.-S. Feng, Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery, *Biomaterials*, 28 (2007) 2041–2050.
- [65] Y. Sheng, Y. Yuan, C. Liu, X. Tao, X. Shan, F. Xu, In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20 (2009) 1881–1891.
- [66] P. S. Kumar, S. Ramakrishna, T. R. Saini, and P. V Diwan, Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles, *Pharmazie*, 61 (2006) 613–617.
- [67] D. K. Sahana, G. Mittal, V. Bhardwaj, and M. N. V. R. Kumar, PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug, *J Pharm Sci.* 97 (2008) 1530–1542.

- [68] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Préat, Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation, *J. Control. Release*, 133 (2009) 11–7.
- [69] V. Labhasetwar, C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski, R. J. Levy, Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications, *J. Pharm. Sci.*, 87 (1998) 1229–1234.
- [70] Y. Yin, D. Chen, M. Qiao, X. Wei, H. Hu, Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution, *J. Control. Release*, 123 (2007) 27–38.
- [71] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, M. Besnard, A. Bochot, and E. Fattal, Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 331(2007) 153–159.
- [72] B. Mishra, S. Reiling, D. Zarena, G. Wang, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 38 (2017) 87–96.
- [73] G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education, *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016) D1087–D1093.
- [74] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389–395.
- [75] G. Wang, R. F. Epand, B. Mishra, T. Lushnikova, V. C. Thomas, K. W. Bayles, R. M. Epand, Decoding the functional roles of cationic side chains of the major antimicrobial region of human cathelicidin LL-37, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (2012) 845–856.
- [76] S. Kang, S. J. Park, Antimicrobial peptides: therapeutic potentials, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 12 (2014) 1477–1486.
- [77] G. Maccari, M. Di Luca, R. Nifosi, *In silico* design of antimicrobial peptides, *Methods Mol Biol.*, 1268 (2015) 195–219.
- [78] B. Liu, H. Huang, Z. Yang, B. Liu B, S. Gou, C. Zhong, X. Han, Y. Zhang, J. Ni, R. Wang, Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with

- enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy, *Peptides*, 88 (2017) 115–125.
- [79] N. Yang, X. Liu X, D. Teng, Z. Li, X. Wang, R. Mao, X. Wang, Y. Hao, J. Wang, Antibacterial and detoxifying activity of NZ17074 analogues with multi-layers of selective antimicrobial actions against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 3392.
- [80] L. Grassi, G. Maisetta, G. Maccari, S. Esin, G. Batoni, Analogs of the Frog-skin Antimicrobial Peptide Temporin 1Tb Exhibit a Wider Spectrum of Activity and a Stronger Antibiofilm Potential as Compared to the Parental Peptide, *Front. Chem.*, 5, (2017) 1–13.
- [81] Y. Gao, D. Wu, L. Wang, C. Lin, C. Ma, X. Xi, M. Zhou, J. Duan, O. R. P. Bininda-Emonds, T. Chen, C. Shaw, Targeted Modification of a Novel Amphibian Antimicrobial Peptide from *Phyllomedusa tarsius* to Enhance Its Activity against MRSA and Microbial Biofilm, *Front. Microbiol.*, 8 (2017) 1–9.
- [82] J. Oñate-Garzón, A. Ausili, M. Manrique-Moreno, A. Torrecillas, F. J. Aranda, E. Patiño, J. C. Gomez-Fernández, The increase in positively charged residues in cecropin D-like *Galleria mellonella* favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 629 (2017) 54–62.
- [83] F. Merlino, A. Carotenuto, B. Casciaro B, F. Martora, M. R. Loffredo, A. Di Grazia, A. M. Yousif, D. Brancaccio D, L. Palomba, E. Novellino, M. Galdiero, M. R. Iovene, M. L. Mangoni, P. Grieco , Glycine-replaced derivatives of [Pro 3 ,DLeu 9]TL, a temporin L analogue: Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and hemolytic activities, *Eur. J. Med. Chem.*, 139 (2017) 750-761.
- [84] S. Rodziewicz-Motowidło, B. Mickiewicz, K. Greber, E. Sikorska, L. Szultka, E. Kamysz, W Kamysz, Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide, *FEBS J.*, 277 (2010) 1010–22.
- [85] E. Glattard, E. S. Salnikov, C. Aisenbrey, B. Bechinger, Investigations of the

- synergistic enhancement of antimicrobial activity in mixtures of magainin 2 and PGLa, *Biophys. Chem.*, 210 (2016) 35–44.
- [86] H.-L. Chen, C.-C. Yen, C.-Y. Lu, C.-H. Yu, and C.-M. Chen, Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 3277–3282.
- [87] L. M. Yin, M. a Edwards, J. Li, C. M. Yip, C. M. Deber, Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 7738–7745.
- [88] P. Rondón-Villareal, D.A. Sierra, R. Torres, Machine learning in the rational design of antimicrobial peptides, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, 10 (2014) 183-190.
- [89] K. Hilpert, C. D. Fjell, A. Cherkasov, Peptide-Based Drug Design, Totowa, NJ: *Humana Press*, 494 (2008) .
- [90] J. Ye, S. McGinnis, T. L. Madden, BLAST: Improvements for better sequence analysis, *Nucleic Acids Res.*, 34 (2006) 6-9.
- [91] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan , N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T. L. Madden, BLAST+: architecture and applications, *BMC Bioinformatics*, 10 (2009) 421-429.
- [92] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, J. D. Thompson, Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs, *Nucleic Acids Res.*, 31 (2003) 3497–3500
- [93] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23 (2007) 2947–2948.
- [94] R. A. Houghten, General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 (1985) 5131–5135.
- [95] G. B. Fields, R. L. Noble, Solid phase peptide synthesis utilizing 9-

- fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35 (2009) 161–214.
- [96] C. A. Alvarez, F. Guzmán, C. Cárdenas, S. H. Marshall, L. Mercado, Antimicrobial activity of trout hepcidin, *Fish Shellfish Immunol.*, 41 (2014) 93–101.
- [97] C. Jofré, F. Guzmán, C. Cárdenas, F. Albericio, S. H. Marshall, 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 (2011) 852–858.
- [98] A. P. Il'ina, O. G. Kulikova, D. I. Maltsev, M. S. Krasnov, E. Yu. Rybakova, V. S. Skripnikova, E. S. Kuznetsova, A. K. Buryak, V. P. Yamskova, I. A. Yamskov, MALDI-TOF mass spectrometric identification of novel intercellular space peptides, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 47 (2011) 118–122.
- [99] K. A. Dave, M. J. Headlam, T. P. Wallis, J. J. Gorman, Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, Chapter 16:Unit 16.13. (2011).
- [100] O. F. Luna, J. Gomez, C. Cárdenas, F. Albericio, S. H. Marshall, F. Guzmán, Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: Moving away from piperidine?, *molecules*, 21 (2016) 1–12.
- [101] K. Bakshi, M. Liyanage, D. Volkin, and C. Middaugh, Circular dichroism of peptides, *Methods Mol Biol.*, 1088 (2014) 247–253.
- [102] J. Cruz, C. Ortiz, F. Guzmán, C. Cárdenas, R. Fernandez-Lafuente, and R. Torres, Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Biopolymers.*, 101 (2014) 319–328.
- [103] E. Klu, S. Schulz-maronde, S. Scheid, B. Meyer, W. Forssmann, Structure - Activity Relation of Human α -Defensin 3: Influence of Disulfide Bonds and Cysteine Substitution on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity, *Biochemistry*, 3 (2005) 9804–9816.

- [104] R. Gopal, C. H. Seo, P. I. Song, Y. Park, Effect of repetitive lysine-tryptophan motifs on the bactericidal activity of antimicrobial peptides, *Amino Acids*, 44 (2013) 645–660.
- [105] C. Van Kraaij, E. Breukink, H. S. Rollema, R. J. Siezen, R. A. Demel, De Kruijff B, Kuipers OP. Influence of charge differences in the C-terminal part of nisin on antimicrobial activity and signaling capacity, *Eur. J. Biochem.*, 247 (1997) 114–120.
- [106] K. Matsuzaki, A. Nakamura, O. Murase, K. I. Sugishita, N. Fujii, and K. Miyajima, Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge, *Biochemistry*, 36 (1997) 2104–2111.
- [107] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.*, 501 (2001) 146–150.
- [108] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance, *Pharmacol. Rev.*, 55 (2003) 27-55.
- [109] W. Aoki, M. Ueda, Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics, *Pharmaceuticals*, 6 (2013) 1055–1081.
- [110] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Amphipathic, a helical antimicrobial peptides activity, *Biopolymers*, 55 (2000) 4-30.
- [111] S. Idicula-thomas, P. V Balaji, Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*, *Protein Sci*, 14 (2005) 582-592.
- [112] W. Chen, B. Yang, H. Zhou, L. Sun, J. Dou, H. Qian, W. Huang, Y. Mei, J. Han, Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15, *Peptides*, 32 (2011) 2497–2503.
- [113] D. J. Schibli, L. T. Nguyen, S. D. Kernaghan, Ø. Rekdal, H. J. Vogel, Structure-function analysis of tritrypticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures, *Biophys. J.*, 91 (2006) 4413–4426.

- [114] J.-P. S. Powers, A. Rozek, R. E. W. Hancock, Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1698 (2004) 239–250.
- [1115] J. Cruz, C. Ortiz, F. Guzmán, R. Fernández-Lafuente, R. Torres, Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms, *Curr. Med. Chem.*, 21 (2014) 2299–2321.
- [116] G. Batoni, G. Maisetta, S. Esin, Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1858 (2016) 1044–1060.
- [117] N. Malanovic, K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1858 (2016) 936–946.
- [118] B. Liu, H. Huang, Z. Yang, B. Liu B, S. Gou, C. Zhong, X. Han, Y. Zhang, J. Ni, R. Wang, Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy, *Peptides*, 88 (2017) 115–125.
- [119] N. Yang, X. Liu, D. Teng , Z. Li , X. Wang X, R. Mao, X. Wang, Y. Hao, J. Wang, Antibacterial and detoxifying activity of NZ17074 analogues with multi-layers of selective antimicrobial actions against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 3392.
- [120] L. Grassi, G. Maisetta, G. Maccari, S. Esin, G. Batoni, Analogs of the Frog-skin Antimicrobial Peptide Temporin 1Tb Exhibit a Wider Spectrum of Activity and a Stronger Antibiofilm Potential as Compared to the Parental Peptide, *Front. Chem.*, 5 (2017) 1–13.
- [121] K. J. Hallock, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain, *Biophys. J.*, 84 (2003) 3052–60.
- [122] A. M. van der Does, S. J. P. Bogaards, B. Ravensbergen, H. Beekhuizen, J. T. van Dissel, P. H. Nibbering, Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven monocyte

- differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54 (2010) 811–816.
- [123] J. Cruz, C. Ortiz, F. Guzmán, C. Cárdenas, R. Fernandez-Lafuente, R. Torres, Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Biopolymers*, 101 (2014) 319–328.
- [124] X. Zhu, Z. Ma, J. Wang, S. Chou, A. Shan, Importance of Tryptophan in Transforming an Amphipathic Peptide into a *Pseudomonas aeruginosa*-Targeted Antimicrobial Peptide, *PLoS One*, 9 (2014) 1–19.
- [125] J. J. Pérez-Cordero, J. M. Lozano, J. Cortés, G. Delgado, Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells, *Peptides*, 32, (2011) 683–690.
- [126] M. C. B. Erfe, C. V. David, C. Huang, V. Lu, A. C. Maretti-Mira, J. Haskell, K. W. Bruhn, M. R. Yeaman, N. Craft, Efficacy of synthetic peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* species in vitro and in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (2012) 658–665.
- [127] S. L. Cobb, P. W. Denny, Antimicrobial peptides for leishmaniasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 11 (2010) 868–875.
- [128] Y. Zhao, M. Zhang, S. Qiu, J. Wang, J. Peng, P. Zhao, R. Zhu, H. Wang, Y. Li, K. Wang, W. Yan, R. Wang, Antimicrobial activity and stability of the d-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide polybia-MPI, *AMB Express*, 6 (2016) 122-130.
- [129] M. Fernandez-Reyes, D. Díaz, B. G de la Torre, A. Cabrales-Rico, M. Vallès-Miret, J. Jiménez-Barbero, D. Andreu, L. Rivas, Lysine N ϵ -Trimethylation, a Tool for Improving, *J. Med. Chem.*, (2010) 5587–5596.
- [130] M. Nakhjavani, A. Zarghi, F. H Shirazi, Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines, *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, 13 (2014) 953–958.
- [131] , L. T. Nguyen, J. K. Chau, N. A. Perry, L. de Boer, S. A. J. Zaat, H. J. Vogel, Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide

- analogs, *PLoS One*, 5 (2010) 1–8.
- [132] H. Kim, J. H. Jang, S. C. Kim, J. H. Cho, *De novo* generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity, *J. Antimicrob. Chemother.*, 69 (2014) 121–132.
- [133] C. A. Álvarez, F. Guzmán, C. Cárdenas, S. H. Marshall, L. Mercado, Antimicrobial activity of trout hepcidin, *Fish Shellfish Immunol.*, 41 (2014) 93–101.
- [134] T. Silva, M. A. Abengózar, M. Fernández-Reyes, D. Andreu, K. Nazmi, J. G. Bolscher, M. Bastos, L. Rivas, Enhanced leishmanicidal activity of cryptopeptide chimeras from the active N1 domain of bovine lactoferrin, *Amino Acids*, 43 (2012) 2265–2277.
- [135] J. M. Saugar, T. Alarcón, S. López-Hernández, M. López-Brea, D. Andreu, and L. Rivas, Activities of polymyxin B and cecropin A-melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (2002) 875–878.
- [136] F. Guilhelmelli, N. Vilela, K. S. Smidt, M. de Oliveira, A. da Cunha Morales Álvares, A., M. C. L. Rigonatto, P. H. da Silva Costa, A. H. Tavares, S. M. de Freitas, A. M. Nicola, O. L. Franco, L. de S. Derengowski, E. F. Schwartz, M. R. Mortari, A. L. Bocca, P. Albuquerque, I. Silva-Pereira, Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms, *Front. Microbiol.*, 7 (2016) 1844.
- [137] N. Berthold, P. Czihal, S. Fritsche, U. Sauer, G. Schiffer, D. Knappe, G. Alber, R. Hoffmann, Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by Gram-negative pathogens, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (2013) 402–409.
- [138] J. Y. Kim, S. C. Park, M. Y. Yoon, K. S. Hahm, Y. Park, C-terminal amidation of PMAP-23: Translocation to the inner membrane of Gram-negative bacteria, *Amino Acids*, 40 (2011) 183–195.
- [139] D. I. Andersson, D. Hughes, J. Z. Kubicek-Sutherland, Mechanisms and

- consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides, *Drug Resist. Updat.*, 26 (2016) 43–57.
- [140] D. Oh, J. Sun, A. Nasrolahi Shirazi, K. L. LaPlante, D. C. Rowley, K. Parang, Antibacterial Activities of Amphiphilic Cyclic Cell-Penetrating Peptides against Multidrug Resistant Pathogens, *Mol. Pharm.*, 5 (2014) 161–171.
- [141] Y. Shai, Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides, *Biopolymers*, 66 (2002) 236–248.
- [142] H.-S. Joo, C. Fu, M. Otto, Bacterial Strategies of Resistance to Antimicrobial Peptides, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 371 (2016) 20150292.
- [143] D. I. Chan, E. J. Prenner, H. J. Vogel, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006) 1184–1202.
- [144] D. J. Schibli, R. F. Epand, H. J. Vogel, and R. M. Epand, Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions, *Biochem. Cell Biol.*, 80 (2002) 667–677.
- [145] R. M. Epand, H. J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1462 (1999) 11–28.
- [146] J. A. Tennessen and M. S. Blouin, A revised leopard frog phylogeny allows a more detailed examination of adaptive evolution at ranatuerin-2 antimicrobial peptide loci, *Immunogenetics*, 62 (2010) 333–343.
- [147] Y. Chen, C. T. Mant, S. W. Farmer, R. E. W. Hancock, M. L. Vasil, R. S. Hodges, Rational Design of alpha-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/ Therapeutic Index, *J Biol. Chem.*, 280 (2005)12316–12329.
- [148] J.-K. Lee, S.-C. Park, K.-S. Hahm, Y. Park, Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828 (2013) 443–54.
- [149] X. Zhu, N. Dong, Z. Wang, Z. Ma, L. Zhang, Q. Ma, A. Shan, Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell

- selectivity, *Acta Biomater.*, 10 (2014) 244–257.
- [150] A. J. Moore, W. D. Beazley, M. C. Bibby, D. A. Devine, Antimicrobial activity of cecropines, *J Antimicrob Chemother* 37 (1996) 1077–1089.
- [151] C. H. Park, E. V. Valore, A. J. Waring, T. Ganz, Hecpudin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 7806–7810.
- [152] S. K. Kandasamy, R. G. Larson, Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1758 (2006) 1274–1284.
- [153] X. Li, Y. Lv, A. Yuan, S. Yi, Y. Ma, and Z. Li, Gastrin-releasing peptide promotes the growth of HepG2 cells via EGFR-independent ERK1/2 activation, *Oncol. Rep.*, 24 (2010) 441–448.
- [154] D. S. Youngblood, S. A. Hatlevig, J. N. Hassinger, P. L. Iversen, H. M. Moulton, Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells, *Bioconjug. Chem.*, 18 (2007) 50–60.
- [155] J. R. Luque-Ortega, J. M. Saugar, C. Chiva, D. Andreu, L. Rivas, Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP, *Biochem. J.*, 375 (2003) 221–230.
- [156] M. A. Lynn, J. Kindrachuk, A. K. Marr, H. Jenssen, N. Panté, M. R. Elliott, S. Napper, R. E. Hancock, W. R. McMaster, Effect of BMAP-28 Antimicrobial Peptides on *Leishmania major* Promastigote and Amastigote Growth: Role of Leishmanolysin in Parasite Survival, *PLoS Negl Trop Dis*, 5 (2011). e1141.
- [157] A. Patel, M. Patel, X. Yang, A. K. Mitra, K. City, Recent advances in protein and peptide drug delivery: A special emphasis on polymeric nanoparticles, *Protein Pept Lett.*, 21 (2014) 1102–1120.
- [158] R. Nordström, M. Malmsten, Delivery systems for antimicrobial peptides, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 242 (2017) 17–34.
- [159] M. Gaber, W. Medhat, M. Hany, N. Saher, J. Y. Fang, A. Elzoghby, Protein-lipid

- nanohybrids as emerging platforms for drug and gene delivery: Challenges and outcomes, *J. Control. Release*, 254 (2017) 75–91.
- [160] K. M. El-Say, H. S. El-Sawy, Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 528 (2017) 675-691.
- [161] M. . Hans, A. . Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 6 (2002) 319–327.
- [162] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 75 (2010) 1–18.
- [163] K. Forier, K. Raemdonck, S. C. De Smedt, J. Demeester, T. Coenye, K. Braeckmans, Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms, *J. Control. Release*, 190 (2014) 607–623.
- [164] C. P. Reis, R. J. Neufeld, Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine*, 2 (2006) 8–21.
- [165] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Pr eat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control. Release*, 161 (2012) 505–522.
- [166] M. A. Holgado, J. L. Arias, M. J. C zar, J. Alvarez-Fuentes, A. M. Ga n n-Calvo, M. Fern ndez-Ar valo, Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties, *Int. J. Pharm.*, 358 (2008) 27–35.
- [167] S.-S. Feng, Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy, *Expert Rev. Med. Devices*, 1 (2004) 115–125.
- [168] S. Prior, C. Gamazo, J. M. Irache, H. P. Merkle, and B. Gander, Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 115–125.
- [169] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles, *Pharm. Res.*, 26 (2009) 1025–1058.
- [170] J. Wu *et al.*, Fabrication and characterization of monodisperse PLGA-alginate core-shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release, *Acta Biomater.*, 9 (2013) 7410–7419.
- [171] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine*, 2 (2006) 53–65.

- [171] E. Cohen-Sela, M. Chorny, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, G. A. Golomb, new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles, *J. Control. Release*, 133 (2009) 90–5.
- [173] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, 9 (2012) 671–675.
- [174] A. R. Patel, S. Kulkarni, T. D. Nandekar, P. R. Vavia, Evaluation of alkyl polyglucoside as an alternative surfactant in the preparation of peptide-loaded nanoparticles, *J. Microencapsulation*, 25 (2008) 531-540.
- [175] M. A. Taha, S. R. Singh, V. Dennis, Biodegradable PLGA85/15 nanoparticles as a delivery vehicle for *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP-187 peptide, *Nanotechnology*, 23 (2012) 325101
- [176] F. Martinez-gutierrez, P. L. Olive, A. Banuelos A, Synthesis , characterization , and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 6 (2010) 681–88
- [177] D. Paredes, C. Ortiz, R. Torres, Synthesis, characterization , and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157 : H7 and methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Int J Nanomedicine*, 9 (2014) 1717–1729.
- [178] J. H. Yoon, S.L. Ingalea, J.S. Kima, K.H. Kima, S.H. Leea, Y.K. Parkb, I.K. Kwona, B.J. Chaea, Effects of dietary supplementation of synthetic antimicrobial peptide-A3 and P5 on growth performance, apparent total tract digestibility of nutrients, fecal and intestinal microflora and intestinal morphology in weanling pigs, *Livest. Sci.*, 159 (2014) 53–60.
- [179] B. Ruozi, D. Belletti, H. S. Sharma, A. Sharma, D. F. Muresanu, H. Mössler, F. Forni, M. A. Vandelli, G. Tosi, P LGA Nanoparticles Loaded Cerebrolysin : Studies on Their Preparation and Investigation of the Effect of Storage and Serum Stability with Reference to Traumatic Brain, Injury, *Mol Neurobiol.*, 52 (2015) 899–912.
- [180] D. Andreu, C. Cativiela, Therapeutic Index of Gramicidin S is Strongly Modulated by D -Phenylalanine Analogues at the β -Turn, *J. Med. Chem.*, 52 (2009) 664–74
- [181] J. S. Suk, S. K. Lai, Y. Wang, L. M. Ensing, P. L. Zeitlin, M. P. Boyle, J. Hanes, The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles, *Biomaterials*, 30 (2009) 2591-2597.
- [182] P. G. Rogueda, D. Traini, The nanoscale in pulmonary delivery. Part 1: deposition,

- fate, toxicology and effects, *Expert Opinion Drug Delivery*, 4 (2007) 595-606.
- [183] W. Hachicha, L. Kodjikian, H. Fessi, Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters, *Int J. Pharm.*, 324 (2006) 176-184.
- [184] S. Derman, Z. A. Mustafaeva, E. S. Abamor, B. Melahat, A. Allahverdiyev, Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles, *J. Biomed. Sci.*, 22 (2015) 89-100.
- [185] A. Mathew, T. Fukuda, Y. Nagaoka, T. Hasumura, H. Morimoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, K. Venugopal, D. S. Kumar, Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease, *PLoS ONE*, 7 (2012) e32616.
- [186] K. K. Chereddy, C. Her, M. Comune, C. Moia, A. Lopes, P. E. Porporato, J. Vanacker, M. C. Lam, L. Steinstraesser, P. Sonveaux, H. Zhu, L. S. Ferreira, G. Vandermeulen, V. Pr at, PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing, *J. Control Release*, 194 (2014) 138-147.
- [187] A. Kumari, S. K. Yadav, Y. B. Pakade Y B, Kumar V, Singh B, Chaudhary A and Yadav S C, Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles Colloids, *Surf., B: Biointerfaces*, 82 (2011) 224-232.
- [188] M. Roussaki, A. Gaitanarou, P. Diamanti, S. Vouyiouka, C. Papaspyrides, P. Kefalas, A. Detsi, Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles, *Polym. Degrad. Stab.*, 108 (2014) 182-187.
- [189] M. J. Santander-Ortega, A. B. J dar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-Gonz lez, J. L. Ortega-Vinuesa, Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A Variety of stabilisation mechanisms, *J. Colloid Interface Sci.*, 302 (2006) 522-529.
- [190] N. Khayata, W. Abdelwahed, M. F. Chehna, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor, *Int. J. Pharm*, 423 (2012) 419-427.
- [191] W. S. Cheow, K. Hadinoto K, Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, 370 (2010) 79-86.
- [192] J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, Solid-State

- Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs from PLGA/PLA Nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 93 (2004) 1804-1814.
- [193] S. Xie S, Y. Tao, Y. Pan, W. Qu, G. Cheng, L. Huang L, D. Chen, X. Wang, Z. Liu, Z. Yuan, Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents, *J. Controlled Release*, 187 (2014) 101-117.
- [194] E. Haney, K. Nazmi, J. Bolscher, H. Vogel, Influence of specific amino acid side-chains on the antimicrobial activity and structure of bovine lactoferrampin, *Biochem. Cell Biol.*, 377 (2012) 362-377.
- [195] N. Dautin, H. D. Bernstein, Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the autotransporter Pathway, *Annu. Rev. Microbiol.* 61 (2007) 89-112.
- [196] D. Chan, E. Prenner, H. Vogel, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006)1184-1202.
- [197] A. Radovic-Moreno, T. Lu, V. Puscasu, C. Yoon, R. Langer, O. Farokhzad, Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall- Targeted Delivery of Antibiotics, *ACS Nano*, 6 (2002) 4279-4287.
- [198] N, Mitik-Dineva, J. Wang, V. K. Truong, P. Stoddart, F. Malherbe, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, and *staphylococcus aureus* attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness, *Curr. Microbiol.*, 58 (2009) 268-273.
- [199] B. Hu, C. Pan, Y. Sun, Z. Hou, H. Ye, X. Zeng, Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins, *J. Agric. Food. Chem.*, 56 (2008) 7451-7458.
- [200] J. Menon, S. Kona, A. Wadajkar, Desai F, Vadla A, Nguyen K, Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 100 A (2012) 1998-2005
- [201] K. Amin, R. M. Dannenfelser, *In Vitro* Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist, *J. Pharm. Sci.*, 95 (2006) 1173-1176.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, Claudio, *et al.* Antimicrobial Activity of Trout Hecpcidin. Fish and Shellfish. Immunology, 2014, vol. 41 no,1., p.93–101.

AGEITOS, José Manuel, *et al.* Antimicrobial Peptides (AMPs): Ancient Compounds That Represent Novel Weapons in the Fight against Bacteria. Biochemical Pharmacology, 2016, vol. 133 no,1., p.117–138.

AGUILAR, Marie Isabel. HPLC of Peptides. Humana press, 2004, vol. 69 no,1., p.117–138.

ALVAREZ, Carlos Arturo, *et al.* Nosocomial Infections Caused by Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Colombia. American journal of infection control, 2010, vol. 38 no,4., p.315–318.

ANDERSSON, Dan; HUGHES, Diarmaid y KUBICEK-SUTHERLAND, Jessica. Mechanisms and Consequences of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. Drug Resistance Updates, 2016, vol. 26, p.43–57.

AOKI, Wataru y UEDA, Mitsuyoshi. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. Pharmaceuticals, 2013, vol. 6 no,8., p.1055–1081.

BAHAR, Ali Adem y REN, Dacheng. 2013. Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals, 2013, vol. 6 no,12., p.1543–1575.

BAJPAI, Ak y CHOUBEY, Jyoti. Design of Gelatin Nanoparticles as Swelling Controlled Delivery System for Chloroquine Phosphate. Journal of materials science. Materials in medicine, 2006, vol. 17 no,4., p.345–358.

BAKSHI, Kunal, *et al.* Circular Dichroism of Peptides. In *Therapeutic Peptides*, Methods Molecular Biology, 2014, vol. 1088, p.247–253.

BATONI, Giovanna; MAISETTA, Giuseppantonio y ESIN, Semih. Antimicrobial Peptides and Their Interaction with Biofilms of Medically Relevant Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2016, vol. 1858 no,5., p.1044–1060.

BERTHOLD, Nicole *et al.* Novel Apidaecin 1b Analogs with Superior Serum Stabilities for Treatment of Infections by Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, vol. 57 no,1., p.402–409.

BOLINTINEANU, Dan y KAZNESSIS, Yiannis. Computational Studies of Protegrin Antimicrobial Peptides: A Review. *Peptides*, 2011, vol. 32 no,1., p.188–201.

BORGIA, Jeffrey y FIELDS, Gregg. Chemical Synthesis of Proteins. *Trends in biotechnology*, 2000, vol. 18 no,6., p.243–51.

BRANDELLI, Adriano. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2012, vol. 12 no,8., p.731–741.

BROGAN, David y MOSSIALOS, Elias. A Critical Analysis of the Review on Antimicrobial Resistance Report and the Infectious Disease Financing Facility. *Globalization and Health*, 2016, vol. 12 no,8., p.1–7.

CAMACHO, Christiam, *et al.* BLAST+: Architecture and Applications. *BMC bioinformatics*, 2009, vol. 10 no,1., p.421–429.

DE CAMPOS, Ángela; SÁNCHEZ, Alejandro y ALONSO, María José. Chitosan

Nanoparticles: A New Vehicle for the Improvement of the Delivery of Drugs to the Ocular Surface. Application to Cyclosporin A.” International journal of pharmaceutics, 2001, vol. 224 no,1-2., p.159–168.

CARLET, Jean y MAINARDI, Jean-Luc. Antibacterial Agents: Back to the Future? Can We Live with Only Colistin, Co-Trimoxazole and Fosfomycin?” Clinical Microbiology and Infection, 2012, vol. 18 no,1., p.1-3.

CHAN, David; PRENNER, Elmar y VOGEL, Hans. Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptides: Structures and Mechanisms of Action. Biochimica et biophysica acta, 2006, vol. 1758 no,9., p.1184-1202.

CHAUDHARY, Arpana Sagwal. A Review of Global Initiatives to Fight Antibiotic Resistance and Recent Antibiotics?? Discovery.” Acta Pharmaceutica Sinica B, 2016, vol. 6 no,6., p.552-556.

CHEN, Hsiao-Ling, *et al.* Synthetic Porcine Lactoferricin with a 20-Residue Peptide Exhibits Antimicrobial Activity against Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus, and Candida Albicans. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, vol. 54 no,9., p.3277-3282.

CHEN, Wei, *et al.* Structure-Activity Relationships of a Snake Cathelicidin-Related Peptide, BF-15. Peptides, 2011, vol. 32 no,12., p.2497-2503.

CHEN, Yuxin, *et al.* Rational Design of Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. J. Biol Chem, 2005, vol. 280 no,13., p.12316-12329.

CHENNA, Ramu, *et al.* Multiple Sequence Alignment with the Clustal Series of Programs. Nucleic Acids Research, 2003, vol. 31 no,13., p.3497–3500.

COBB, Steven y DENNY, Paul. Antimicrobial Peptides for Leishmaniasis. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000), 2010, vol. 11 no,8., p.868–875.

CRUZ, Jenniffer, *et al.* Antimicrobial Peptides: Promising Compounds against Pathogenic Microorganisms. Current medicinal chemistry, 2014, vol. 21 no,20., p.2299–2321.

CRUZ, Jenniffer, *et al.* Design and Activity of Novel Lactoferrampin Analogues against O157:H7 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Biopolymers, 2014, vol. 101 no,4., p.319–328.

DANHIER, Fabienne, *et al.* Paclitaxel-Loaded PEGylated PLGA-Based Nanoparticles: In Vitro and in Vivo Evaluation. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2009, vol. 133 no,1., p.11-17.

DANHIER, Fabienne, *et al.* PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications.” Journal of Controlled Release, 2012, vol. 161 no,2., p.505-522.

DATHE, Margitta, *et al.* Optimization of the Antimicrobial Activity of Magainin Peptides by Modification of Charge. FEBS Letters, 2001, vol. 501 no,2-3., p.146-150.

DAVE, Keyur , *et al.*Preparation and Analysis of Proteins and Peptides Using MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry. Current protocols in protein science / editorial board, 2011, Chapter 16:Unit 16.p.13.

DZIUBLA, Thomas; KARIM, Adnan, y MUZYKANTOV, Vladimir. Polymer Nanocarriers Protecting Active Enzyme Cargo against Proteolysis.” Journal of

controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2005, vol. 102 no,2., p.427–439.

EL-SAY, Khalid y EL-SAWY, Hossam. Polymeric Nanoparticles: Promising Platform for Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, vol. 528 no,1-2., p.675–691.

EPAND, Richard y VOGEL, Hans. Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action. *Biochimica et biophysica acta*, 1999, vol. 1462 no,1-2., p.11-28.

ERFE, Marie Crisel, *et al.* Efficacy of Synthetic Peptides RP-1 and AA-RP-1 against Leishmania Species in Vitro and in Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, vol. 56 no,2., p.658–665.

FENG, Si-Shen. Nanoparticles of Biodegradable Polymers for New-Concept Chemotherapy. *Expert Review of Medical Devices*, 2004, vol. 1 no,1., p.115–125.

FERNÁNDEZ-REYES, María, *et al.* Lysine N ϵ -Trimethylation, a Tool for Improving the selectivity of antimicrobial peptides. *Journal medicinal chemistry*, 2010, vol. 53 no,15., p.5587–5596.

FIELDS, Gregg y . NOBLE, Richard. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids.” *International Journal of Peptide and Protein Research*, 2009, vol. 35 no,3., p.161-214.

FORIER, Katrien, *et al.* Lipid and Polymer Nanoparticles for Drug Delivery to Bacterial Biofilms. *Journal of Controlled Release*, 2014, vol. 190, p.607-623.

GABER, Mohamed, *et al.* Protein-Lipid Nanohybrids as Emerging Platforms for

Drug and Gene Delivery: Challenges and Outcomes. *Journal of Controlled Release*, 2017, 254: 75–91.

GAO, Yitian, *et al.* Targeted Modification of a Novel Amphibian Antimicrobial Peptide from *Phyllomedusa Tarsius* to Enhance Its Activity against MRSA and Microbial Biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 2017, vol. 8, p.628–637.

GIANGASPERO, Anna, SANDRI, Luca y TOSSI, Alessandro. Amphipathic a Helical Antimicrobial Peptides Activity. *Biopolymers*, 2000, vol. 55 no,1., p.4–30.

GLATTARD, Elise, *et al.* Investigations of the Synergistic Enhancement of Antimicrobial Activity in Mixtures of Magainin 2 and PGLa. *Biophysical Chemistry*, 2016, vol. 210, p.35–44.

GÓMEZ-GAETE, Carolina, *et al.* Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmacology*, 2007, vol. 331, p.153–159.

GOPAL, Ramamourthy, *et al.* Effect of Repetitive Lysine-Tryptophan Motifs on the Bactericidal Activity of Antimicrobial Peptides. *Amino acids*, 2013, vol. 44 no,2., p.645-660.

GOTTLER, Linsey y RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan – A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed From Magainin Lindsey. *Biochim Biophys Acta*, 2009, vol. 1788 no,8.,p.1680–1686.

GRASSI, Lucia, *et al.* Analogs of the Frog-Skin Antimicrobial Peptide Temporin 1Tb Exhibit a Wider Spectrum of Activity and a Stronger Antibiofilm Potential as Compared to the Parental Peptide. *Frontiers in Chemistry*, 2017, Vol. 5, p.24-37.

GUANÍ-GUERRA, Eduardo, *et al.* Antimicrobial Peptides: General Overview and Clinical Implications in Human Health and Disease. *Clinical immunology*, 2010, vol. 135 no,1., p.1-11.

GUILHELMELLI, Fernanda, *et al.* Activity of Scorpion Venom-Derived Antifungal Peptides against Planktonic Cells of *Candida Spp.* and *Cryptococcus Neoformans* and *Candida Albicans* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7, p.1844-1856.

HALLOCK, Kevin; LEE,Dong-Kuk y RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. MSI-78, an Analogue of the Magainin Antimicrobial Peptides, Disrupts Lipid Bilayer Structure via Positive Curvature Strain. *Biophysical journal*, 2003, vol. 84, no,5., p.3052–3060.

HANCOCK, Robert y SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nature biotechnology*, 2006, vol. 24, no,12., p.1551–57.

HANS, Matthew y LOWMAN, Anthony. Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002, vol.6 no,4., p.319–327.

HIDRON, Alicia, *et al.* NHSN Annual Update: Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology* , 2008, vol.29 no,11., p.996–1011.

HILPERT, Kai; FJELL, Christopher y CHERKASOV,Artem. Peptide-Based Drug

Design. ed. Laszlo Otvos. Totowa, NJ: Humana Press, 2008.

HOLGADO, María Ángeles, *et al.* Synthesis of Lidocaine-Loaded PLGA Microparticles by Flow Focusing. Effects on Drug Loading and Release Properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, vol.358 no,1-2., p.27–35.

IDICULA-THOMAS, Susan y BALAJI, Petety. Understanding the Relationship between the Primary Structure of Proteins and Its Propensity to Be Soluble on Overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 2005, vol. 14, no,3., p.582–592.

IL'INA, Anna. *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometric Identification of Novel Intercellular Space Peptides. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, no,2., p.118–122.

JELLEMA, Wilbert. *et al.* *In Vivo* Interaction of Endotoxin and Recombinant Bactericidal/permeability-Increasing Protein (rBPI23): Hemodynamic Effects in a Human Endotoxemia Model." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2002, vol. 140, no, 4., p.228–235.

JENSSEN, Håvard; HAMILL, Pamela and HANCOCK, Robert. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*, 2006, vol. 19, no,3., p.491–511.

JOO, Hwang-Soo; FU, Chih-lung y OTTO, Michael. Bacterial Strategies of Resistance to Antimicrobial Peptides. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2016, vol. 371, no,1695., p. pii: 20150292.

JOSHI, Jair y PATEL, Ronak. *Academic Sciences.*, 2012, Vol.4, no,4.

KANDASAMY, Senthil y LARSON, Ronald. Effect of Salt on the Interactions of Antimicrobial Peptides with Zwitterionic Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica*

Acta – Biomembranes, 2006, vol. 1758, no,9., p. 1274-1284.

KANG, Su-jin, *et al.* Antimicrobial Peptides : Therapeutic Potentials. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2014, vol. 12, no,12., p. 1477-1486.

KAUR, Amandeep; JAIN, Subheet y TIWARY, Ashok. Mannan-Coated Gelatin Nanoparticles for Sustained and Targeted Delivery of Didanosine: *In Vitro* and in Vivo Evaluation. Acta pharmaceutica, 2008, vol.58 no,1., p.61–74.

KIM, Hyun, *et al.* De Novo Generation of Short Antimicrobial Peptides with Enhanced Stability and Cell Specificity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, vol.69 no,1., p.121–132.

KIM, Ji-Su; JOENG, Ji-Ho y KIM, Yongae. Design, Characterization, and Antimicrobial Activity of a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactophorin. Journal microbiology biotechnology, 2017, vol.27 no,4., p.759–767.

KIM, Jin Young, *et al.* C-Terminal Amidation of PMAP-23: Translocation to the Inner Membrane of Gram-Negative Bacteria. Amino Acids, 2011, vol.40 no,1., p.183–195.

KLU, Enno, *et al.* Structure - Activity Relation of Human -Defensin 3 : Influence of Disulfide Bonds and Cysteine Substitution on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity †,2005, vol.3 no,1., p.9804–9816.

KOBAYASHI, Satoe, *et al.* Interactions of the Novel Antimicrobial Peptide Buforin 2 with Lipid Bilayers: Proline as a Translocation Promoting Factor. Biochemistry, 2000, vol. 39 no,29., p. 8648–8654.

KRCHŇÁK, Viktor; VÁGNER, Josef y LEBL, Michal. Noninvasive Continuous

Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by Acid-Base Indicator. *Int. J. Peptide Protein Res*, 1988, vol. 32 no,5., p. 415–416.

KUMAR, Satheesh, *et al.* Influence of Microencapsulation Method and Peptide Loading on Formulation of Poly(lactide-Co-Glycolide) Insulin Nanoparticles. *Die Pharmazie*, 2006, vol. 61 no,7., p.613–617.

KUMARI, Avnesh, YADAV, Sudesh Kumar and YADAV, Subhash C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2010, vol.75 no,1., p.1–18.

LABHASETWAR, Vinod, *et al.* Arterial Uptake of Biodegradable Nanoparticles: Effect of Surface Modifications. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1988, vol.87 no,10., p.1229–1234.

LARKIN, Mark, *et al.* Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2007, vol.23 no,21., p.2947–2948.

LEE, Jong-Kook, *et al.* Antimicrobial HPA3NT3 Peptide Analogs: Placement of Aromatic Rings and Positive Charges Are Key Determinants for Cell Selectivity and Mechanism of Action. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, vol. 1828 no,2., p.443–454.

LEE, Sie Huey, ZHANG, Zhiping y FENG, Si-Shen. Nanoparticles of Poly(lactide)-Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (PLA-TPGS) Copolymers for Protein Drug Delivery. *Biomaterials*, 2007, vol. 28 no,11., p.2041–2050.

LI, Shao-Hong, *et al.* In Vitro Characteristics of Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres Incorporating Gelatin Particles Loading Basic Fibroblast Growth Factor. *Acta pharmacologica Sinica*, 2006, vol. 27 no,6., p.754–759.

LI, Xinqiu, *et al.* Gastrin-Releasing Peptide Promotes the Growth of HepG2 Cells via EGFR-Independent ERK1/2 Activation. *ONCOLOGY REPORTS*, 2010, vol. 24, p.441–448.

LI, Yanmei, *et al.* Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application. *Peptides*, 2012, vol. 37 no,2., p.207–215.

LIM, Ji Youn; YOON, Jangwon y HOVDE, Carolyn. A Brief Overview of Escherichia Coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2010, vol. 20 no,1., p.5–14.

LIU, Beijun, *et al.* Design of Novel Antimicrobial Peptide Dimer Analogues with Enhanced Antimicrobial Activity in Vitro and in Vivo by Intermolecular Triazole Bridge Strategy. *Peptides*, 2017, vol. 88 no,16., p.115–125.

LIVERMORE, David. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas Aeruginosa: Our Worst Nightmare?" *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2002, vol. 34 no,5., p.634–640.

LOZANO, Dayan, *et al.* Staphylococcus Aureus Resistentes a Metilina (SARM) Positivos Para PVL Aislados En Individuos Sanos de Montería-Córdoba Introducción Materiales Y Métodos Tipo de Estudio , Localización , Población, 2010, vol. 15 no,2., p.159–165.

LU, Ze, *et al.* Paclitaxel-Loaded Gelatin Nanoparticles for Intravesical Bladder Cancer Therapy, *Clinica Cancer Research*, 2004, vol. 10 no,22., p.7677–7684.

LUNA, Omar, *et al.* Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine?. *Molecules*, 2016, vol. 21 no,11., p. pii:

E1542.

LUQUE-ORTEGA, Román, *et al.* Identification of New Leishmanicidal Peptide Lead Structures by Automated Real-Time Monitoring of Changes in Intracellular ATP. *The Biochemical journal*, 2003, vol. 375 no,Pt1., p. 221-230.

LYNN, Miriam, *et al.* Effect of BMAP-28 Antimicrobial Peptides on *Leishmania Major* Promastigote and Amastigote Growth: Role of Leishmanolysin in Parasite Survival. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, vol. 5 no,5., p. e1141.

MALANOVIC, Nermina y LOHNER, Karl. Gram-Positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on the Activity of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2016, vol. 1858 no,5., p.936-946.

MANN, Nicholas. The Potential of Phages to Prevent MRSA Infections. *Research in microbiology*, 2008, vol. 159 no,5., p.400-405.

MARÓTI, Gergely, *et al.* Natural Roles of Antimicrobial Peptides in Microbes, Plants and Animals. *Research in microbiology*, 2011, vol. 162 no,4., p.363-374.

MATSUZAKI, Katsumi, *et al.* 1997. Modulation of Magainin 2-Lipid Bilayer Interactions by Peptide Charge. *Biochemistry*,1997, vol. 36 no,8., p.2104-2111.

MATTAR, Salim; VISBAL, Jorge y ARRIETA, Germán. *E . coli* 0157: H7 ENTEROHEMORRÁGICO: UN AGENTE ETIOLÓGICO DE DIARREA EN COLOMBIA. 2001, vol. 6 no,2., p.81–86.

MEAD, Paul, *et al.* Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, vol. 5 no,5., p.81–86. 5(5): 607–25.

MERLINO, Francesco, *et al.* Glycine-Replaced Derivatives of [Pro 3 ,DLeu 9]TL, a

Temporin L Analogue: Evaluation of Antimicrobial, Cytotoxic and Hemolytic Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 139, p.750-761.

MISHRA, Biswajit, *et al.* Host Defense Antimicrobial Peptides as Antibiotics: Design and Application Strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, vol.38, p.87–96.

MOORE, Allen, *et al.* Antimicrobial Activity of Cecropines. *Journal of Antimicrobil Chemotherapy*, 1996, vol. 37, p. 1077-1089.

NAKHJAVANI, Maryam; ZARGHI, Afshin y SHIRAZI, Farshad. Cytotoxicity of Selected Novel Chalcone Derivatives on Human Breast, Lung and Hepatic Carcinoma Cell Lines. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 2014, vol. 13 no,3., p.953–958.

NGUYEN, Leonard, *et al.* Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5 no,9., p.1–8.

NIEDERMAN, Michael. Impact of Antibiotic Resistance on Clinical Outcomes and the Cost of Care. *Critical care medicine*, 2001, vol. 29 no,4., p.N114–120.

NORDSTRÖM, Randi y MALMSTEN, Martin. Delivery Systems for Antimicrobial Peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, vol. 242, p.17–34.

OH, Donghoon, *et al.* Antibacterial Activities of Amphiphilic Cyclic Cell-Penetrating Peptides against Multidrug Resistant Pathogens. *Molecular pharmaceutics*, 2014, vol. 5, p.161–71.

OÑATE-GARZÓN, José, *et al.* The Increase in Positively Charged Residues in Cecropin D-like *Galleria Mellonella* Favors Its Interaction with Membrane Models

That Imitate Bacterial Membranes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, vol.629, p.54–62.

PANTOSTI, Annalisa. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. Frontiers in Microbiology, 2012, vol.3, p.1–12.

PARK, Chan Bae, *et al.* Structure-Activity Analysis of Buforin II, a Histone H2A-Derived Antimicrobial Peptide: The Proline Hinge Is Responsible for the Cell-Penetrating Ability of Buforin II. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, vol. 97 no,15., p.8245–8250.

PARK, Christina, *et al.* Hecpidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. Journal of Biological Chemistry, 2001, vol. 276 no,11., p.7806–7810.

PATEL, Ashaben, *et al.* Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. Protein peptide Letter, 2014, vol. 21 no,11., p. 1102-1120.

PATEL, Ashok, *et al.* Evaluation of Alkyl Polyglucoside as an Alternative Surfactant in the Preparation of Peptide-Loaded Nanoparticles. Journal of microencapsulation, 2008, vol. 25 no,8., p. 531-540.

PÉREZ-CORDERO, José Julián, *et al.* Leishmanicidal Activity of Synthetic Antimicrobial Peptides in an Infection Model with Human Dendritic Cells. Peptides, 2011, vol. 32 no,4., p. 683-690.

PINTO, Catarina y Neufeld, Ronald. Nanoencapsulation I . Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles, 2006, vol. 2 no,1., p. 8-21.

PINTO, Catarina, *et al.* Nanoencapsulation II. Biomedical Applications and Current Status of Peptide and Protein Nanoparticulate Delivery Systems. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2006, vol. 2 no,2., p. 53-65.

POWERS, Jon-Paul, ROZEK Annett y HANCOCK, Robert. Structure-Activity Relationships for the Beta-Hairpin Cationic Antimicrobial Peptide Polyphemusin I. *Biochimica et biophysica acta*, 2004, vol. 1698 no,2., p. 239-250.

PRIOR, S. *et al.* Gentamicin Encapsulation in PLA/PLGA Microspheres in View of Treating Brucella Infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, vol. 196 no,1., p. 115-125.

RAMESAN, Mt, *et al.* Role of nanoparticles on polymer composites. *Micro and Nano Fibrillar Composites*, 2017, p.301-326.

RODZIEWICZ-MOTOWIDŁO, Sylwia, *et al.* Antimicrobial and Conformational Studies of the Active and Inactive Analogues of the Protegrin-1 Peptide. *The FEBS journal*, 2010, vol. 277 no,4., p. 1010-1022.

SAHANA, D K, *et al.* PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs : Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior *In Vitro* and *In Vivo* Using Estradiol as a Model Drug, 2008, vol. 97 no,4., p. 1530-1542.

SARMENTO, Bruno, *et al.* 2007. Alginate/chitosan Nanoparticles Are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical research*, 2007, vol. 24 no,12., p. 2198–2206.

SAUGAR, José María, *et al.* Activities of Polymyxin B and Cecropin A-Melittin Peptide CA(1-8)M(1-18) against a Multiresistant Strain of Acinetobacter

Baumannii.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, vol. 46 no,3., p. 875-878.

SCHIBLI, David, *et al.* Structure-Function Analysis of Triterpticin Analogs: Potential Relationships between Antimicrobial Activities, Model Membrane Interactions, and Their Micelle-Bound NMR Structures. *Biophysical journal*, 2006, vol. 91 no,12., p. 4413-4426.

SCHIBLI, David, *et al.* Tryptophan-Rich Antimicrobial Peptides: Comparative Properties and Membrane Interactions. *Biochemistry and Cell Biology*, 2002, vol. 80 no,5., p. 667-677.

SENGUPTA, Durba, *et al.* Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol.1778, p. 2308–2317.

SHAI, Yechiel. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides.” *Biopolymers*, 2002, vol. 66, p. 236-248.

SHARMA, Virender, *et al.* 2016. A Review of the Influence of Treatment Strategies on Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes. *Chemosphere*, 2016, vol. 150, p. 702-714.

SHENG, Yan, *et al.* In Vitro Macrophage Uptake and in Vivo Biodistribution of PLA-PEG Nanoparticles Loaded with Hemoglobin as Blood Substitutes: Effect of PEG Content. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2009, vol. 20 no,9., p. 1181-1191.

SILVA, Tania, *et al.* Enhanced Leishmanicidal Activity of Cryptopeptide Chimeras from the Active N1 Domain of Bovine Lactoferrin. *Amino Acids*, 2012, vol. 43 no,6., p. 2265-2277.

SOHANI, Omdip y GAIKWAD, Umesh. Nanoencapsulation System for Delivery of Protein and Peptide-A Review, 2013, vol. 2 no,2., p. 58-64.

STRATEVA, Tanya y YORDANOV, Daniel. *Pseudomonas aeruginosa* - a Phenomenon of Bacterial Resistance. Journal of medical microbiology, 2009, vol. 58 no,Pt 9., p. 1133-1148.

TAVARES, Letícia Stephan, *et al.* Antimicrobial Activity of Recombinant Pg-AMP1, a Glycine-Rich Peptide from Guava Seeds. Peptides, 2012, vol. 37 no,2., p. 294-300.

TEIXEIRA, Vitor; FEIO, Maria y BASTOS, Margarida. Role of Lipids in the Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes. Progress in lipid research, 2012, vol. 51 no,2., p. 149-177.

TENNESSEN, Jacob y BLOUIN, Michael. A Revised Leopard Frog Phylogeny Allows a More Detailed Examination of Adaptive Evolution at Ranatuerin-2 Antimicrobial Peptide Loci. Immunogenetics, 2010, vol. 62 no,5., p. 333-343.

TOSSI, Alessandro; SANDRI, Luca y GIANGASPERO, Anna. Amphipathic, Alpha-Helical Antimicrobial Peptides. Biopolymers, 2000, vol. 55 no,1., p. 4-30.

TRIPATHI, Amit Kumar, *et al.* Identification of GXXXXG Motif in Chrysopsin-1 and Its Implication in the Design of Analogs with Cell-Selective Antimicrobial and Anti-Endotoxin Activities. Scientific Reports, 2017, vol. 7 no, 3384., p. 1-16.

TRIPATHI, Amit Kumar, *et al.* Selective Phenylalanine to Proline Substitution for Improved Antimicrobial and Anticancer Activities of Peptides Designed on Phenylalanine Heptad Repeat. Acta Biomaterialia, 2017, vol. 57, p. 170-186.

TROTTI, Andy, *et al.* A Multinational, Randomized Phase Iii Trial of Isegran Hcl

Oral Solution for Reducing the Severity of Oral Mucositis in Patients Receiving Radiotherapy for Head-and-Neck Malignancy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004, vol. 58 no, 3., p. 674-681.

VAN DER DOES, Anne, *et al.* Antimicrobial Peptide hLF1-11 Directs Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Driven Monocyte Differentiation toward Macrophages with Enhanced Recognition and Clearance of Pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2010, vol. 54 no, 2., p. 811–816.

VAUTHIER, Christine y BOUCHEMAL, Kawthar. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2009, vol. 26 no, 5., p. 1025–1058.

VILA-FARRÉS, Xavier, GIRALT, Ernest y VILA, Jordi. Update of Peptides with Antibacterial Activity. *Current medicinal chemistry*, 2012, vol. 19 no, 36., p. 6188–6198.

VILAR, Gemma; TULLA-PUCHE, Judit y ALBERICIO, Fernando. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current drug delivery*, 2012, vol.9 no,4., p. 367-394.

WANG, Guangshun, *et al.* Decoding the Functional Roles of Cationic Side Chains of the Major Antimicrobial Region of Human Cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, vol.56 no,2., p. 845-856.

WANG, Guangshun; LI, Xia y WANG, Zhe. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol.44 no,D1., p. D1087–1093.

WU, Jun, *et al.* Fabrication and Characterization of Monodisperse PLGA-Alginate Core-Shell Microspheres with Monodisperse Size and Homogeneous Shells for

Controlled Drug Release. *Acta Biomaterialia*, 2013, vol.9 no,7., p. 7410–7419.

XIE, Jingwei, y WANG, Chi-hwa. Encapsulation of Proteins in Biodegradable Polymeric Microparticles Using Electrospray in the Taylor Cone-Jet Mode, 2007, vol.97 no,5., p. 1278–1290.

YADAV, Subhash Chandra; KUMARI, Avnesh and YADAV, Ramdhan. “Development of Peptide and Protein Nanotherapeutics by Nanoencapsulation and Nanobioconjugation. *Peptides*, 2011, vol.32 no,1., p. 173–187.

YANG, Na, *et al.* Antibacterial and Detoxifying Activity of NZ17074 Analogues with Multi-Layers of Selective Antimicrobial Actions against *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. *Scientific Reports*, 2017, vol.7 no,3392., p. 1-19.

YE, Jian; MCGINNIS, Scott y MADDEN, Thomas. BLAST: Improvements for Better Sequence Analysis. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(WEB. SERV. ISS.): p. 6–9.

YEAMAN, Michael y YOUNT, Nannette. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance, 2003, vol.55 no,1., p. 27-55.

YIN, Lois, *et al.* Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287 no,10., p. 7783-7745.

YIN, YaShu, *et al.* Lectin-Conjugated PLGA Nanoparticles Loaded with Thymopentin: Ex Vivo Bioadhesion and in Vivo Biodistribution. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2007, vol. 123 no,1., p. 27-38.

YOUNGBLOOD, Derek, *et al.* Stability of Cell-Penetrating Peptide-Morpholino

Oligomer Conjugates in Human Serum and in Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, vol. 18 no,1., p. 50-60.

YU, Haining, *et al.* Cathelicidin-Trypsin Inhibitor Loop Conjugate Represents a Promising Antibiotic Candidate with Protease Stability. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7 no, 2600., p. 1-18

ZAMBAUX, M F, *et al.* Preparation and Characterization of Protein C-Loaded PLA Nanoparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 1999, vol. 60 no, 2-3 ., p. 179-188.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature*, 2002, vol. 415, p.389–95.

Zhao, Yanyan *et al.* Antimicrobial Activity and Stability of the D-Amino Acid Substituted Derivatives of Antimicrobial Peptide Polybia-MPI. *AMB Express*, 2016, vol. 6 no, 1., p. 122-134.

ZHOU, Peng, y HUANG, Jian. *Computational Peptidology*, Humana Press, 2015, ISBN 9781493922857.

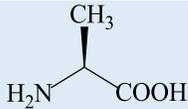
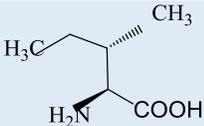
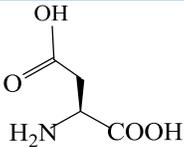
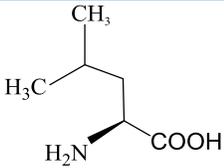
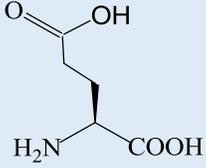
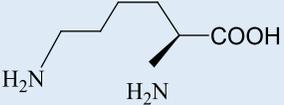
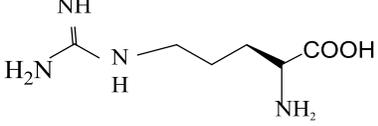
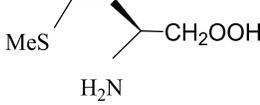
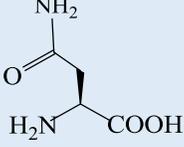
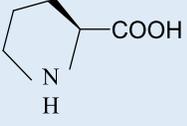
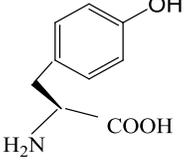
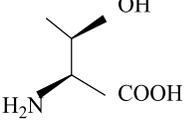
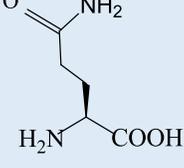
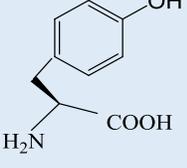
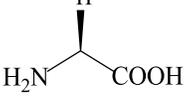
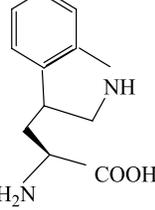
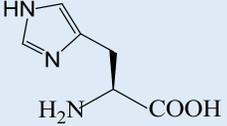
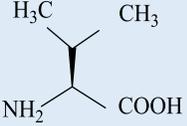
ZHU, Meng; LIU,Peng y NIU, Zhong-wei. A Perspective on General Direction and Challenges Facing Antimicrobial Peptides. *Chinese Chemical Letters*, 2016, vol.28 no,4., p. 703-708.

Zhu, Xin, *et al.* Design of Imperfectly Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Cell Selectivity. *Acta Biomaterialia*, 2014, vol.10 no,1., p. 244-257.

ZHU, Xin, *et al.* Importance of Tryptophan in Transforming an Amphipathic Peptide into a *Pseudomonas Aeruginosa*-Targeted Antimicrobial Peptide. *PLoS ONE*, 2014, vol.9 no,12., p. 1-19.

ANEXOS

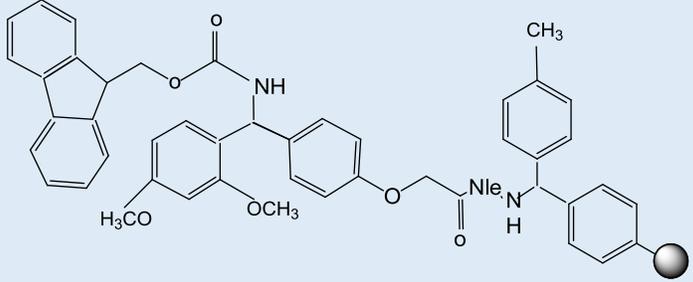
ANEXO A. AMINOÁCIDOS, CÓDIGO DE TRES LETRAS, UNA LETRA Y ESTRUCTURA

Aminoácidos	Estructura	Aminoácidos	Estructura
Alanina, ala, A		Isoleucina, Ile, I	
Ácido aspártico, Asp, D		Leucina, Leu, L	
Ácido glutámico, Glu, E		Lisina, Lys, K	
Arginina, Arg, R		Metionina, Met, M	
Asparagina, Asn, N		Prolina, Pro, P	
Fenilalanina, Phe, F		Treonina, Thr, T	
Glutamina, Gln, Q		Tirosina, Tys, Y	
Glicina, Gly, G		Triptófano, Trp, W	
Histidina, His, H		Valina, Val, V	

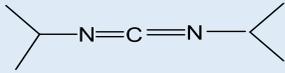
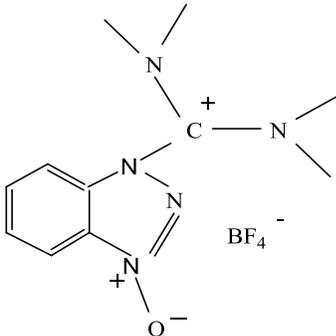
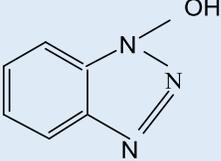
ANEXO B. GRUPOS PROTECTORES EMPLEADOS EN LA ESTRATEGIA fmoc

Protector	Aminoácido	Estructura
Pmc	Arginina, Arg, R	
Trt	Asparagina, Asn, N Cisteína, Cys, C Glutamina, Gln, Q Histidina, His, H	
tBu	Lisina, Lys, K Triptófano, Trp, W	
Boc	Lisina, Lys, K	
Dmab	Ácido aspártico, Asp, D	

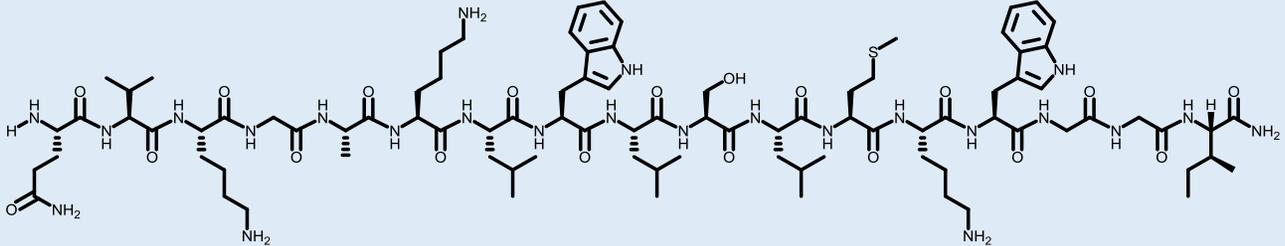
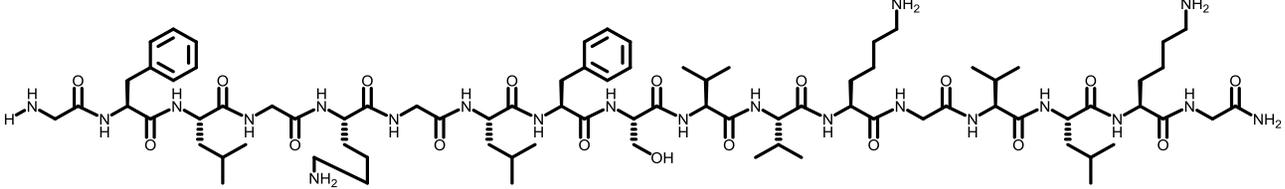
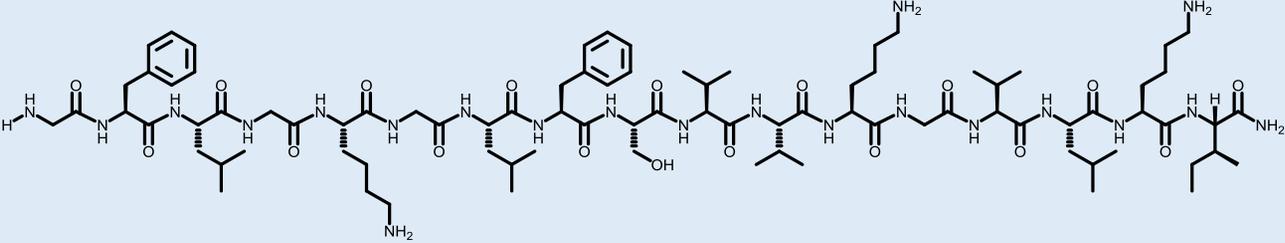
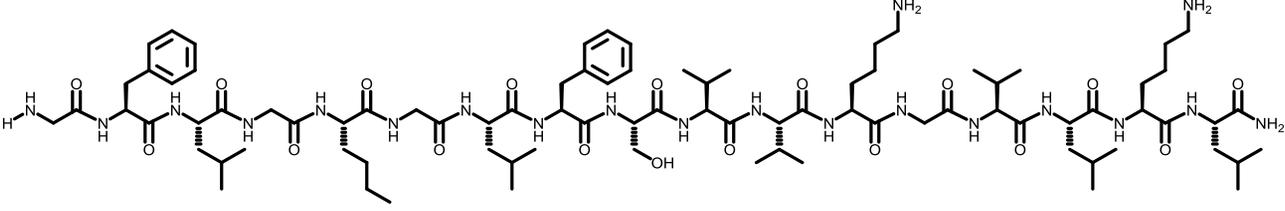
ANEXO C. SOPORTE SÓLIDO UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

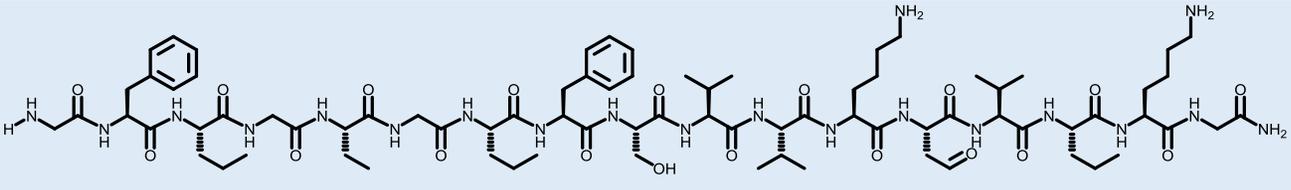
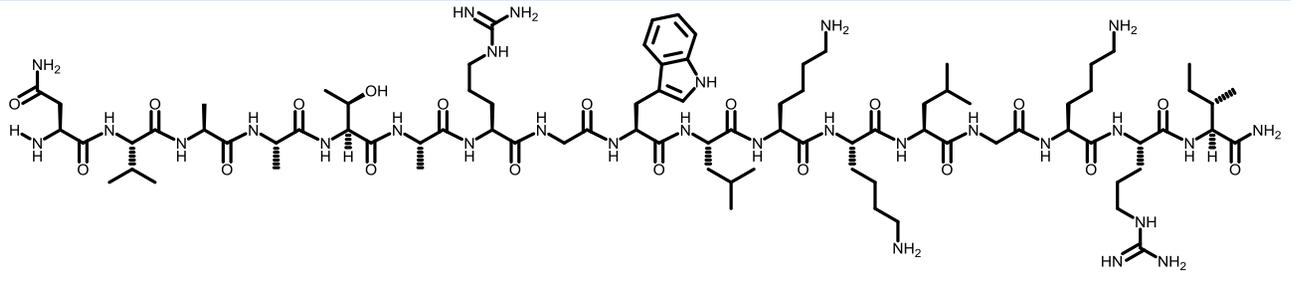
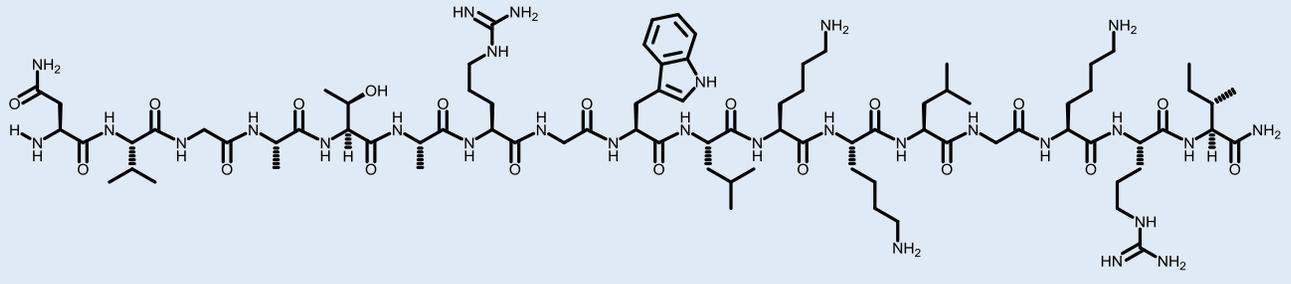
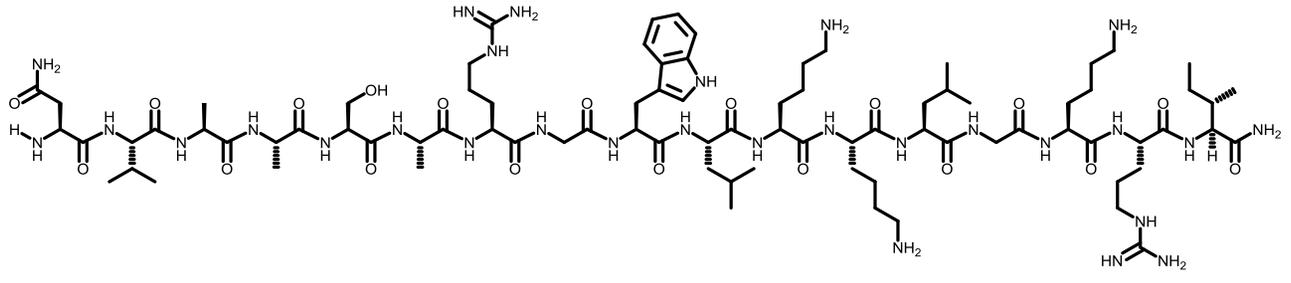
Nombre	Estructura
Resina Rink amida MBHA	 <p>The image shows the chemical structure of Rink amide MBHA resin. It consists of a resin bead (represented by a grey sphere) attached to a 4-iodophenyl group. This is linked via a methylene group to a secondary amide nitrogen (NH), which is part of a methylenebenzoyl group. The carbonyl oxygen of this group is linked to a methylene group, which is further connected to a benzofuran moiety. The benzofuran moiety is substituted with two methoxy groups (H₃CO and OCH₃) on the benzene ring.</p>

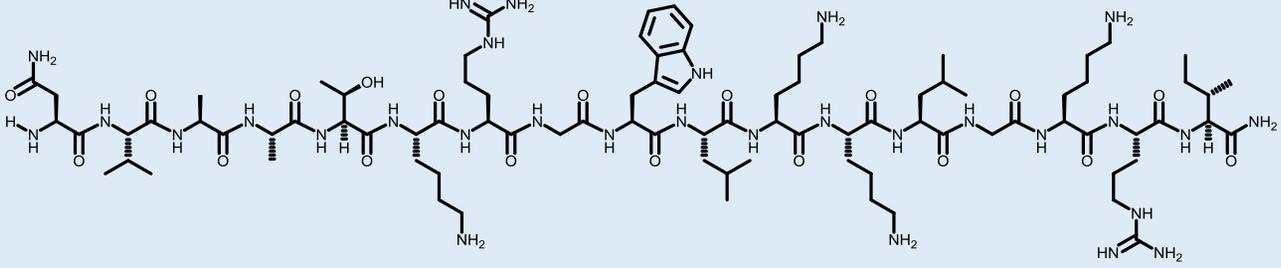
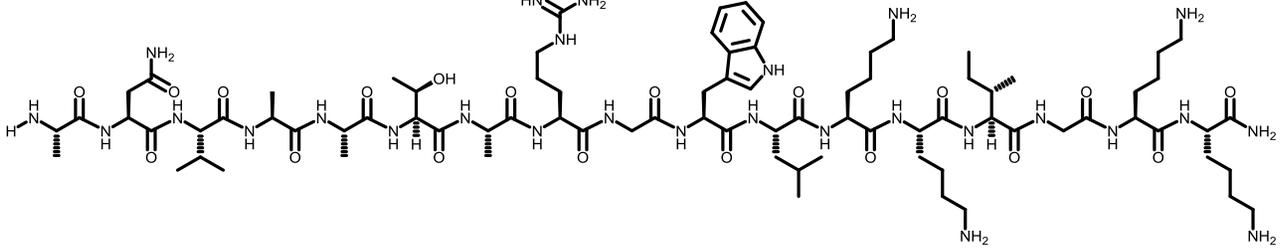
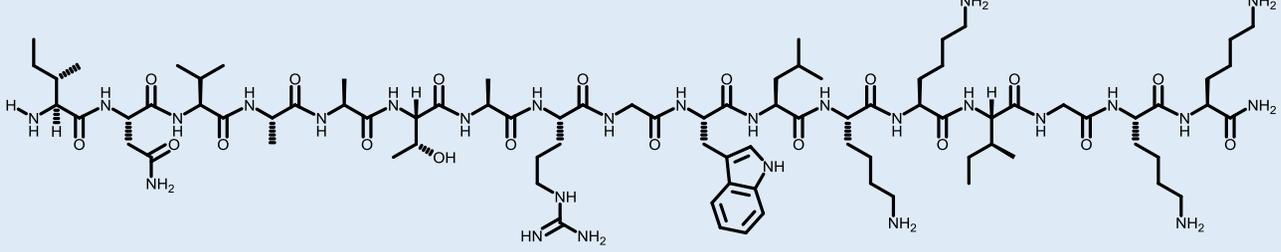
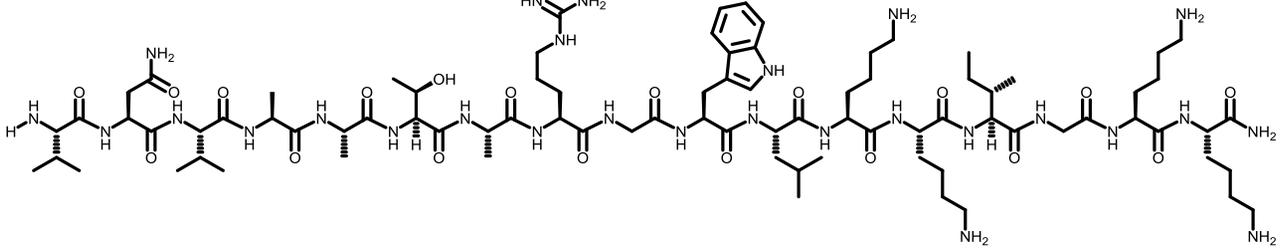
ANEXO D. AGENTE DE CONDENSACIÓN Y ADITIVOS EMPLEADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

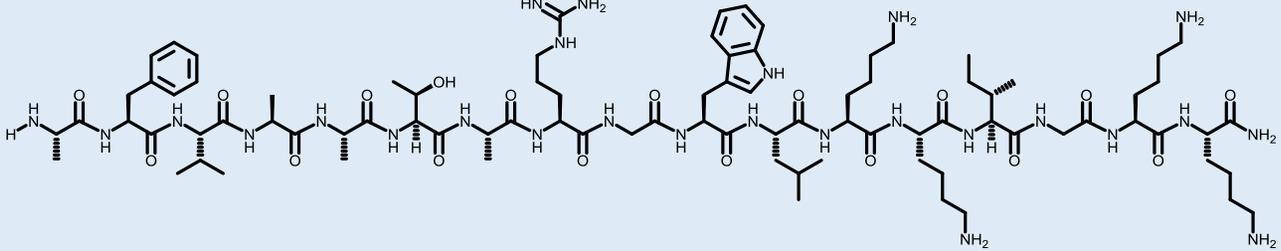
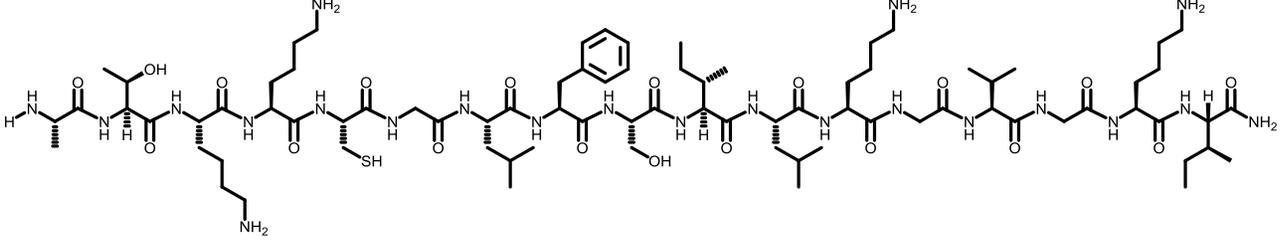
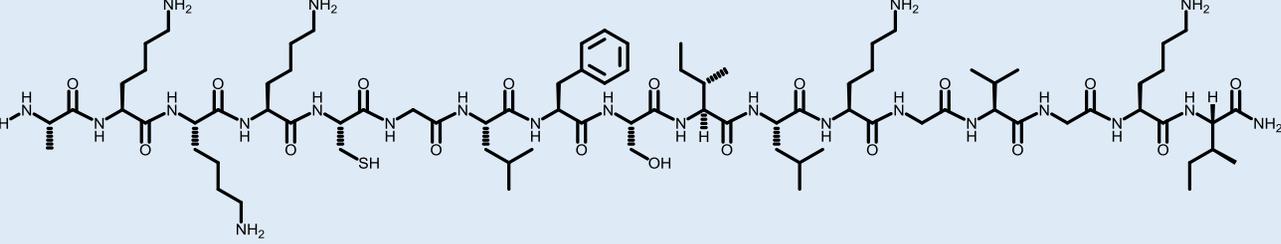
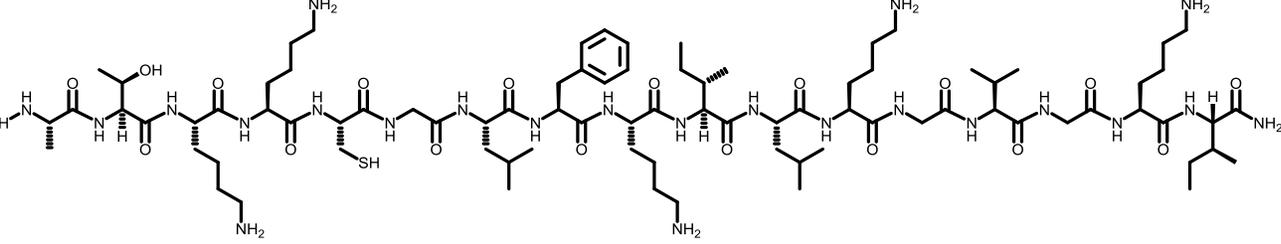
Nombre	Abreviación	Estructura
N,N' di-isopropilcarbodiimida	DIC	
Tetrafluorobato de N-óxido de N-[(1-H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanamínio	TBTU	
1-hidroxibenzotriazol	HOBt	

ANEXO E. SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS USADOS EN ESTA TESIS.

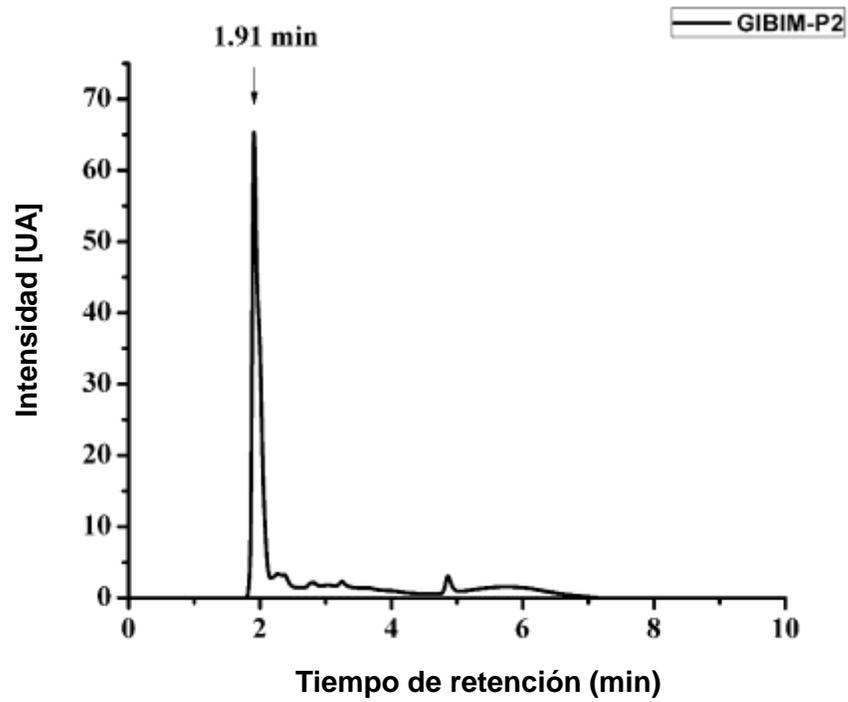
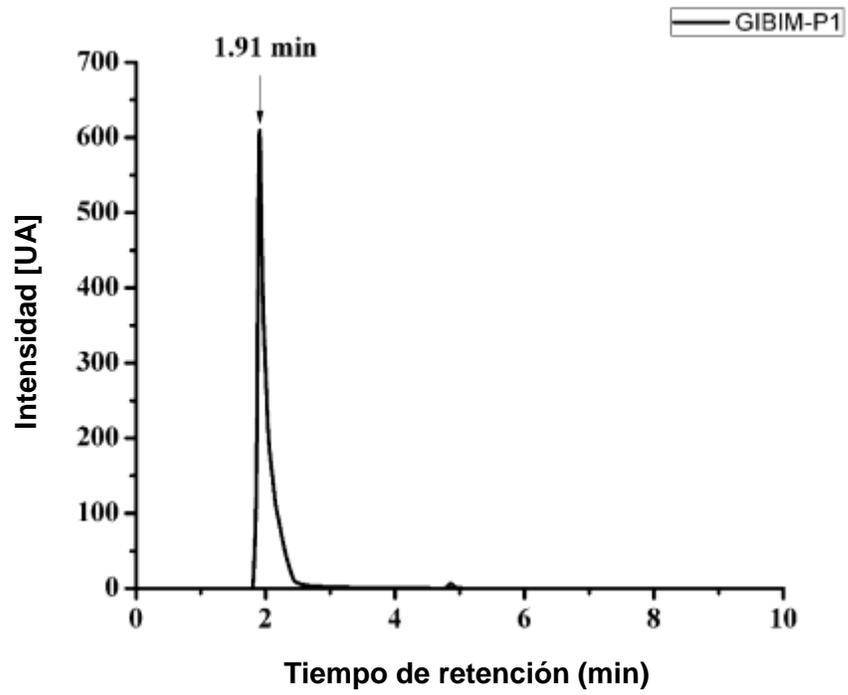
Nombre	Secuencia	Estructura
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSLMKWGGI-NH ₂	
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH ₂	
GIBIM-P2G171	GFLGKGLFSVVKGVLKI-NH ₂	
GIBIM-P2G17L	GFLGKGLFSVVKGVLKL-NH ₂	

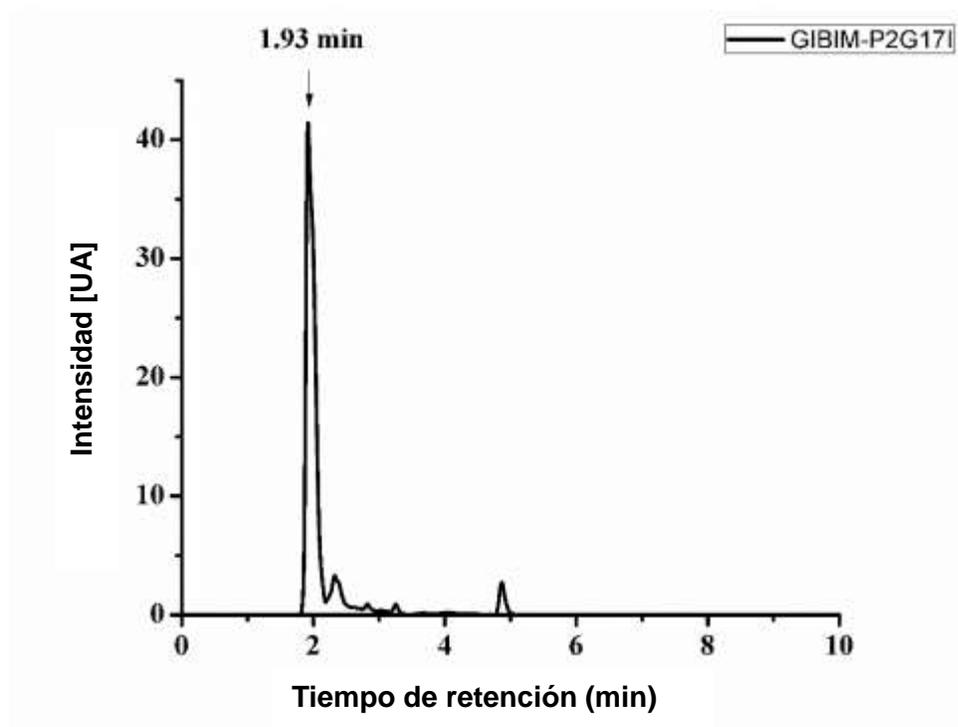
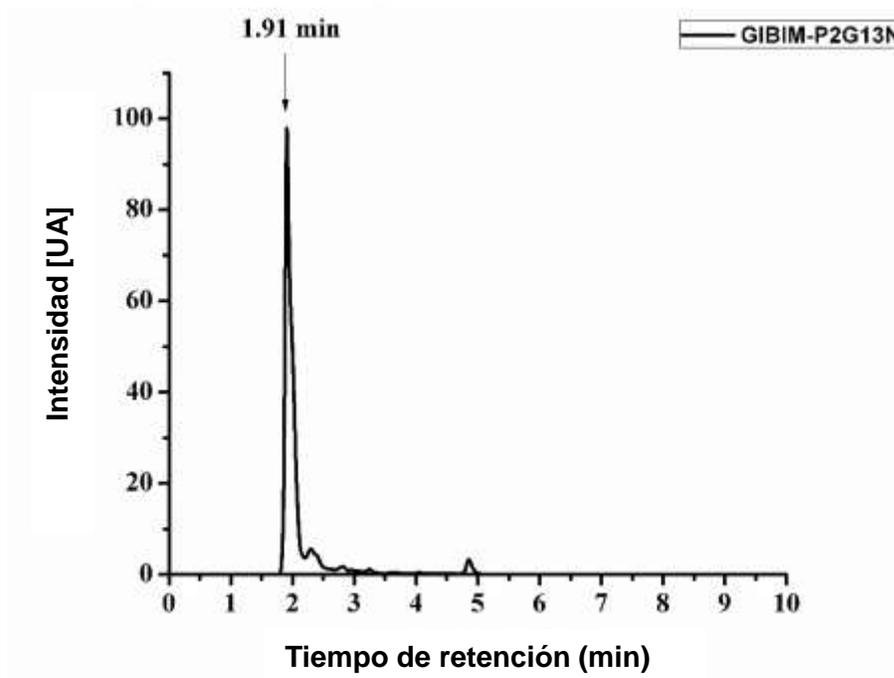
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVKNVLKG-NH ₂	
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKLGKRI-NH ₂	
GIBIM-P3A3G	NVGATARGWLKKLGKRI-NH ₂	
GIBIM-P3T5S	NVAASARGWLKKLGKRI-NH ₂	

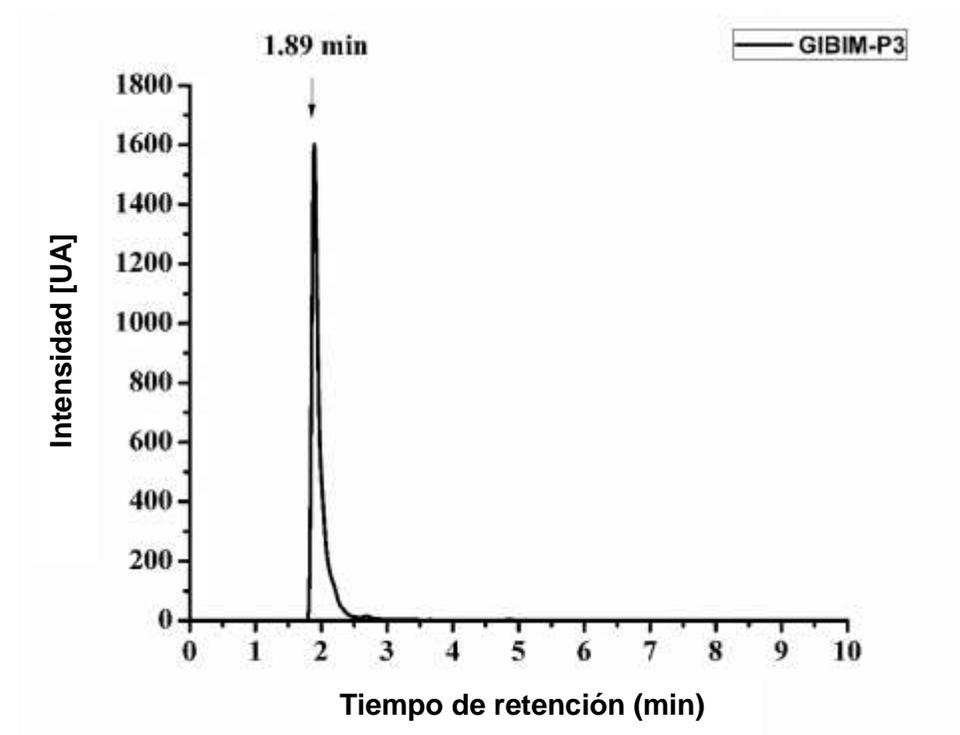
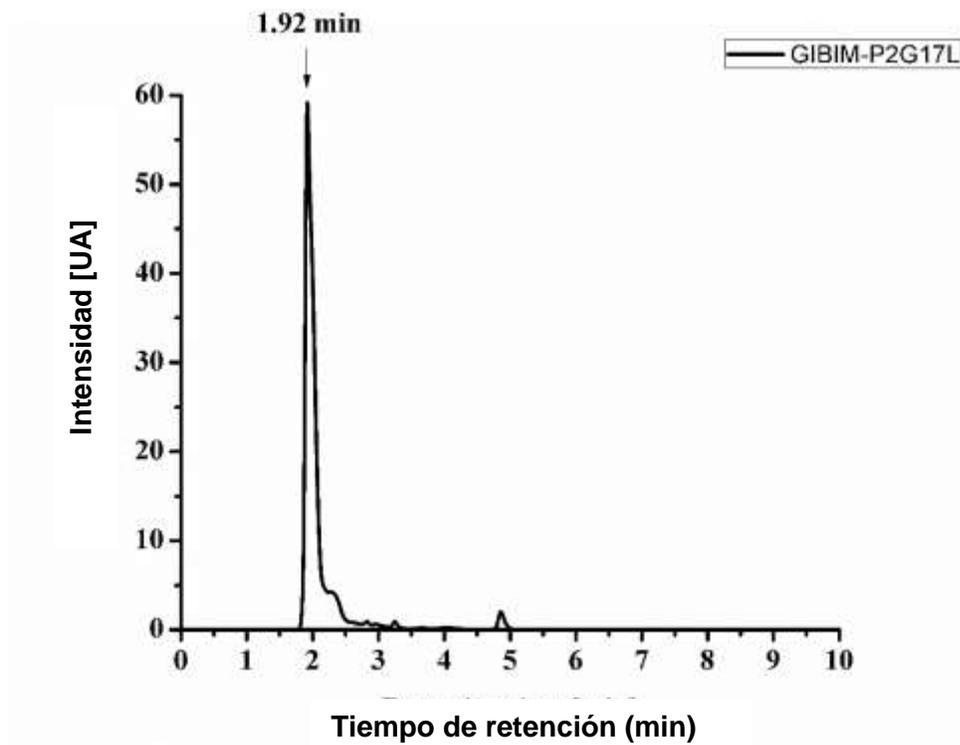
GIBIM-P3A6K	NVAATKRGWLKKGKRI-NH ₂	
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	
GIBIM-P4A11	INVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	
GIBIM-P4A1V	VNVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	

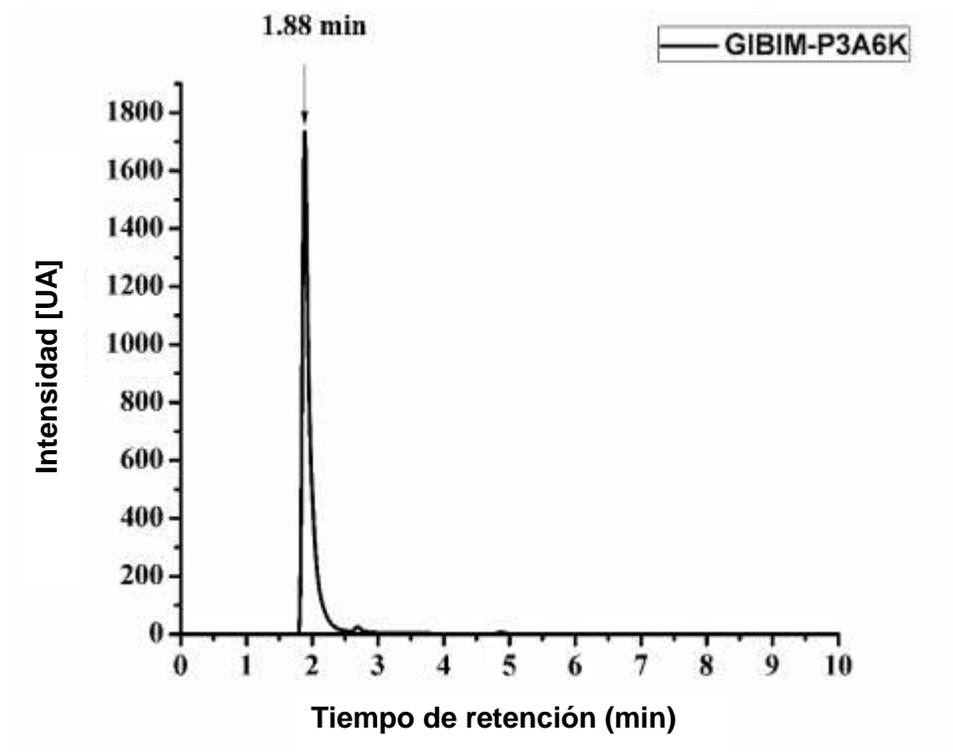
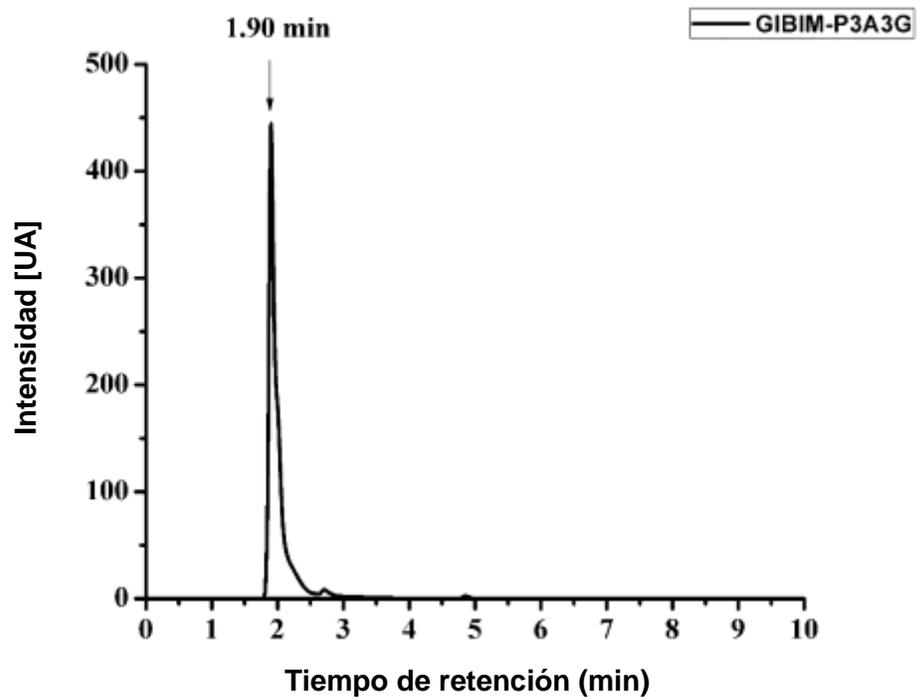
GIBIM-P4N2F	AFVAATARGWLKKIGKK-NH ₂	 <p>The chemical structure of GIBIM-P4N2F is a 16-residue peptide: AFVAATARGWLKKIGKK-NH₂. It features a variety of side chains including a benzyl group (F), a valine (V), an alanine (A), a threonine (T), an arginine (R), a glycine (G), a leucine (L), a lysine (K), an isoleucine (I), a glycine (G), a lysine (K), and a lysine (K) with a terminal primary amine. The backbone is a standard alpha-peptide chain.</p>
GIBIM-P5	ATKKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	 <p>The chemical structure of GIBIM-P5 is a 16-residue peptide: ATKKCGLFSILKGVGKI-NH₂. It contains a threonine (T), a threonine (T), a lysine (K), a cysteine (C), a glycine (G), a leucine (L), a serine (S), an isoleucine (I), a lysine (K), a valine (V), a glycine (G), a valine (V), a glycine (G), and a lysine (K) with a terminal primary amine. The backbone is a standard alpha-peptide chain.</p>
GIBIM-P5T2K	AKKKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	 <p>The chemical structure of GIBIM-P5T2K is a 16-residue peptide: AKKKCGLFSILKGVGKI-NH₂. It contains an alanine (A), three lysines (K), a cysteine (C), a glycine (G), a leucine (L), a serine (S), an isoleucine (I), a lysine (K), a valine (V), a glycine (G), a valine (V), a glycine (G), and a lysine (K) with a terminal primary amine. The backbone is a standard alpha-peptide chain.</p>
GIBIM-P5S9K	ATKKCGLFKILKGVGKI-NH ₂	 <p>The chemical structure of GIBIM-P5S9K is a 16-residue peptide: ATKKCGLFKILKGVGKI-NH₂. It contains a threonine (T), a threonine (T), a lysine (K), a cysteine (C), a glycine (G), a leucine (L), a serine (S), an isoleucine (I), a lysine (K), a valine (V), a glycine (G), a valine (V), a glycine (G), and a lysine (K) with a terminal primary amine. The backbone is a standard alpha-peptide chain.</p>

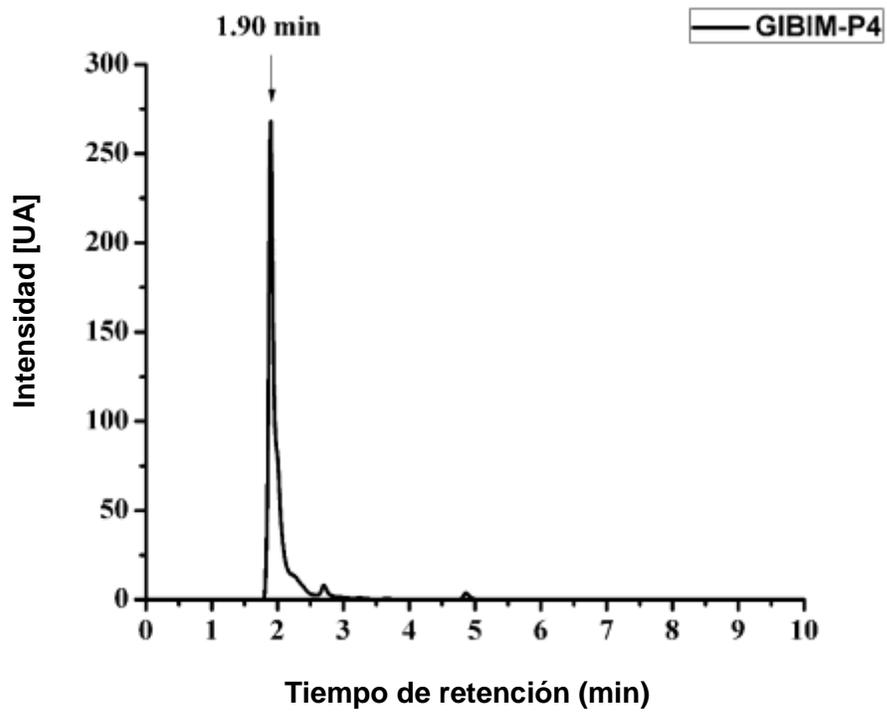
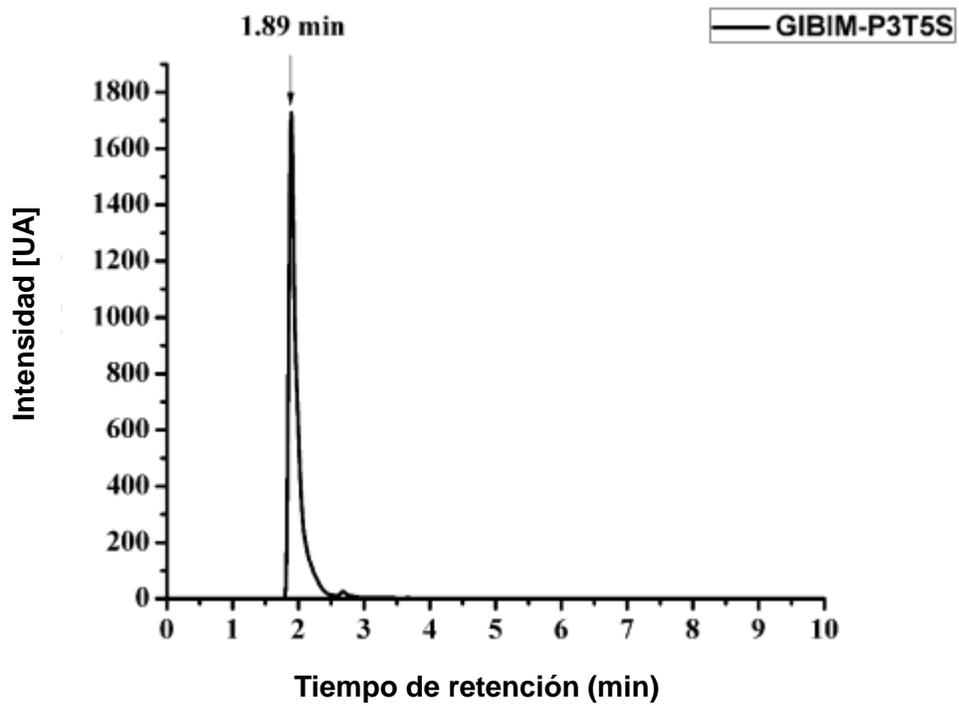
ANEXO F. CROMATOGRAMAS DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS GIBIM-P1 A GIIM-P6 Y ANÁLOGOS.

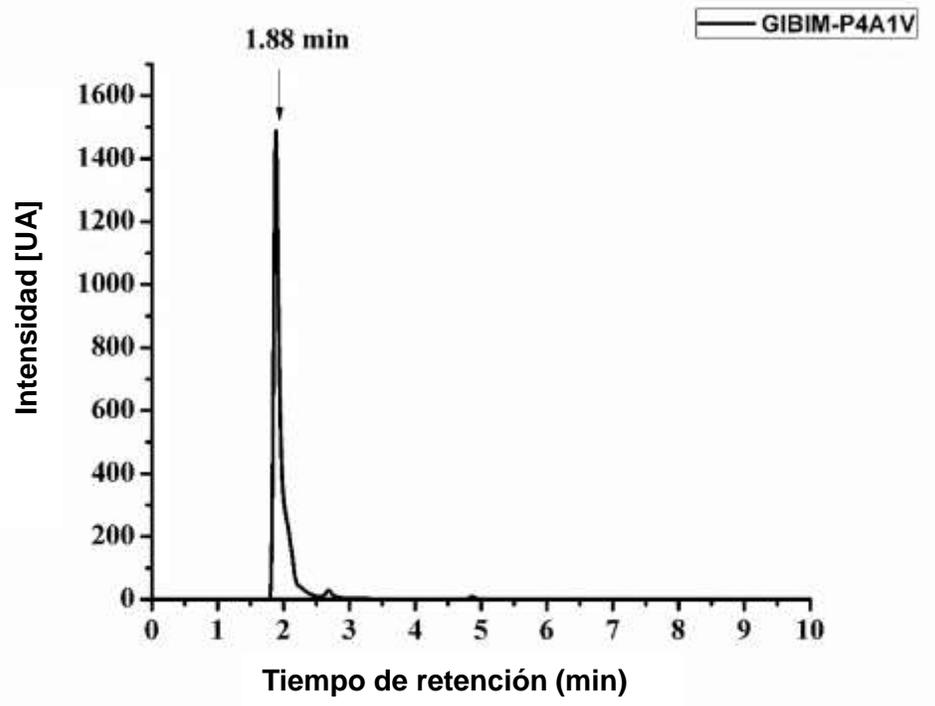
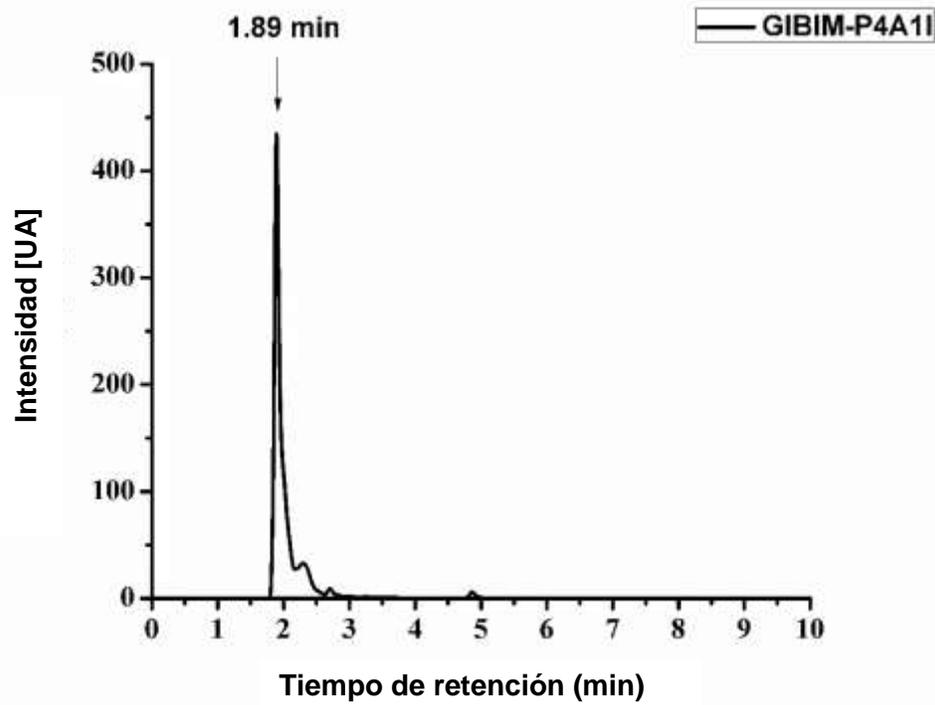


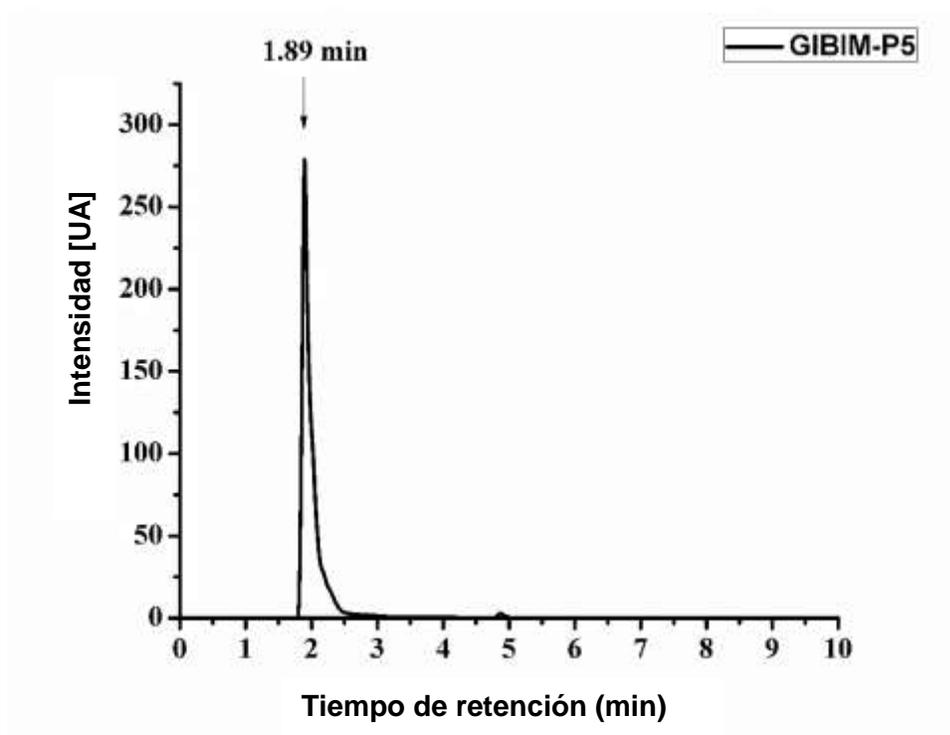
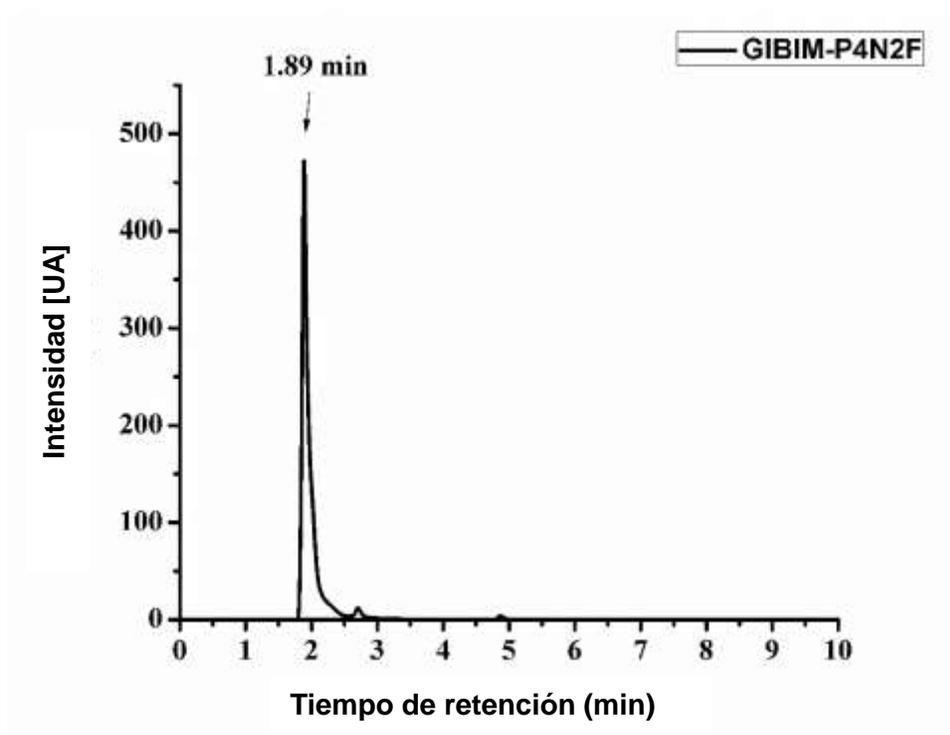


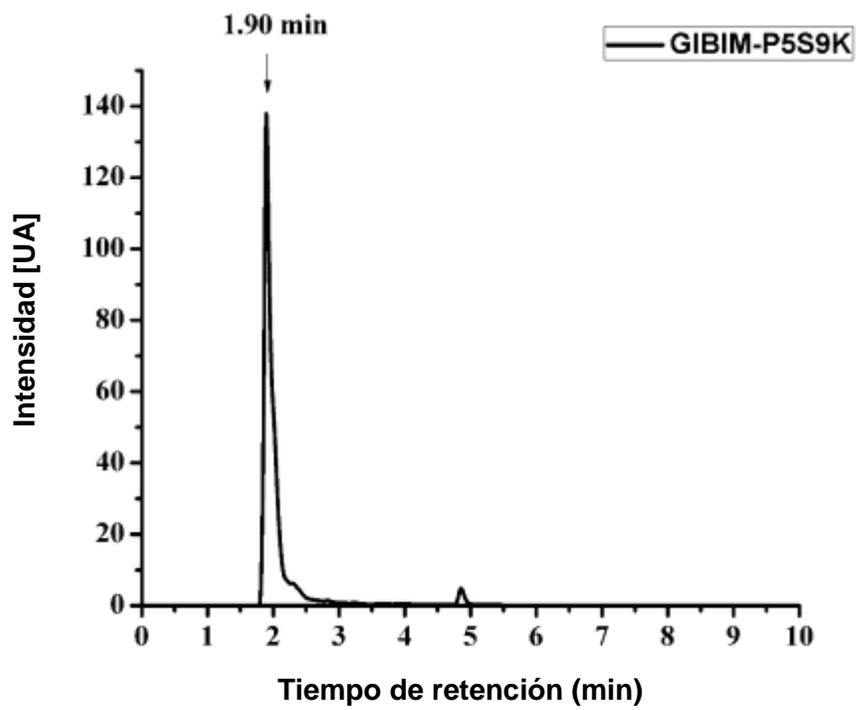
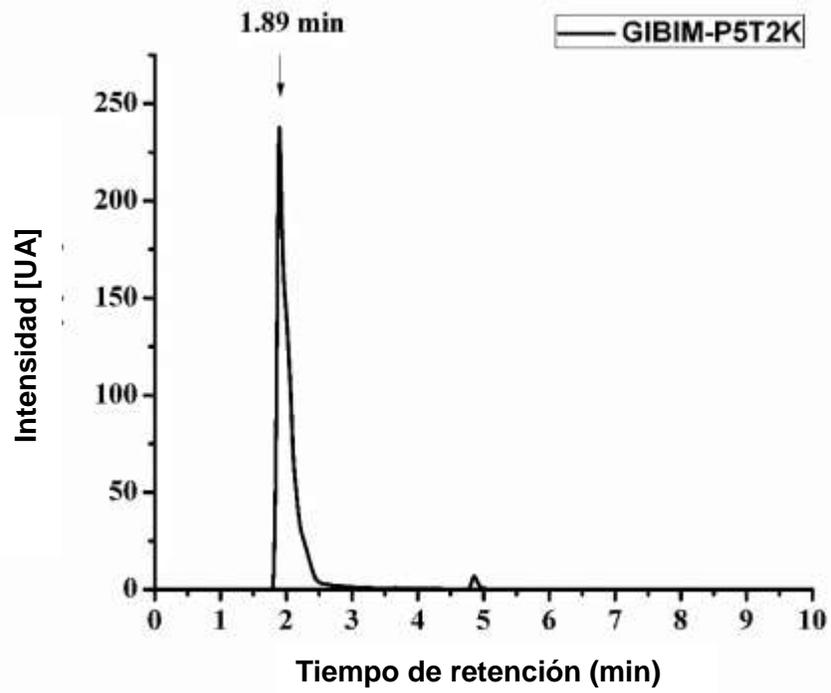


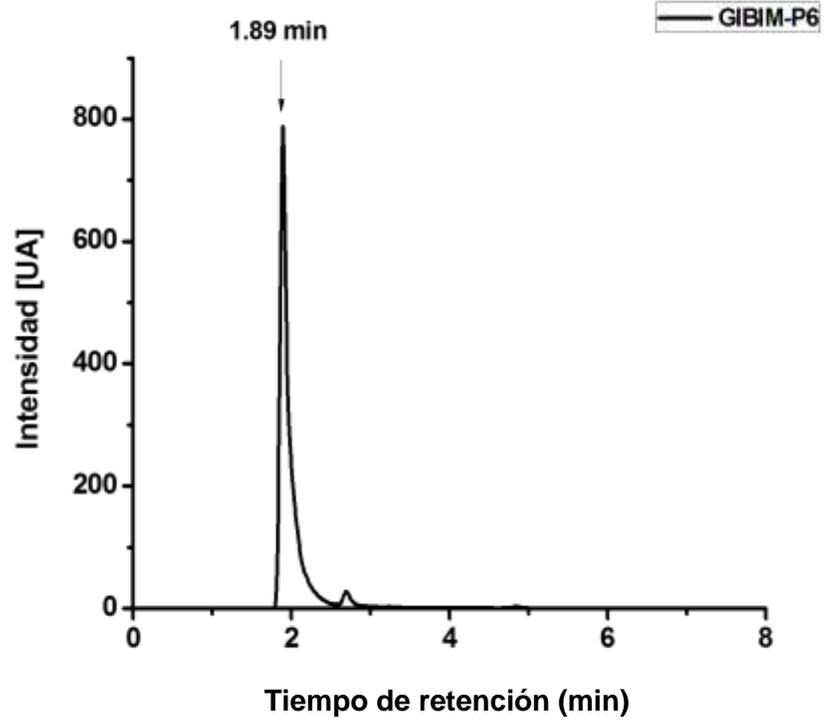
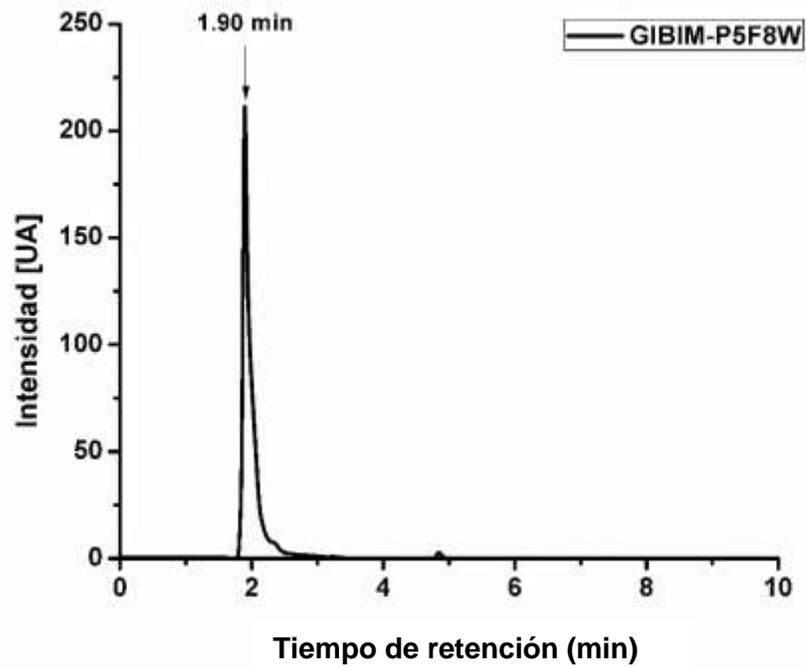




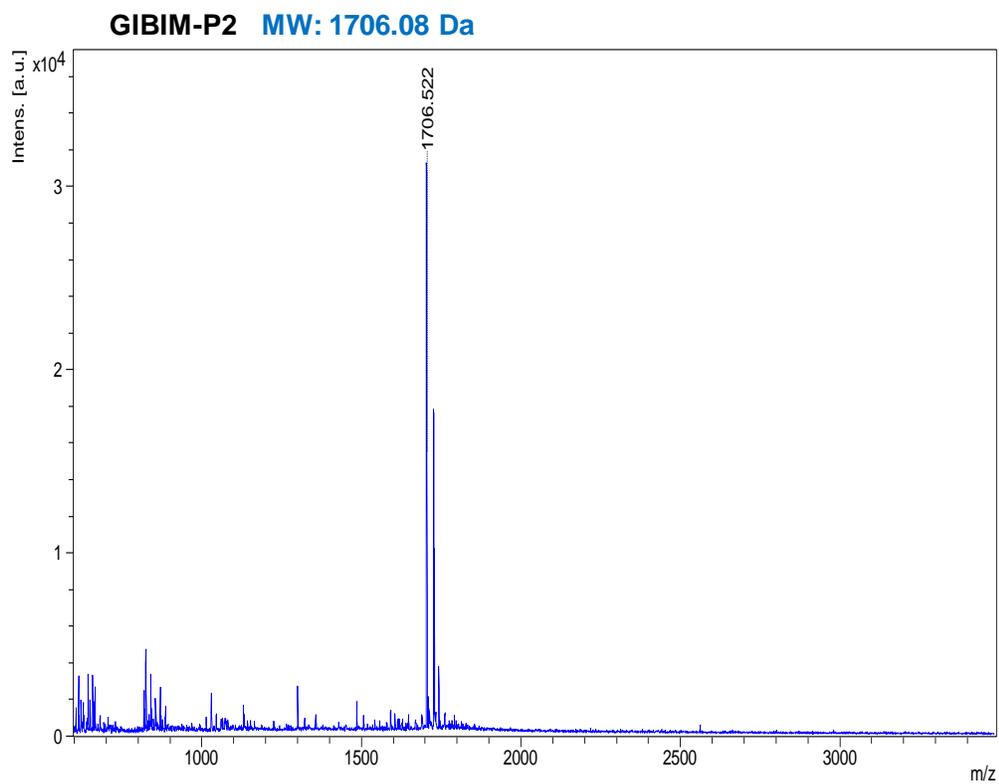
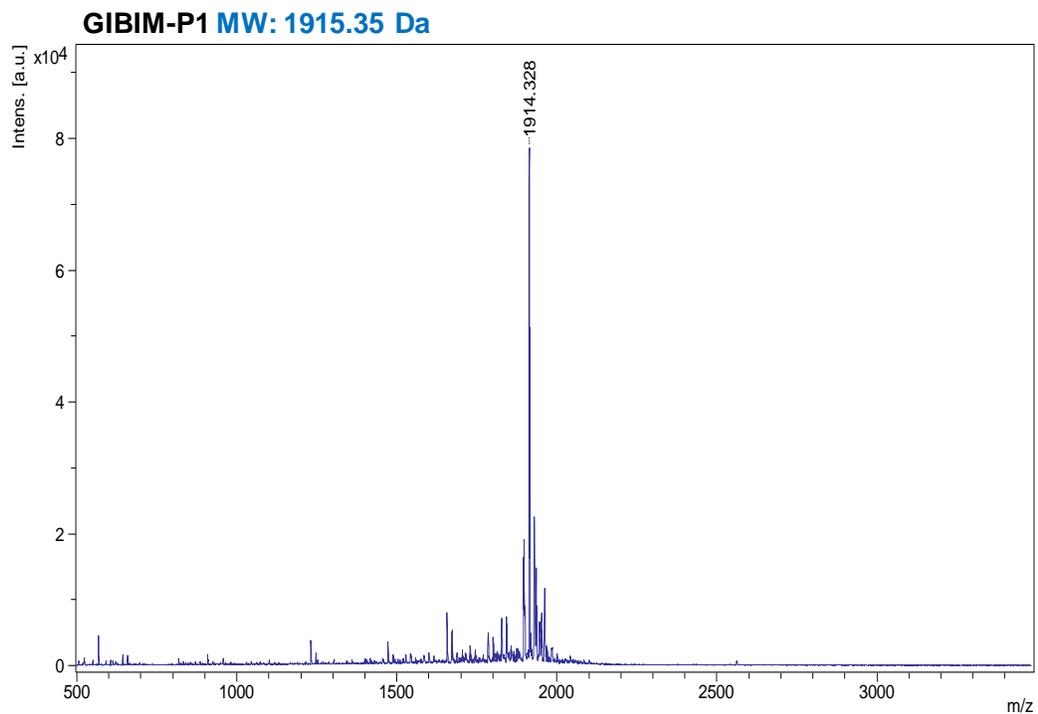


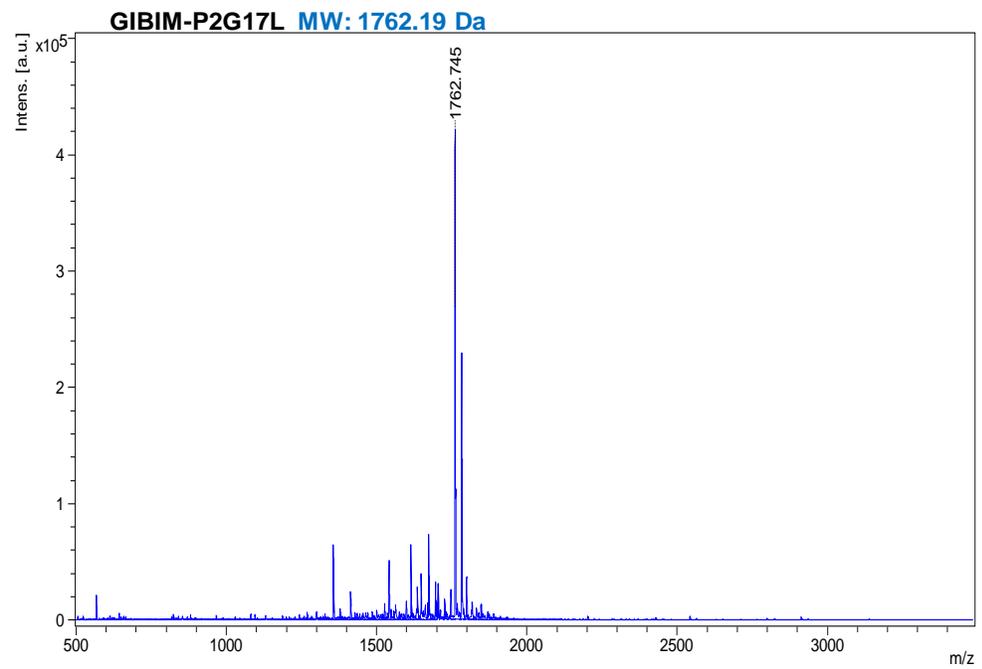
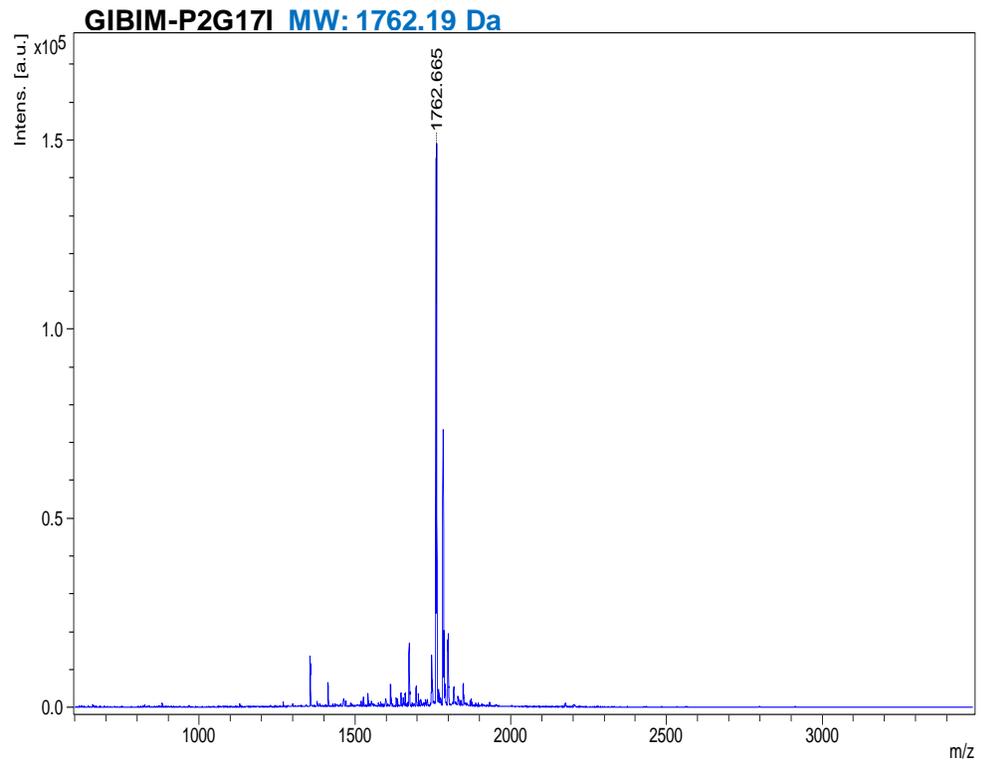




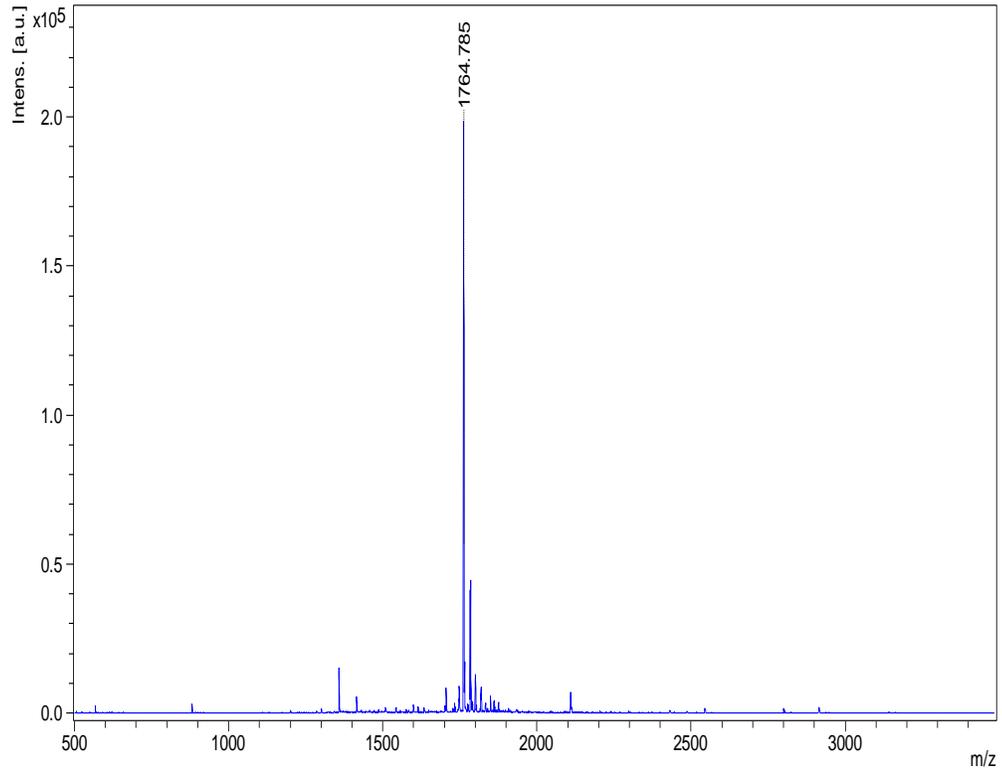


ANEXO G. ESPECTROS DE MASAS DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS GIBIM-P1 A GIIM-P6 Y ANÁLOGOS

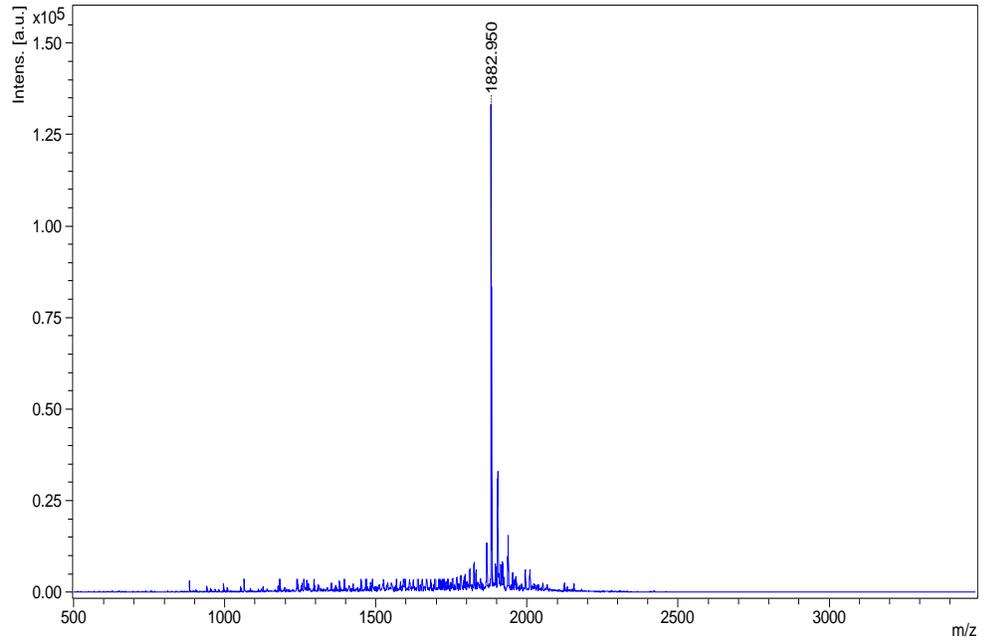




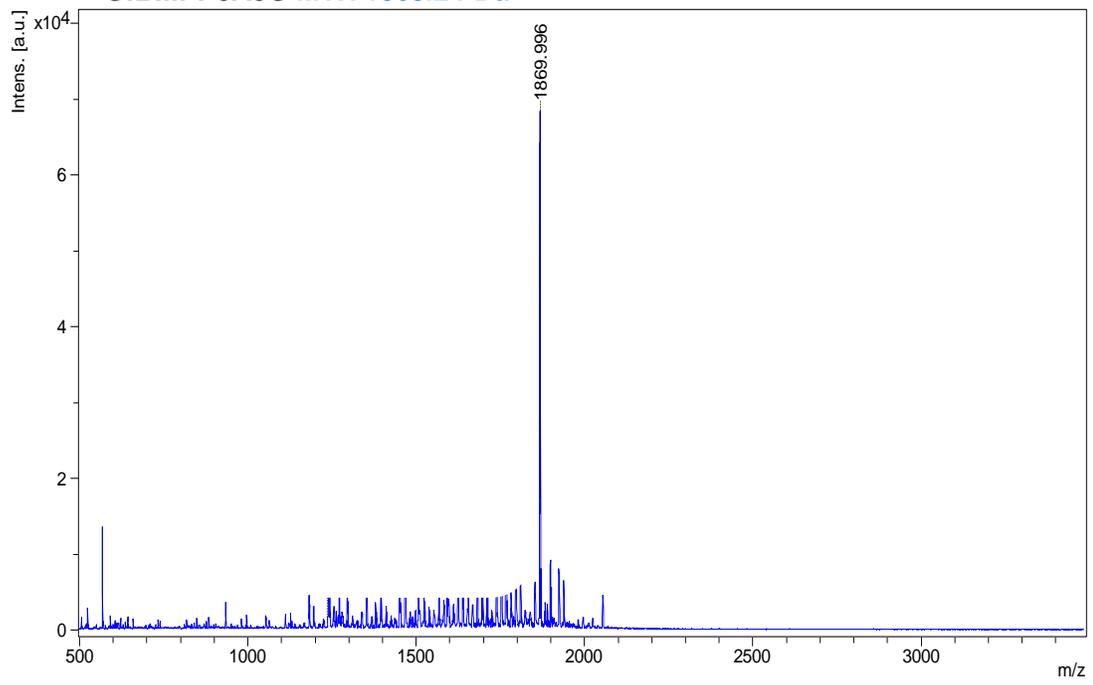
GIBIM-P2G13N MW: 1763.13 Da



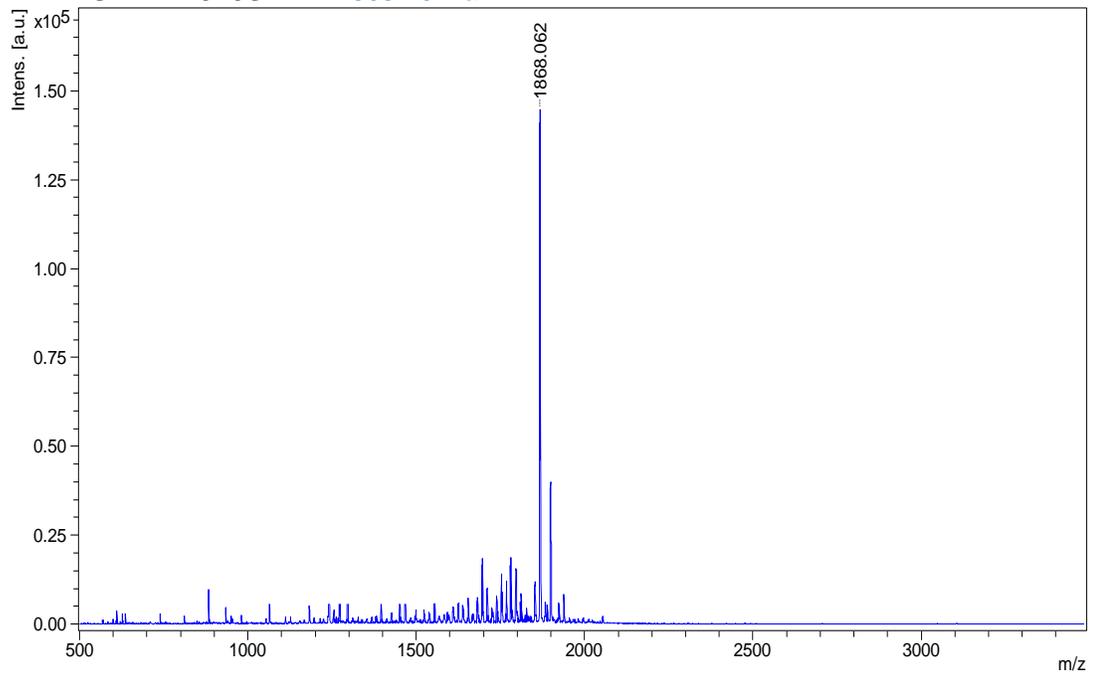
GIBIM-P3 MW: 1883.27 Da

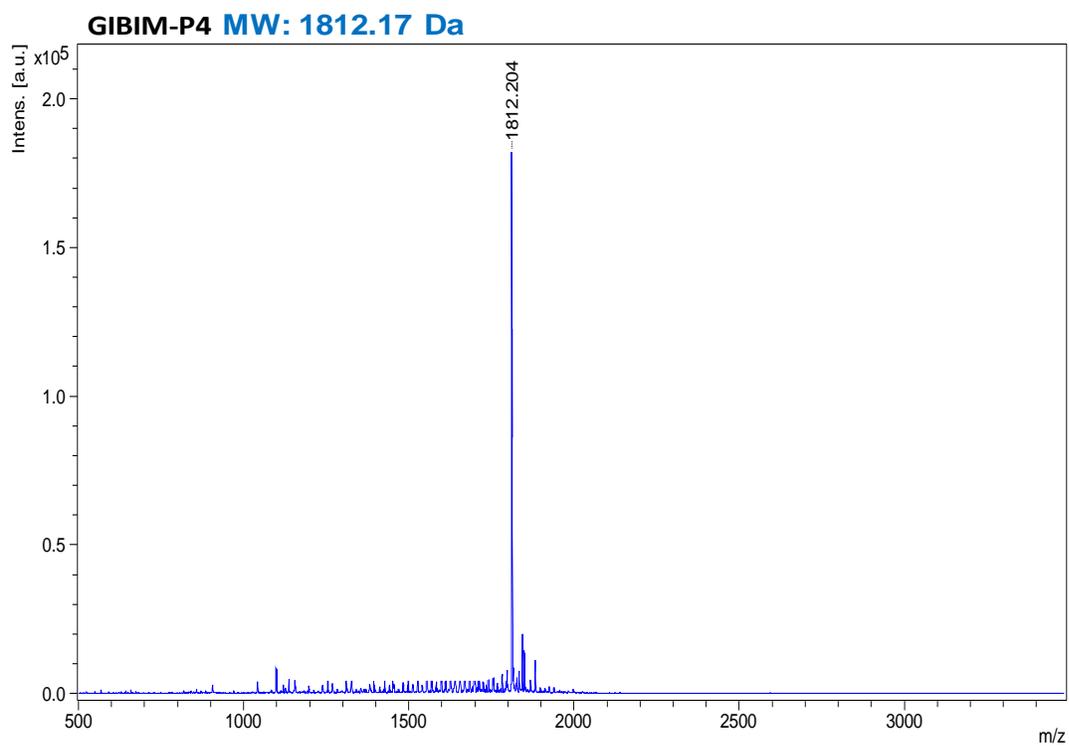
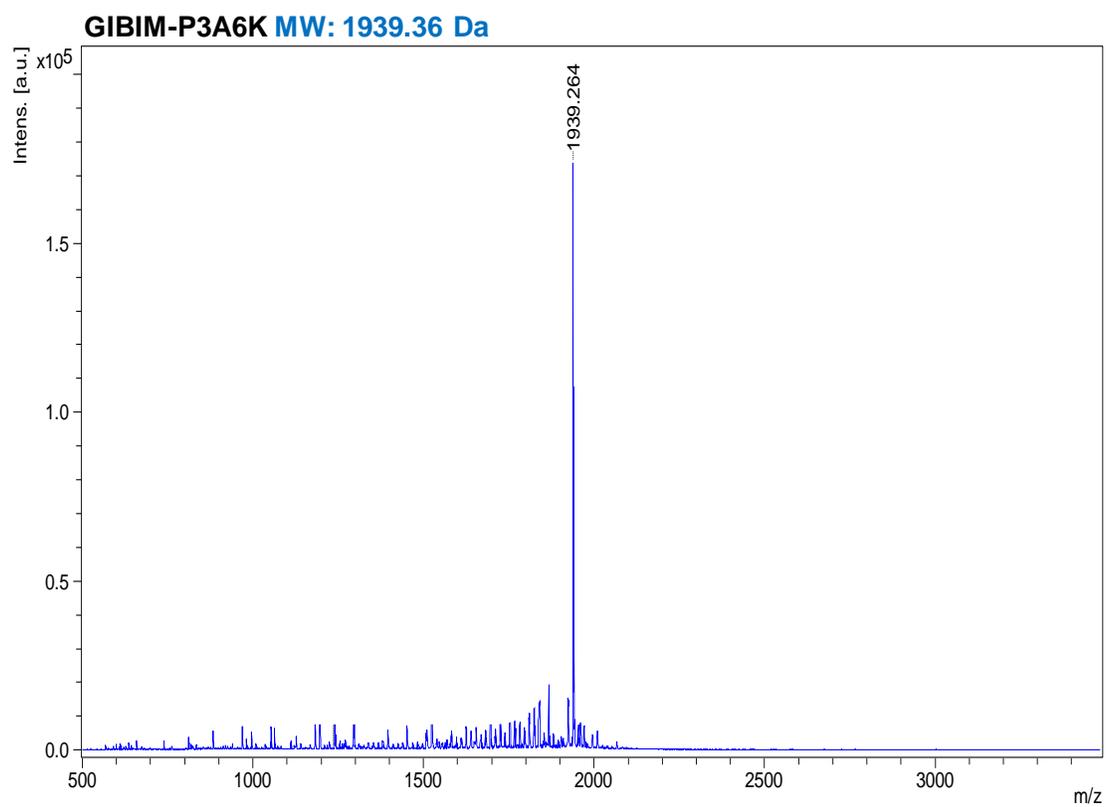


GIBIM-P3A3G MW: 1868.24 Da

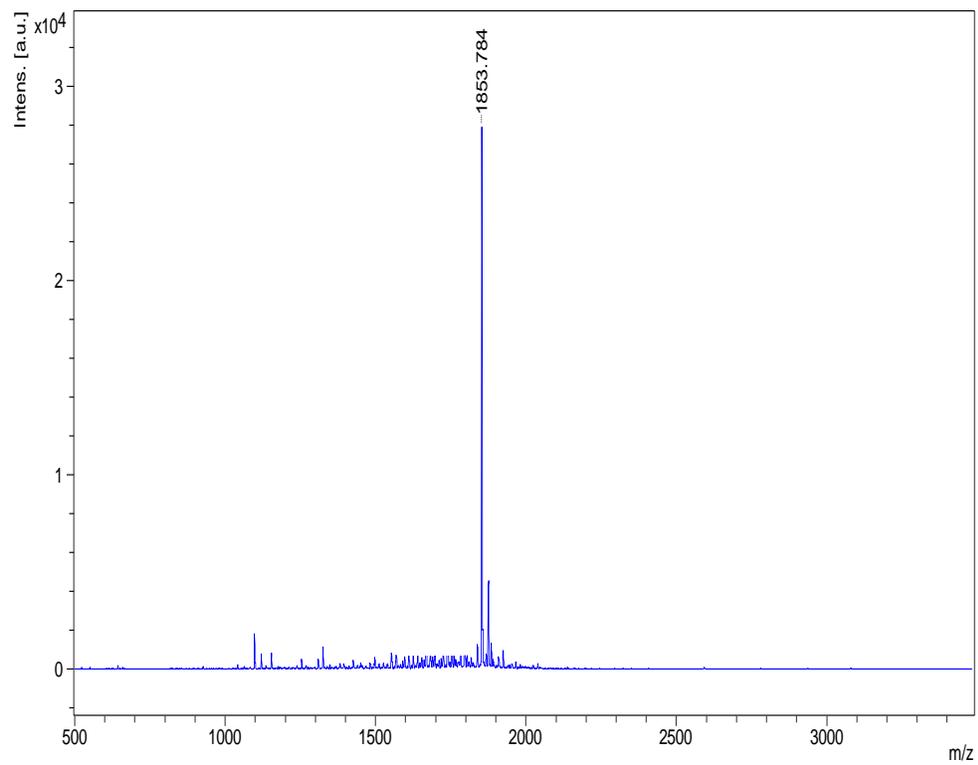


GIBIM-P3T5S MW: 1868.26 Da

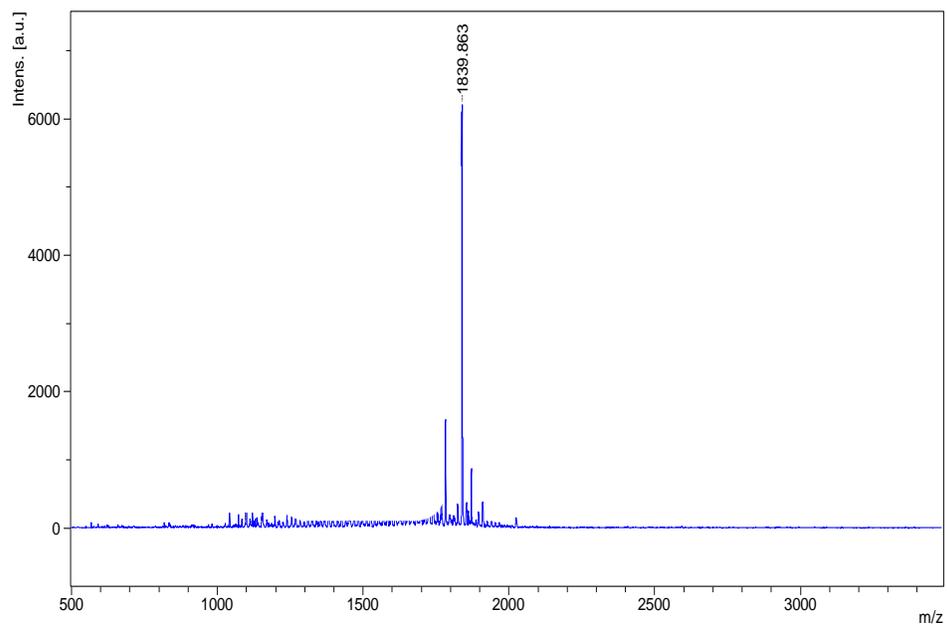




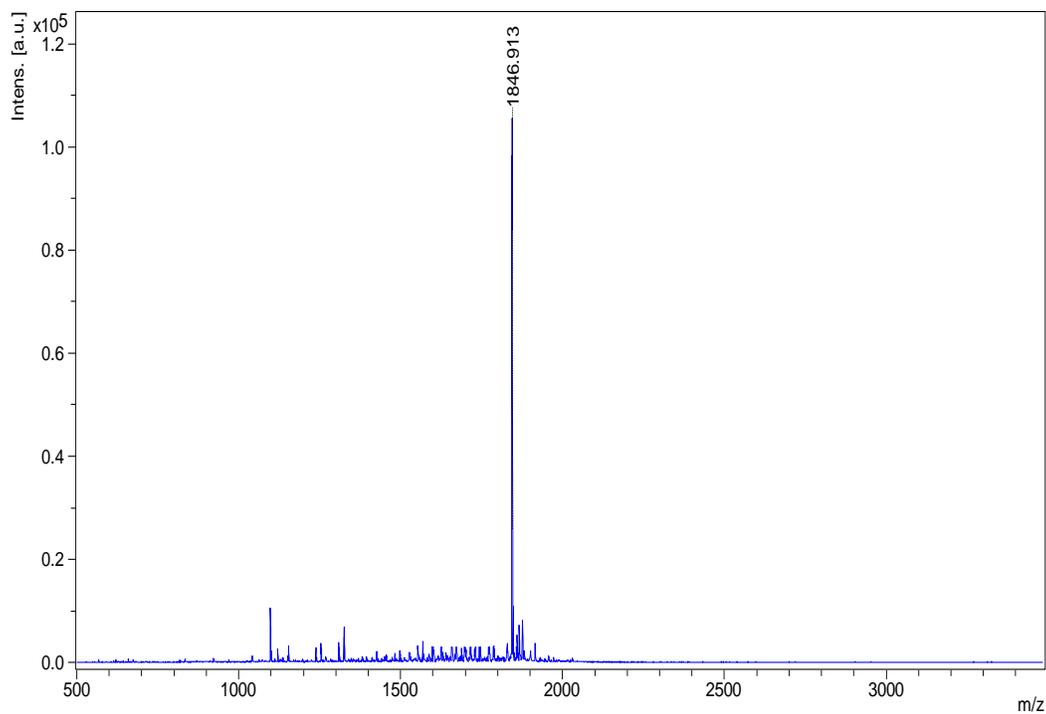
GIBIM-P4A1I MW: 1854.25 Da



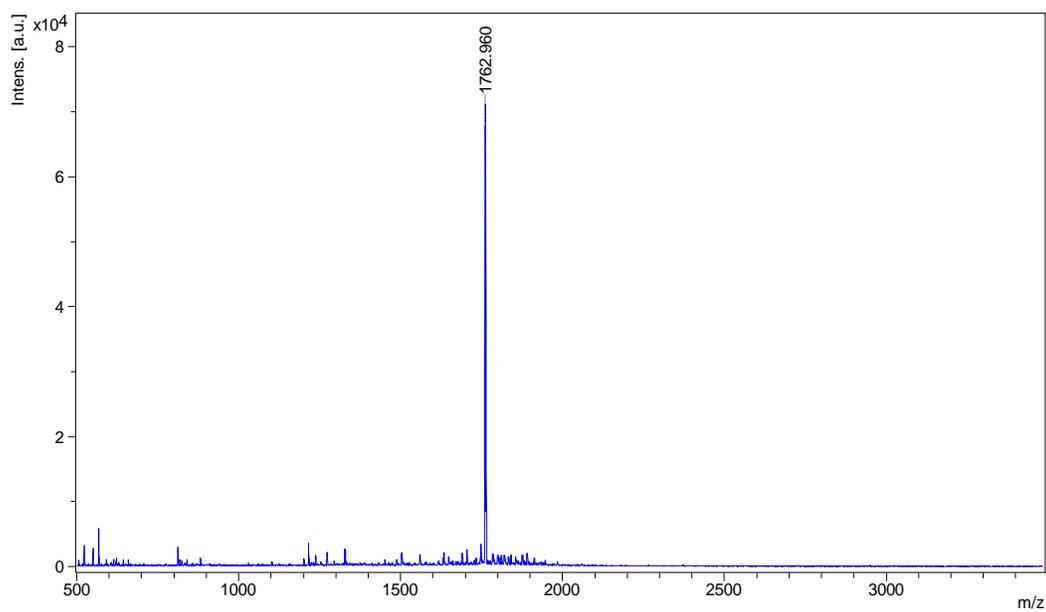
GIBIM-P4A1V MW: 1840.22 Da



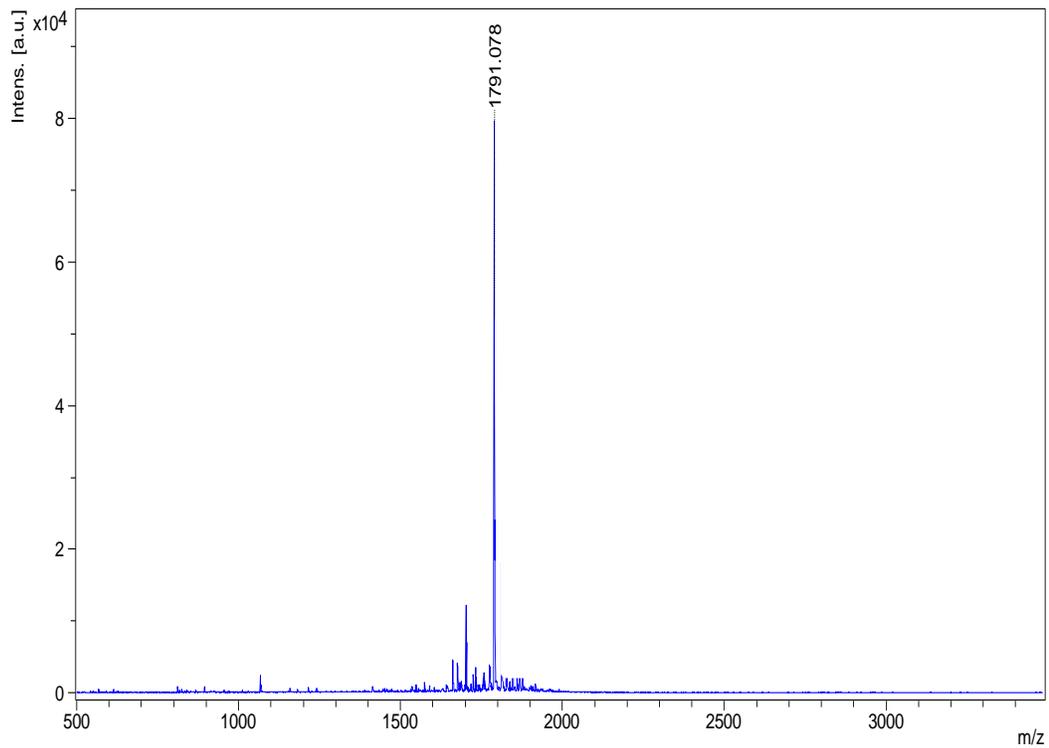
GIBIM-P4N2F MW: 1845.25 Da



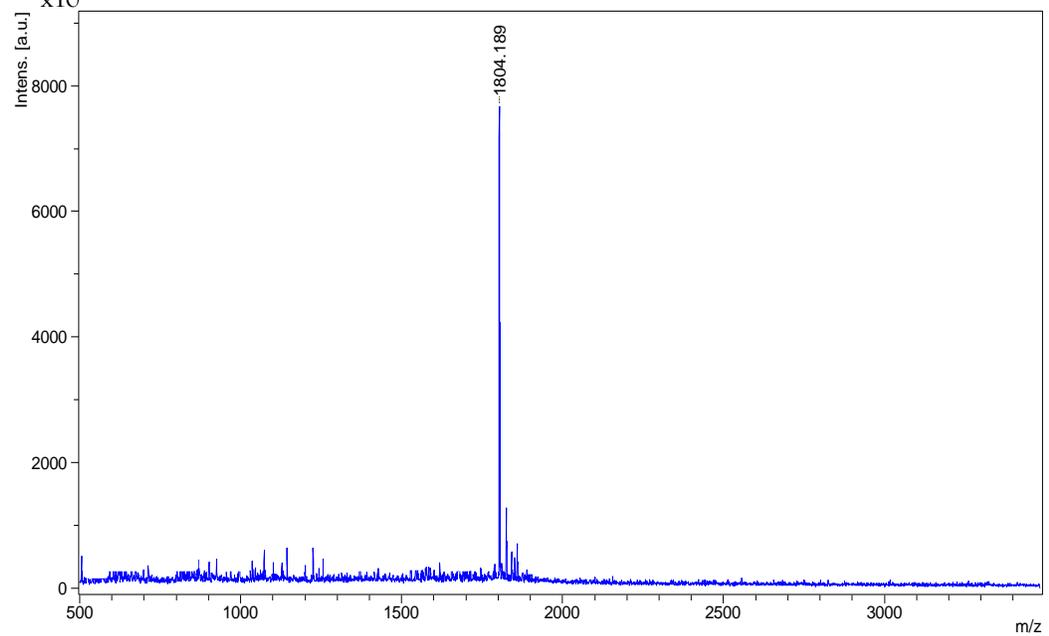
GIBIM-P5 MW: 1763.21 Da



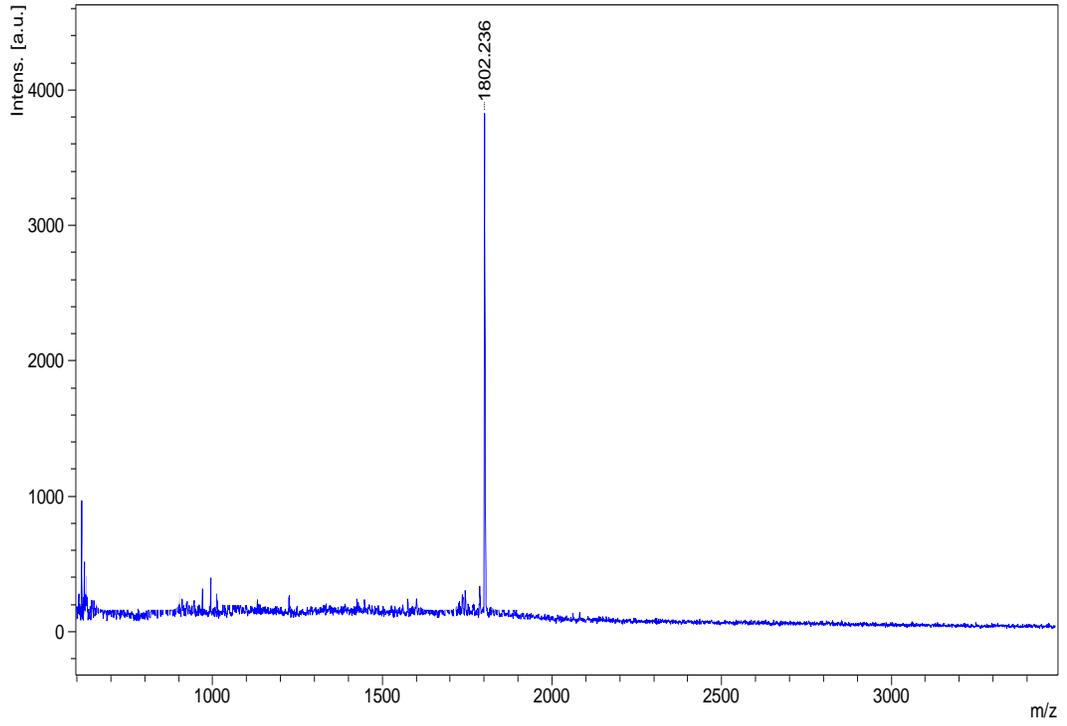
GIBIM-P5T2K MW: 1790.27 Da



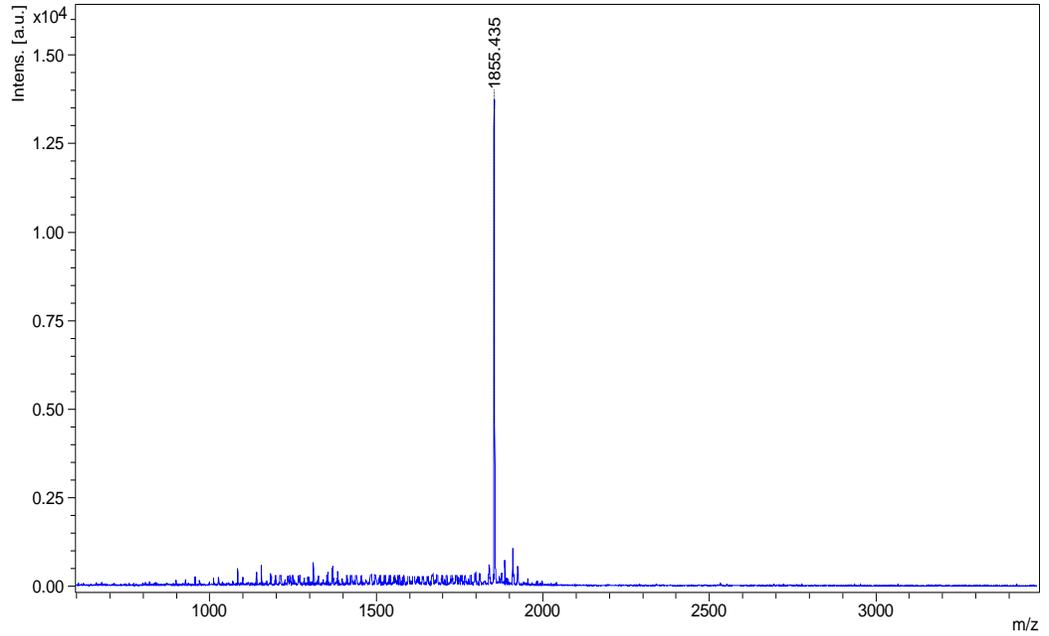
GIBIM-P5S9K MW: 1804.03 Da



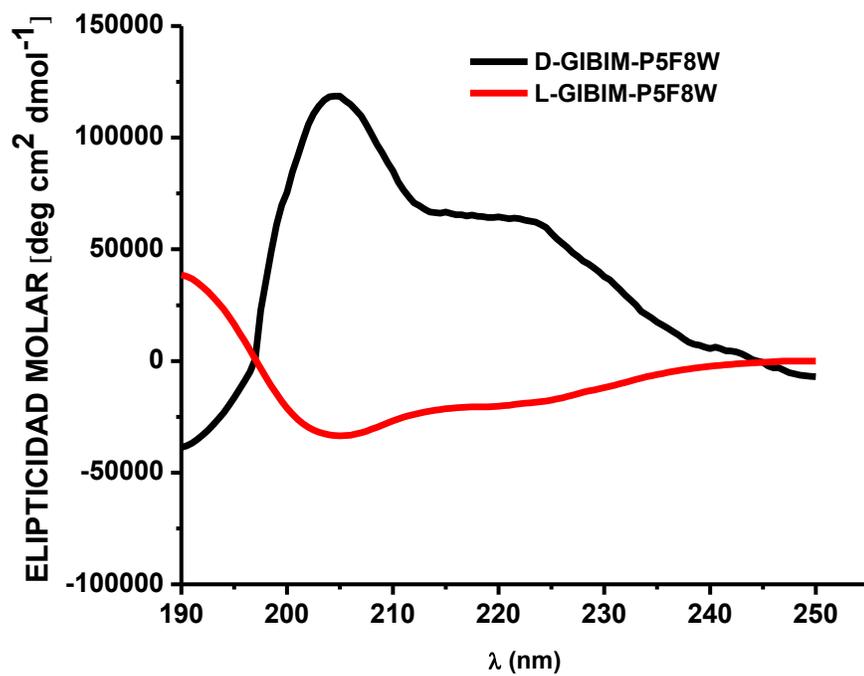
GIBIM-P5F8W MW: 1802.25 Da



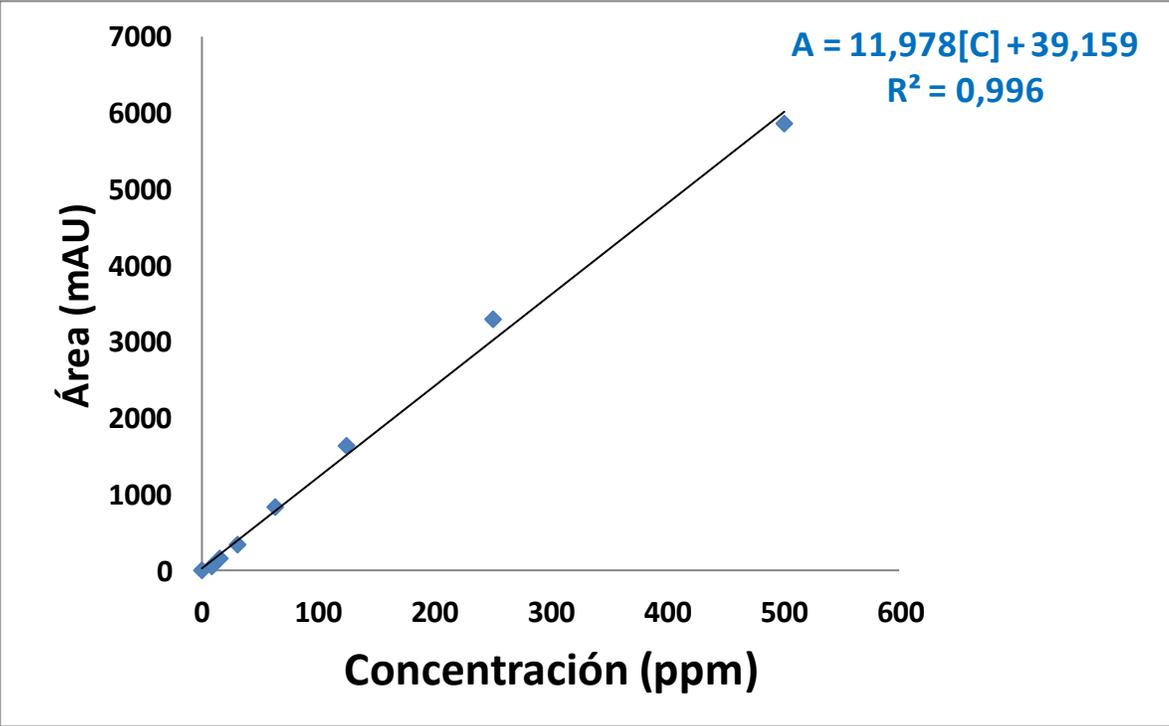
GIBIM-P6 MW: 1854.25 Da



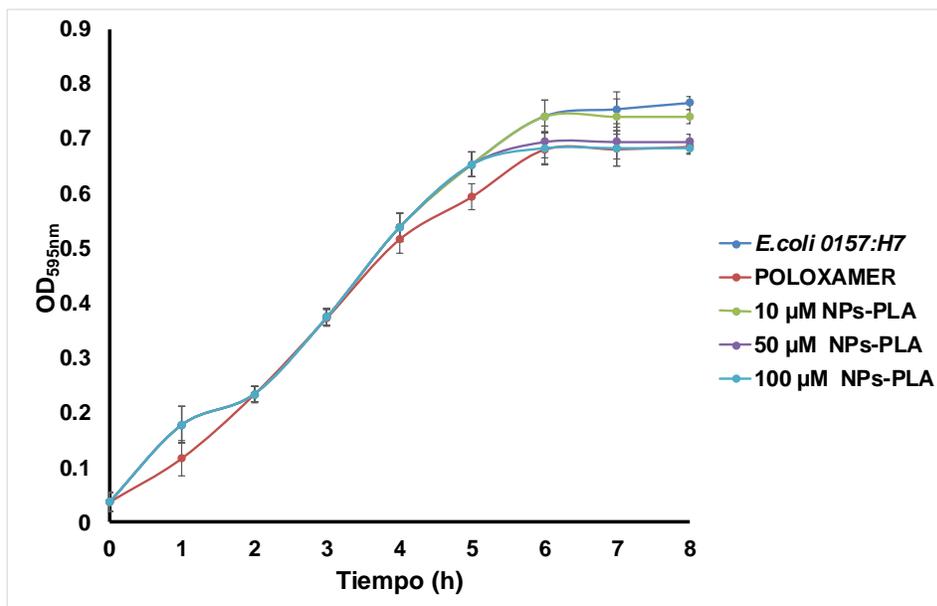
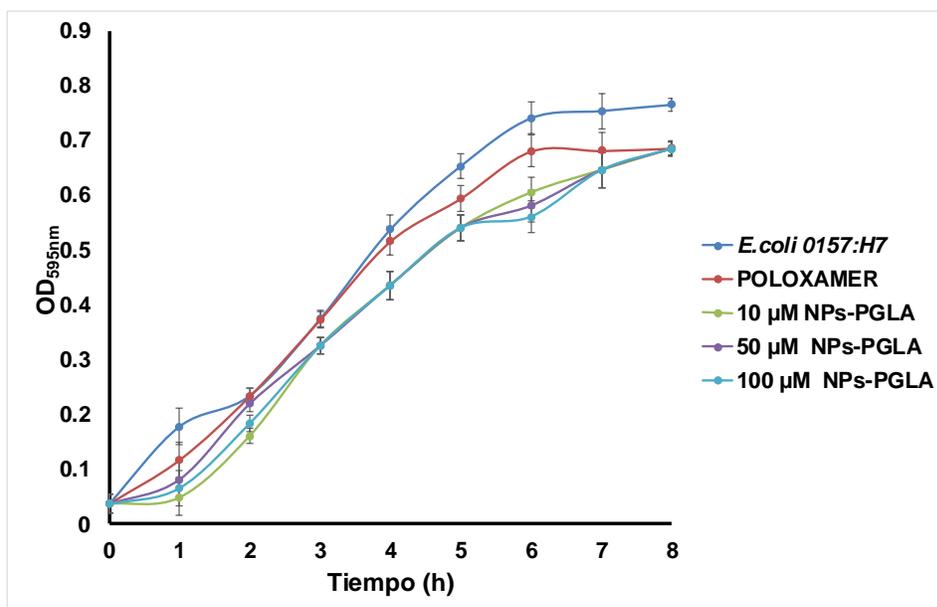
ANEXO H. ESPECTRO
DE DC DE LOS
ENANTIÓMEROS DEL
PÉPTIDO GIBIM-P5F8W



ANEXO I. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL PÉPTIDO GIBIM-P5S9K



ANEXO J. CINÉTICA DE LAS NPS VACÍAS DE PLA Y PLGA FRENTE A *E. coli* O157:H7



DIVULGACIÓN

Esta tesis y el período de investigación durante el doctorado contribuyeron a las siguientes divulgaciones:

Lista de artículos como Autor y coautor

- 1) Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Antimicrobial peptides: Promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), 2299-2321. doi:10.2174/0929867321666140217110155
- 2) Sanchez, A., Cruz, J., Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Torres, R., Ortiz, C., Villalonga, R., & Fernández-Lafuente, R. (2016). Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures. *RSC advance*, 6, 27329-27334. DOI: 10.1039/c6ra03627a **(pasantía de investigación)**
- 3) Gutiérrez, J. A., Cruz, J., Rondón, P., Jones, N., & Ortiz, C. (2016). Small gold nanocomposites obtained in reverse micelles as nanoreactors. Effect of surfactant, optical properties and activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *New Journal Chemistry*, 40, 10432-10439.
- 4) Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in Poly(lactic Acid or Poly(lactic-co-glycolic) Acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28, 135102-135112.
- 5) Cruz, J., Rondón-Villarreal, P., Torres, G., Urquiza, M., Ortiz, C., Guzmán, F., Alvarez, C., Fernández-Lafuente, R., Rivas, L., Ábengoza, M. A., & Sierra, D. A. (2017). Rational design and evaluation of antimicrobial peptides against *Escherichia coli* O157:H7, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Medicinal Chemistry*, (under revision).

Lista de ponencias

- 1) López A, **Cruz J**, Ortiz C, Torres R. Síntesis de péptidos antimicrobianos basados en Lactoferrina con potencial antimicrobiano frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. Primer Congreso Colombiano de bioquímica y Biología Molecular (C2B2) 2014. Bogotá-Colombia.

- 2) **Cruz J**, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Study of the antiparasitary activity of new synthetic peptides against *Leishmania sp.* 31st Latin American Chemistry Congress. CLAQ 2014. Lima-Perú.
- 3) **Cruz J**, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Síntesis, caracterización y evaluación antimicrobiana de péptidos sintéticos diseñados frente a *Escherichia coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). 31st Latin American Chemistry Congress. CLAQ 2014. Lima-Perú.
- 4) **Cruz J**, Martínez B. Y, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Antibacterial activity of Novel Bioactive Peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. 24th American Peptide Symposium (APS) 2015. Orlando-USA.
- 5) Pérez J, Prada Y, **Cruz J**, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Development of new synthetic peptides analogs of bovine Lfampin with antibiotic potential against *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA). 24th American Peptide Symposium (APS) 2015. Orlando-USA.
- 6) **Cruz J**, Florez J, Gutiérrez J, Ortiz C, Guzmán F, Urquiza M, Torres R. Nanoencapsulation of novel synthetic peptide in PLGA and its antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 7th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine. Bionanomed 2016. Krems-Austria.
- 7) **Cruz J**, Florez J, Gutiérrez J, Ortiz C, Guzmán F, Urquiza M, Torres R. Synthesis and evaluation of polylactic acid nanoparticles loaded with a new synthetic peptide against *Pseudomonas aeruginosa* and *methicillin-resistant*

Staphylococcus aureus. 7th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine. Bionanomed 2016. Krems-Austria.

- 8) Bautista Y, Correa S, **Cruz J**, Guzmán F, Ortiz C, Urquiza M. Efecto de la estructura α -hélice anfipática en el diseño de péptidos antimicrobianos. Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2) 2016 Medellín-Colombia.

Lista de patentes

Patentes presentadas por la Universidad Industrial de Santander ante la Cámara de Comercio:

- Nuevas moléculas antimicrobianas
- Péptidos sintéticos con actividad biológica

Pasantías de Investigación

- Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Núcleo de Biotecnología, Campus Curauma, Laboratorio de Síntesis de péptidos, Octubre-Noviembre de 2012, Valparaíso, Chile.
Jefe inmediato: Fanny Guzmán Quimbayo, PhD.
- Instituto de Catálisis y petroleoquímica, Grupo: Optimización de biocatalizadores y bioprocesos enzimáticos, Enero-Agosto de 2014, Madrid, España.
Jefe inmediato: Roberto Fernández Lafuente, PhD.

Co-dirección de tesis de pregrado

- ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A NEW SYNTHETIC ENCAPSULATED ANTIMICROBIAL PEPTIDE AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 AND METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* [recurso electrónico] / Jair Alexander Florez Plata; Director: Claudia C. Ortiz López; **Co-director: Jenniffer Cruz Laitón**. Número de clasificación: QP32357. Universidad Industrial de Santander. Año:2017.
- DESARROLLO DE NUEVOS PEPTIDOS SINTETICOS NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN LACTOFERRINA CON POTENCIAL ANTIBIOTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM) [recurso electrónico] / Alba Nelly Johanna López Director: Rodrigo Torres Sáez; **Co-director: Jenniffer Cruz Laitón**. Número de clasificación: QP28430. Universidad Industrial de Santander. Año:2014.

- 1) Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Antimicrobial peptides: Promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), 2299-2321. doi:10.2174/0929867321666140217110155

Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms

J. Cruz¹, C. Ortiz², F. Guzmán³, R. Fernández-Lafuente^{*4} and R. Torres^{*2}

¹Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia; ²Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia; ³NBC Núcleo Biotecnología Caranuma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Caranuma, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile; ⁴Departamento de Bioquímica, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP-CSIC), Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract: In the last decades, the indiscriminate use of conventional antibiotics has generated high rates of microbial resistance. This situation has increased the need for obtaining new antimicrobial compounds against infectious diseases. Among these, antimicrobial peptides (AMPs) constitute a promising alternative as therapeutic agents against various pathogenic microbes. These therapeutic agents can be isolated from different organisms, being widespread in nature and synthesized by microorganisms, plants and animals (both invertebrates and vertebrates). Additionally, AMPs are usually produced by a non-specific innate immune response. These peptides are involved in the inhibition of cell growth and in the killing of several microorganisms, such as bacteria, fungi, enveloped viruses, protozoans and other parasites. They have many interesting properties as potential antibiotics, such as relatively small sizes (below 25-30 kDa), amphipathic structures, cationic nature, and offer low probability for the generation of microbial resistance. In recent years, many novel AMPs, with very promising therapeutic properties, have been discovered. These peptides have been the base for the production of chemical analogs, which have been designed, chemically synthesized and tested *in vitro* for their antimicrobial activity. This review is focused on antibacterial (against Gram (-) and Gram (+) bacteria) and antifungal peptides, discussing action mode of AMPs, and recent advances in the study of the molecular basis of their anti-microbial activity. Finally, we emphasize on their current pharmacological development, future directions and applications of AMPs as promising antibiotics of therapeutic use for microbial infections.

Keywords: Antibacterial, antifungal, antimicrobial activity, antimicrobial peptides (AMPs), peptide structure, therapeutics.

1. INTRODUCTION

The indiscriminate use of both potent and broad-spectrum antibiotics has generated high rates of microbial resistance [1, 2]. This public health problem has been caused essentially by the exposition of pathogen microorganisms to these compounds (e.g. food and livestock industrial products) [3-5].

In general, these antimicrobial agents are often classified according to their main mechanism of action. These mechanisms include: interference on cell wall synthesis, inhibition of protein synthesis or metabolic pathways, interference with nucleic acid synthesis, and disruption of bacterial membrane structure. However, bacteria may be intrinsically resistant to different types of antimicrobial agents, or acquire this resistance via *de novo* gene mutation and enzymatic activation, or by genes transferred from others microorganisms via mobile genetic elements (e.g. plasmids or transposons) [6].

This situation has spurred the interest in research for obtaining new antimicrobial compounds against strains of antibiotic resistant bacteria. Antimicrobial peptides (AMPs), both natural and synthetic which possess mechanisms of antimicrobial activity that are different to those of traditional antibiotics can provide a therapeutic alternative for the treatment of infectious diseases caused by antibiotic resistant microorganisms [7]. Endogenous AMPs are ubiquitous in nature, being widely distributed in microorganisms, plants and animals [8].

They have been considered as part of the innate immunity of multicellular organisms, playing an important role in non-specific defense systems - even proposed as evolutionary effective "defense weapons" - of higher vertebrates against pathogen infections [9, 10].

In general, AMPs are relatively small (<10 kDa), characterized by their ability to fold in amphipathic conformations and their diversity in amino acid sequences and secondary structure [11, 12]. In contrast to most antibiotics, which usually target specific proteins, AMPs can act on bacterial membranes or other targets. In addition, AMPs display a broad spectrum of antimicrobial activity, being effective against both Gram positive and Gram negative bacteria,

*Address correspondence to these authors at the Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia, 28049 Madrid, Spain; Tel/Fax: 57-7-6349069; E-mail: rtorres@uis.edu.co and Departamento de Bioquímica, Instituto de Catálisis-CSIC, C/ Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, Spain; Fax: 34 91 385 4760; E-mail: rtf@icp.csic.es

2) Sanchez, A., Cruz, J., Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Torres, R., Ortiz, C., Villalonga, R., & Fernández-Lafuente, R. (2016). Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures. *RSC advance*, 6, 27329-27334.



Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 27329

Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures†

Alfredo Sanchez,^{†*} Jenifer Cruz,^{†,‡} Nazzoly Rueda,^{†,‡} Jose C. S. dos Santos,^{†,‡} Rodrigo Torres,^{‡,§} Claudia Ortiz,[†] Reynaldo Villalonga^{§¶} and Roberto Fernandez-Lafuente^{¶*}

Bovine trypsin has been immobilized on glyoxyl-agarose and two different preparations have been produced. One was reduced just after immobilization, while the other was left to continue the enzyme-support reaction. This strategy is a guarantee of the identical orientation of the enzyme regarding the support surface and the identical physical properties of the support. Then, the two preparations were submitted to inactivations under different conditions: thermal and solvent inactivations under different pH values. After drying, the structures of the different enzymes preparations were analyzed by deconvolution of the amide I region, which provides information about the secondary structure of the protein in terms of α -helices, β -sheets, β -turns and non-ordered or irregular structures. The results confirm that the structures of the different preparations were very different, suggesting that the inactivation ways were different for each enzyme preparation and dependent on the inactivation conditions. This information is very relevant for the design of strategies for enzyme stabilization, as shown by the fact that the inactivation may follow different conformational changes depending on the degree of enzyme rigidification and inactivation conditions.

Received 8th February 2016
Accepted 7th March 2016

DOI: 10.1039/c5ra03627h

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Enzymes are very interesting biocatalysts, their high activity under mild conditions, together with their high specificity and selectivity makes them a very good alternative to conventional chemistry or catalysis for complex or labile compounds, and may be a good alternative for very contaminant processes.^{1–4}

However, enzymes have a biological origin and thus some properties may not really fit the industrial requirements.⁵ Among these properties, moderate enzyme stability, necessary

in vivo to permit a rapid answer to changes in the environment, becomes one of the greater problems when they are used as industrial catalysts.^{6–8} Enzyme inactivation of a monomeric enzyme starts by some reversible conformational changes, and finally the enzyme may also suffer some chemical modifications, aggregation, etc.^{9–11} That way, most strategies to stabilize enzymes are directed to the slowdown of these initial conformational changes. Enzyme stability has been improved by genetic tools (e.g. site-directed mutagenesis,^{12,13} chemical modification^{14,15} or immobilization^{16,17}). Directed evolution is another very efficient technique to stabilize enzymes, the *in vivo* selection of the stabilized enzymes may be already performed under the desired conditions.^{18,19} Immobilization improves enzyme stability if several enzyme subunits (in multimeric proteins) are involved in the immobilization,²⁰ or if several enzyme-support bonds are established increasing enzyme rigidity.^{21,22} This last fact increases the enzyme global rigidity and that way reduces the conformational changes, sometimes without reductions on enzyme activity. Considering that immobilization is required to facilitate enzyme recovery and reuse in many of the industrial uses of enzymes as biocatalysts,^{23–25} a great effort has been paid to couple immobilization to the solution of other enzyme limitations, no reducing this effector to the improvement of the enzyme stability, but also to tune enzyme selectivity, specificity or resistance to inhibitors^{26–28} or enzyme purification.²⁹

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: nollakol@quimica.ucm.es

†Departamento de Bioquímica, Instituto de Químico-CRC, C/Monte Coto 2, Campus IJM-CRC, Ginebra, 8009 Madrid, Spain. E-mail: jf@quimico.es

‡Escuela de Química, Grupo de Investigación en Biotecnología y Microbiología (GIBM), Edificio Corde Torres 210, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

§Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Integração Internacional de Lusofonia Afro-Brasileira, CEP 85241-000, Araçuaí, CE, Brazil

¶Current address: Laboratorio de Biotecnología, Instituto Colombiano del Petróleo-Ecopetrol, Pasto, Bucaramanga, Colombia

¶Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

† Electronic supplementary information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c5ra03627h

‡ Both authors have evenly contributed to this paper.

3) Gutiérrez, J. A., Cruz, J., Rondón, P., Jones, N., & Ortiz, C. (2016). Small gold nanocomposites obtained in reverse micelles as nanoreactors. Effect of surfactant, optical properties and activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *New Journal Chemistry*, 40, 10432-10439.



NJC

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2016, 40, 10432

Small gold nanocomposites obtained in reverse micelles as nanoreactors. Effect of surfactant, optical properties and activity against *Pseudomonas aeruginosa*

Jorge A. Gutiérrez,^{1*} Jennifer Cruz,² Paola Rondón,² Nathalia Jones² and Claudia Ortiz^{1*}

In this work, we report the formation of small gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with a synthetic antimicrobial peptide (AMP) using cysteine as a linker in order to enhance its bactericidal activity. We evaluated the effect of two different nanoreactors and their inter-droplet interactions to form small and monodispersed AuNPs. The systems used as nanoreactors were Tergitol and sodium 1,4-bis(2-ethylhexylsulfosuccinate) (AOT) reverse micelles (RMs) in toluene. As a result of this work, we obtained spherical, monodispersed and small (2–6 nm) gold nanoparticles with intense surface plasmon resonance (SPR), and by ‘seeded growth’, we found medium gold clusters that were determined by fluorescence emission at different excitation wavelengths. The nanoparticles obtained were linked with the AMP, forming AuNP–AMP nanocomposites showing an excellent minimum bactericidal concentration (MBC) against *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic bacterium that affects several populations around the world. Thus, our results offer possible alternatives for new clinical products, such as antibacterial fabrics and bandages loaded with AMPs through a metal matrix.

Received in Montpellier, France
23rd July 2016
Accepted 25th October 2016
DOI: 10.1039/C6NJ02599F

www.rsc.org/njc

Introduction

The design of nanoparticle (NP) systems for medical uses involves considerations of the intrinsic properties of the base material. The success of any NP system relies on its biological stability in different environments along with its size, shape and surface properties. All physicochemical properties are tailored for a variety of therapeutic, imaging, and diagnostic modalities,^{1,2} and one of the most interesting challenges is to incorporate inorganic NPs such as gold into liposomes, micelles or dendrimers, increasing the scope of the future applications of inorganic nanocomposites.³

Metal nanomaterials can be applied in almost all fields of science, particularly in medicine, where they are being actively investigated because of their importance in alternative therapy and effective diagnosis.⁴ Gold nanoparticles (AuNPs) are one of the most interesting nanomaterials due to their exceptional chemical stability, catalytic activity, processability and metallic nature, which provide unique size-dependent optical and electronic properties.⁵ Given the depth of customization and

complexity of configurations, the synthesis of NPs is not trivial. The synthesis of AuNPs with accurate shape and size control is a key stage in the functionality of materials at the nanoscale.^{6,8} In this sense, an effective and versatile method to do that involves reverse microemulsions, specifically reverse micelles (RMs).

RMs are organized systems, generally described as nanosized water droplets dispersed in a nonpolar solvent with the aid of a surfactant monolayer, which are thermodynamically stable and optically transparent.^{9,8} In general, these are formed by an ionic,⁹ cationic,¹⁰ and non-ionic surfactants,¹¹ and ionic liquids.¹² However, one of the most available and easily handled is sodium 1,4-bis(2-ethylhexylsulfosuccinate) (AOT), which is soluble in several organic solvents.¹³ Using this methodology to form NPs, the possibilities to link molecules on the metal surface and their applications increase. In this sense, several authors have proposed novel AuNPs coated with biocompatible compounds such as proteins, peptides and amino acids as an alternative to enhance the affinity, stability and non-toxicity for bio-applications.^{14–16} In some cases, producing complex nanostructures with an extraordinary level of particle design obtain interesting results.¹⁷

As mentioned before, some studies showed that the physicochemical properties of nanoparticles such as the zeta-potential, shape, size and chemical composition play a key role in specific

¹ Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Ciu. 25700-00 (CIBARRIO), Bucaramanga, Colombia. E-mail: jgutierrez@uis.edu.co
² Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Ciu. 25700-00-00 (CIBARRIO), Bucaramanga, Colombia. E-mail: ortizc@uis.edu.co

4) Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. (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, 135102-135112.

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)

J Cruz^{1,4,5}, J Flórez^{1,4,5}, R Torres¹, M Urquiza^{1,4}, J A Gutiérrez¹, F Guzmán² and C C Ortiz³

¹ Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Cm 27 # calle 9 (CP60002) Bucaramanga, Colombia

² NRC Nicolás Biotecnología Casanova, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Casanova, Av. Universidad 330, Valparaíso, Chile

³ Escuela de Microbiología y Biotecnología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Cm. 32 N° 24-31 (CP60002) Bucaramanga, Colombia

⁴ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Cm 30 # 4503, 111321 Bogotá, Colombia

E-mail: ortizc@uis.edu.co and marianacortezana@yahoo.com

Received 28 September 2016, revised 17 January 2017

Accepted for publication 9 February 2017

Published 7 March 2017



CrossMark

Abstract

Nanocarrier systems are currently being developed for peptide, protein and gene delivery to protect them in the blood circulation and in the gastrointestinal tract. Polylactic acid (PLA) and poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles loaded with a new antimicrobial GHBM-P539K peptide were obtained by the double emulsion solvent extraction/evaporation method. PLA- and PLGA-NPs were spherical with sizes between 300 and 400 nm for PLA and 200 and 300 nm for PLGA and ζ-potentials between -0.3 polydispersity index as determined by dynamic light scattering and scanning electron microscopy, having the zeta potential of >20 mV. The peptide-loading efficiency of PLA-NP and PLGA-NPs was 75% and 25%, respectively. PLA- and PLGA-NPs released around 50% of this peptide over 8 h. In 10% human sera the size of peptide loaded PLA- and PLGA-NPs increased between 25.2% and 39.3%, the PDI changed from 3.2 to 5.1 and the surface charge from -7.15 to 14.6 mV. Both peptide loaded PLA- and PLGA-NPs at 0.5 μ M peptide concentration inhibited the growth of *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). In contrast, free peptide inhibited at 10 μ M but did not inhibit at 0.5 and 1 μ M. These PLA- and PLGA-NPs presented <math><10\%</math> hemolysis indicating that they are hemocompatible and promising for delivery and protection system of GHBM-P539K peptide.

Supplementary material for this article is available online.

⁵ These authors contributed equally to this work.

- 1) López A, Cruz J, Ortiz C, Torres R. Síntesis de péptidos antimicrobianos basados en Lactoferrina con potencial antimicrobiano frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. Primer Congreso Colombiano de bioquímica y Biología Molecular (C2B2) 2014. Bogotá-Colombia.

Primer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular

C2B2 2014

SI. Bioquímica y Biología Molecular en Salud Humana y Animal

Síntesis de péptidos antimicrobianos basados en lactoferrina con potencial antimicrobiano frente a *Escherichia coli* O157:h7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina

López A¹, Cruz J¹, Ortiz C¹, Torres R^{1*}

¹Escuela de Química, Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

²Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, GIBIM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

La Lactoferrina (Lf) es una glicoproteína multifuncional que presenta propiedades antimicrobianas frente a un amplio rango de microorganismos y actúa por diversos mecanismos de acción mediante los cuales puede defender a los mamíferos de las infecciones microbianas. Por lo anterior, en este trabajo de investigación se diseñaron seis péptidos sintéticos con potencial antimicrobiano basados en la aplicación de herramientas de bioinformática tales como: i) "Design and Prediction Antimicrobial Peptide" (DEPRAMS, por sus siglas en inglés), ii) ClustalW y iii) CPH models, entre otras. Además, los péptidos antimicrobianos (PAMs) diseñados se sintetizaron en fase sólida por la técnica F-moc (linker 4MBH), incluyendo diferentes modificaciones en su estructura primaria, las cuales fueron denominadas como LA1 a LA6. Los PAMs se purificaron por Cromatografía líquida de alta eficiencia ((HPLC), por sus siglas en inglés), obteniendo péptidos con un 95% de pureza. Estos péptidos mostraron una estructura secundaria alfa hélice (α -hélice) de acuerdo con sus espectros de Dicroísmo Circular (DC). La estructura primaria de los PAMs fue caracterizada por Espectrometría de masas con Desorción/Ionización con Láser Asistida por una matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-TOF, por sus siglas en inglés). Posteriormente, los péptidos sintéticos fueron evaluados frente a las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* O157:H7 que han desarrollado resistencia microbiana a los antibióticos convencionales. En general, los PAMs demostraron propiedades inhibitorias frente a las bacterias patógenas. Sin embargo, el PAM LA1 no reportó actividad antibacteriana significativa dentro del rango de concentraciones realizadas. Los PAMs LA2, LA3 y LA6 presentaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 50 μ M frente a SARM. Los PAMs LA4, LA5 y LA6 fueron más efectivos frente a *Escherichia coli* O157:H7, con concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 25 y 100 μ M. Las actividades antibacterianas se realizaron por el método de microdilución en caldo tomando como control positivo bacterias patógenas en ausencia de los PAMs. Estos PAMs se proponen como una alternativa terapéutica para las infecciones causadas por SARM y *E. coli* O157:H7 que se podrían desarrollar y aplicar como antibióticos por sistemas de liberación controlada.

Palabras clave: Lactoferrina, Péptidos antimicrobianos, Librería de péptidos, Metodología F-moc

E-mail: rtorres@uis.edu.co

72

2) Cruz J, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Study of the antiparasitary activity of new synthetic peptides against *Leishmania sp.* 31st Latin American Chemistry Congress. CLAQ 2014. Lima-Perú.



31 Congreso Latinoamericano de Química
CLAQ-2014
XXVII Congreso Peruano de Química
Octubre 14-17, 2014 Hotel Sheraton, Lima- Perú
"Latinoamérica unida por la química sostenible"



RESUMEN

Estudio de la actividad antiparasitaria de nuevos péptidos sintéticos contra <i>Leishmania sp.</i> Study of the antiparasitary activity of new synthetic peptides against <i>Leishmania sp.</i>	
Jennifer Cruz¹, Claudia C. Ortiz², Fanny Guzmán³, Roberto Fernández-Lafuente⁴, Luis Rivas⁵, María Ángeles Abengózar⁶ and Rodrigo G. Torres^{1*}	
¹ Escuela de Química, Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia. ² Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia. ³ NBC Núcleo Biotecnología Curauama, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauama, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile. ⁴ Departamento de Biotecnología, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC Cantoblanco, Madrid, España. ⁵ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España.	rtorres@uis.edu.co jecruza86@gmail.com
Área temática: Bioquímica	
<p>La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica en el mundo. Más de 350 millones de personas en 88 países se encuentran en riesgo de infección a causa de esta enfermedad tropical desatendida. Además, no existen vacunas eficaces disponibles contra la leishmaniasis, y el control de la enfermedad se basa exclusivamente en los tratamientos terapéuticos con fármacos tóxicos, algunos de los cuales fueron desarrollados en la década de 1940. Como la resistencia del parásito se vuelve más frecuente, existe una creciente preocupación de que los fármacos que se utilizan actualmente pronto se convertirán en tratamientos ineficaces. En consecuencia, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas clases de compuestos que sean activos contra cepas resistentes a los medicamentos de <i>Leishmania (L.)</i> (Marr y col., 2012).</p> <p>En este contexto, los Péptidos Antimicrobianos (PAM) son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata de los organismos. La anfipaticidad de los péptidos les permite interactuar con las membranas cargadas negativamente, causando la directa desestabilización de la superficie de las membranas con formación de poros y posterior lisis de la célula. Debido a todas estas propiedades es que se han iniciado estudios considerando la posibilidad de utilizar esta clase de moléculas como nuevos fármacos en diferentes tipos de enfermedades infecciosas y, en particular, en el tratamiento de la Leishmaniasis, sustentados en el amplio espectro antimicrobiano que presentan los PAMs (Torrent y col., 2012).</p> <p>En este estudio, se sintetizaron 18 PAM (P1 a P18) y se evaluó su efecto sobre hematies y actividad antileishmanial en promastigotes de <i>L. donovani</i> y amastigotes de <i>L. pifanoi</i>. Los PAM fueron más efectivos sobre la forma de amastigotes con valores de EC₅₀ entre 7.8 y 50 µM y LC₅₀ entre 0.45 y 5.7 µM. En la forma promastigotes sólo el PAM P17 presentó un efecto leishmanicida considerable a largo plazo (72 h), con un valor del 10% de células viables. La actividad hemolítica de todos los PAM fue mayor a 50 µM para todos los casos. El mecanismo de acción de los PAM se evaluó usando las sondas de Sytox Green y Bisoxonol y se observó que todos los PAMs, a excepción del P10, causaron permeabilización de la membrana plasmática del promastigote y del amastigote. Adicionalmente, se evaluó también la concentración de ATP intracelular en promastigotes de <i>L. donovani</i> 3-Luc tras la adición de diferentes concentraciones de péptido. La disminución de luminiscencia fue dependiente de la concentración de péptido. Por último, se determinó la citotoxicidad de los PAM en macrófagos peritoneales, donde el P6 se destacó por presentar un 100% de células viables a 5 µM. En consecuencia, a partir de este estudio proponemos cinco PAM como prometedores candidatos leishmanicidas.</p>	
<small>Los autores deseamos agradecer al Instituto de Salud Carlos III de España por el financiamiento de los proyectos FIS PI13-01706 y RD 13/0018-0007, MINECO CTQ2013-41507-E de España, Viceconsejería de Investigación y Innovación (VIEI) de la Universidad Industrial de Santander y Colciencias de Colombia por el proyecto mismo 1182-5453-1871. Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L., Andrau, D. (2012) Antimicrobial peptide action on parasites. <i>Curr Drug Targets</i>. 13(9):1138-47 Marr, A.K., McGwire, B.S., McMaster, W.R. (2012) Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. <i>Future Microbiol.</i> 7(9):1047-59.</small>	
Sociedad Química del Perú Av. Nicolás de Arriabar 696 Santa Beatriz- Lima 01 Teléfono: (511) 4723925 e-mail: sgperu@gmail.com www.sgperu.org.pe	

3) Cruz J, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Síntesis, caracterización y evaluación antimicrobiana de péptidos sintéticos diseñados frente a *Escherichia coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM). 31st Latin American Chemistry Congress. CLAQ 2014. Lima-Perú.



31 Congreso Latinoamericano de Química
 CLAQ-2014
 XXVII Congreso Peruano de Química
 Octubre 14-17, 2014 Hotel Sheraton, Lima- Perú
 "Latinoamérica unida por la química sostenible"



RESUMEN

Síntesis, caracterización y evaluación antimicrobiana de péptidos sintéticos diseñados frente a *Escherichia coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM).

Synthesis, characterization and evaluation of synthetic antimicrobial peptides designed against *Escherichia coli* 0157: H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Jennifer Cruz^a, Claudia C. Ortiz^b, Fanny Guzmán^c, Roberto Fernández-Lafuente^d, Luis Rivas^e, María Angeles Abengózar^f and Rodrigo G. Torres^g.

^aEscuela de Química, Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia.

^bEscuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) Universidad Industrial de Santander, Edificio Camilo Torres 202, Bucaramanga, Colombia.

^cNBC Núcleo Biotecnología Curama, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curama, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile.

^dDepartamento de Biocatálisis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC Cantoblanco, Madrid, España.

^eCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España.

rtorres@uis.edu.co
jecruia86@gmail.com

Área temática: Bioquímica

Actualmente, existe un gran interés por desarrollar nuevos antibióticos frente a bacterias patógenas. Esto se debe, esencialmente, a la creciente resistencia bacteriana. Por esta razón, en las últimas décadas, ha surgido la necesidad de obtener nuevos compuestos antimicrobianos efectivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta prevalencia e infecciones sistémicas de difícil manejo terapéutico (Xu, Flavin, y Flavin, 2014). Recientemente, los péptidos antimicrobianos (PAM) obtenidos sintéticamente han surgido como una alternativa promisoriosa para el tratamiento de infecciones microbianas y muestran propiedades multifuncionales con implicaciones como agentes terapéuticos (Cruz y col., 2014).

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se llevó a cabo el diseño y síntesis de una serie de 18 péptidos con potencial actividad antibiótica. Inicialmente, se estudió la estructura de los PAM utilizando herramientas de bioinformática como: *i)* "Design and Prediction Antimicrobial Peptides" (DEPRAMS, por sus siglas en inglés), *ii)* ClustalW y *iii)* CPH models, entre otras, para determinar los residuos importantes asociados a la actividad antimicrobiana. Posteriormente, se sintetizaron nuevas secuencias peptídicas en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Los PAM fueron denominados como P1 a P18. Las secuencias bases y los análogos sintéticos se obtuvieron con una pureza del 95% y un perfil típico de α -hélice, de acuerdo con los espectros de dicroísmo circular (CD). Además, la estructura primaria de los PAM fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

La actividad de los PAM fue evaluada en cepas patógenas de *Escherichia coli* 0157:H7 (*E. coli* 0157:H7) y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) y se obtuvieron valores de 1.5 y 2.5 μ M para el péptido P17, respectivamente. La hemólisis de los PAM frente a eritrocitos de camero en todos los ensayos no superó el 40%. Además, el mecanismo de acción de los PAM fue estudiada con la sonda aniónica de Sytox-Green, con la cual se demostró que, en general, la formación de poros transmembrana de los PAM es la forma de actuación más común, excepto para el PAM P10. Finalmente, pensamos que estos PAM pueden proponerse como una alternativa terapéutica para las infecciones causadas por SARM y *E. coli* 0157:H7 que se podrían desarrollar y aplicar como antibióticos por sistemas de liberación controlada.

Los autores deseamos agradecer al Instituto de Salud Carlos III de España por el financiamiento de los proyectos FIS PS12-02706 y RD12/0018/0007, MINECO CTQ2013-41507-R de España, Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander y Colciencias de Colombia por el proyecto número 1102-5453-1671.

Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R. y Torres, R. (2014). Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), 2298-321.

Xu, Z.-Q., Flavin, M. T. y Flavin, J. (2014). Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(2), 163-82.

Sociedad Química del Perú
 Av. Nicolás de Arriabar 696 Santa Beatriz- Lima 01
 Teléfono: (511) 4723925 e mail: sqperu@gmail.com
www.sqperu.org.pe

4) Cruz J, Martínez B. Y, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Antibacterial activity of Novel Bioactive Peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. 24th American Peptide Symposium (APS) 2015. Orlando-USA.

YI-P015 Antibacterial Activity of Novel Bioactive Peptides against *Pseudomonas aeruginosa*

J. Cruz^a, B.Y. Martínez^a, C. Ortiza, F. Guzmán^b, R. Fernández-Lafuente^c and R. Torres^d.

^aGrupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia; ^bNBC Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Valparaíso, Chile; ^cDepartamento de Biocatálisis. ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC Cantoblanco, Madrid, Spain

P. aeruginosa is a multidrug-resistant bacterium which has become in a serious threat to public health. The efficiency of the conventional antibiotics is decreasing as a result of resistance, therefore is essential to find new antibacterial strategies to solve this problem. Antimicrobial peptides (PAM) represent a possible alternative to fight against resistant bacterial infections. Different strategies can be used to synthesize PAM, being possible to develop new peptide sequences with better antimicrobial properties than the original PAM. In this work, we described the increase in antimicrobial activity of eighteen novel peptide hybrids with antimicrobial potential. For this purpose, the analogues were synthesized by means of solid phase chemistry using Fmoc methodology and peptides with 95% purity were obtained. The two-dimensional structures of the PAM hybrids were determined by circular dichroism (CD) and molecular modeling. Some of these analogues were compared to the native sequence, showing a significant increase in antimicrobial activity against *P. aeruginosa*. P14, P16, P17 and P18 were the most active peptides, with a MIC₉₉ of 10 µM. Finally, all peptides showed a percentage of hemolysis < 40%, indicating a low level of toxicity.

5) Pérez J, Prada Y, **Cruz J**, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Development of new synthetic peptides analogs of bovine Lfampin with antibiotic potential against *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA). 24th American Peptide Symposium (APS) 2015. Orlando-USA.

YI-P016 Development Of New Synthetic Peptides Analogs of Bovine Lfampin With Antibiotic Potential Against *Escherichia Coli* O157:H7 and *Staphylococcus Aureus* Methicillin-Resistant (Mrsa)

J. Perez^a, Y. Prada^a, J. Cruz^a, C. Ortiz^a, F. Guzmán^b, R. Fernández-Lafuente^c and R. Torres^a

^aGrupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia; ^bNBC Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Valparaíso, Chile; ^cDepartamento de Biocatálisis. ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC Cantoblanco, Madrid

Increased prevalence of antibiotic-resistant bacteria has become a major threat to health sector worldwide due to their virulence, limited therapeutic options, and distribution at both hospital and community settings. Discovery and development of new agents to combat antibiotic-resistant bacteria is thus urgently needed. Therefore, this study aimed to evaluate the potential antimicrobial activity of five peptides against pathogenic bacteria *E. coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA). Initially, the sequence of LFamp B was compared with different proteins belonging to the transferrin family. Subsequently, LFamp B 265-284 and four of its analog peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS). The purity of the peptides was around 90% and they showed a typical α -helix configuration, as revealed by circular dichroism spectra (DC). Peptide concentrations used were in the range from 0.5 to 100 μ M. The A4 LFamp B analog peptide was the most active against both *E. coli* O157: H7 and MRSA strains. The MIC₅₀ of A4 analog was 52 μ M against MRSA and 77 μ M against *E. coli* O157: H7.

6) **Cruz J**, Florez J, Gutiérrez J, Ortiz C, Guzmán F, Urquiza M, Torres R. Nanoencapsulation of novel synthetic peptide in PLGA and its antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 7th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine. Bionanomed 2016. Krems-Austria.

Nanomaterials for Biomedical Applications

1.5% (w/w) phosphatidylcholine (PC) and 5% (w/w) soybean oil in the aqueous phase using a Microfluidizer[®] processor. By varying process conditions, liposomes with sizes in the range of 150-206 nm (D50) were obtained. All samples were then passed through 0.2 micron-rated filters manufactured by Pall Life Sciences and filtration flux and throughput were studied. Results revealed the correlations between the droplet size, filtration throughput and average filtration flux. In conclusion, liposome particle size and size distribution can be precisely controlled by adjusting process conditions. When pairing the optimum vesicle size with selected membrane filters, high post process filtration efficiency can be achieved.

Keywords

Liposome, Drug delivery, Microfluidizer Processor, Post Process Filtration

P30

Nanoencapsulation of novel synthetic peptide in PLGA and its antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Cruz (1)*, J. Florez (1), J. Gutiérrez (1), C. Ortiz (2)*, F. Guzmán (3), M. Urquiza (1), and R. Torres (4)

(1) Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Cra. 27 Cl. 9, Bucaramanga, Colombia.
(2) Escuela de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

(3) NBC Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile.

(4) Instituto Colombiano de Petróleo ICP, Km 7 autopista a Piedecuesta, Santander, Colombia.

* Corresponding author: jecrula86@gmail.com, ortizc@uis.edu.co

Nanocarriers are one of the most useful tools to achieve targeted delivery of therapeutic proteins and peptides. Diversity of nanocarriers for the delivery of peptides, proteins, and genes have been developed due to its ability to protect these molecules from degradation in the gastrointestinal track and in the bloodstream. Particularly peptides, which have emerged as a very interesting alternative to be used as antimicrobial compounds are very susceptible to this degradation. Therefore it has been proposed the use of different nanocarriers as protective agents and to facilitate its delivery of peptides in humans [1]. In this work, the GIBIM-P559K synthetic peptide, which is an antimicrobial peptide, was encapsulated in PLGA nanoparticles by double emulsion solvent extraction/evaporation method with encapsulation efficiency around 55.3%. The average particle size, expressed as standard deviation, was 225.8 ± 3.5 nm (Fig.1). PLGA nanospheres loaded with GIBIM-P559K showed a MIC against *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria of 75 and 25 μ M, respectively. Non loaded nanoparticles and PEI did not present any antimicrobial effect. This work shows an interesting type of nanocomposites which could be considered as promising alternative to deliver peptides against infectious diseases caused by these microorganisms.

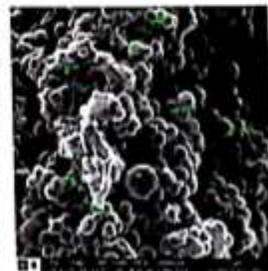


Fig.1. PLGA-GIBIM-P559K nanoparticles

Reference

[1] .Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. Journal of Controlled Release 161, 2(2012) 505-22.

7) Cruz J, Florez J, Gutiérrez J, Ortiz C, Guzmán F, Urquiza M, Torres R. Synthesis and evaluation of polylactic acid nanoparticles loaded with a new synthetic peptide against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 7th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine. Bionanomed 2016. Krems-Austria.

Nanomaterials for Biomedical Applications

P31

Synthesis and evaluation of polylactic acid nanoparticles loaded with a new synthetic peptide against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

J. Flórez, J. Cruz (1), J. Gutiérrez (1)*, C. C. Ortiz (2)*, F. Guzmán (3), M. Urquiza (1), R. and R. G. Torres (4)

(1) Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Cra 27 Cl. 9, Bucaramanga, Colombia.
(2) Escuela de Microbiología y Bioanálisis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

(3) NBC Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile.

(4) Instituto Colombiano de petróleo ICP, Km 7 autopista a Piedecuesta Santander, Colombia

* Corresponding author: ortizc@uis.edu.co, jorgeagc@uis.edu.co

The high proportions of antibiotic resistant bacteria, causing common world wide infections (e.g. urinary tract infections, pneumonia, bloodstream infections) and the high percentage of hospital-acquired infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or multidrug-resistant Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* are two of the major health problems. Antimicrobial peptide nanoencapsulation is a powerful tool for delivering these molecules at specific sites in humans; this nanotechnology generates subcellular size particles having improved bioavailability that allows oral administration, release at specific sites, is biocompatible with cells and tissues and protect these peptides from protease attack, [1]. The antimicrobial GIBIM-P5S9K synthetic peptide was encapsulated in polylactic acid nanoparticles using the double emulsion- solvent evaporation technique. These nanoparticles presented peptide encapsulation efficiency around 75%, and had diameters lower than 270 nm and displayed positive surface charge (until 30mV) as determined by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Additionally, the minimum inhibitory concentration (MIC) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* was 75 μ M. In conclusion, the use of PLA-NPs as peptide carriers is a promising alternative to counteract diseases caused by microorganisms and to develop novel drugs or enhance actual therapies.

References

[1] Atyabi, F., Talaie, F., Dinarvand, R. Journal Nanoscience and Nanotechnology (2009), 9 4593-603.

8) Bautista Y, Correa S, **Cruz J**, Guzmán F, Ortiz C, Urquiza M. Efecto de la estructura α -hélice anfipática en el diseño de péptidos antimicrobianos. Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2) 2016 Medellín-Colombia.

Efecto de la estructura α -hélice anfipática en el diseño de péptidos antimicrobianos (PAMs)

Bautista Y^{1*}, Correa S^{2*}, Guzman F^{3*}, Cruz J^{1*}, Ortiz C^{1*}, Urquiza M^{4*}

¹Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.

²Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander.

³Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander.

⁴Programa de tiempo de volver Colciencias.

^{*}Grupo de Investigación en Microbiología y Bioquímica GIBIM.

^{*}Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica De Valparaíso, Chile.

El diseño de péptidos antimicrobianos (PAMs) ha surgido como una alternativa promisoriosa contra bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, debido a sus múltiples mecanismos de acción, actividad de amplio espectro y bajo potencial de resistencia. A partir de una región de la proteína Cardiolipina sintasa B, derivada de la bacteria *Actinomyces* ϕ , se diseñó el péptido 19. Este péptido según el programa "Agadir" presenta una helicidad de 5.2, que en teoría podría formar una α -hélice anfipática estable. Las características fisicoquímicas del péptido son ideales para insertarse en la membrana bacteriana, formando poros que permitirían la salida del material intracelular, ocasionando la muerte celular, de hecho este péptido presentó actividad antimicrobiana y hemolítica. A partir del péptido se diseñaron siete análogos en los cuales algunos aminoácidos de la secuencia se cambiaron por Ala, Pro o Cys con el fin de modificar la entropía configuracional del péptido original y la helicidad de acuerdo con el programa "Agadir". Los péptidos diseñados fueron sintetizados en fase sólida usando la metodología F-MOC y caracterizados mediante HPLC, espectrometría de masas y dicroísmo circular. Posteriormente fue evaluado el efecto antimicrobiano de los péptidos, a diferentes concentraciones, contra las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* mediante seguimiento de la cinética de crecimiento, usando el método de microdilución en caldo y determinando la densidad óptica a 595 nm. Finalmente se evaluó el efecto sobre la membrana eucariota a través de actividad hemolítica del eritrocito. Se encontró que el MIC₅₀ del péptido 19, 22 y 23 (que presentan sustituciones por Cisteínas en la secuencia) fue de 16 μ M. A su vez, los péptidos 22 y 23 presentaron 14% y 10% de actividad hemolítica respectivamente hasta 128 μ M. El péptido 20 en el que se sustituyen algunas Alaninas por Prolinas para desestabilizar la hélice no presenta actividad antimicrobiana a 50 μ M. El péptido 21 en el cual se cambió la cisteína 5 por Serina de la secuencia original no presentó actividad antimicrobiana. En conclusión, la tendencia de estos péptidos a formar α -hélices anfipáticas estables está asociada con su actividad antimicrobiana; la especificidad sobre la membrana bacteriana depende en gran medida de la presencia de una Cisteína en la posición 5, y la otra Cisteína en posición 9.

Palabras clave: PAMs, entropía configuracional, actividad antimicrobiana, estructura secundaria α -hélice.
E-mail: ortizc@uis.edu.co

Referencias

1. Ludovico, M. Felicio, M & Franco, O. (2016) *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1858, 1488-1498.
2. Urquiza, M. Guevara, T & Patarroyo E. (2012) *Amino acids*, 42, 2165-2175.
3. Cruz, J. Ortiz, C. & Torres, R. (2014) *Current Medicinal Chemistry*, 21, 2299-2321.