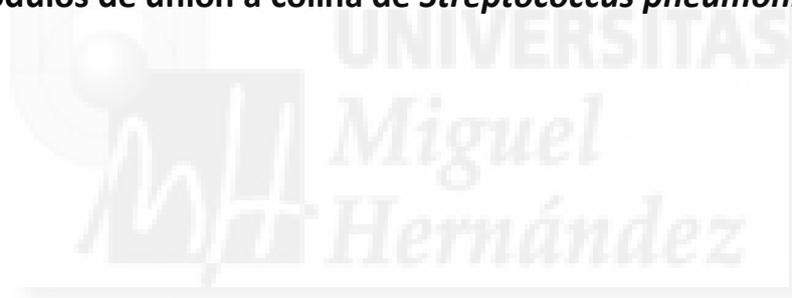


Universidad Miguel Hernández
Instituto de Biología Molecular y Celular
Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Caracterización de la estructura y el plegamiento de
módulos de unión a colina de *Streptococcus pneumoniae***



Adrián Román Sarmiento

Tutor: Jesús Miguel Sanz Morales

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales
Curso académico 2016 - 2017

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La resistencia a antibióticos tradicionales es un problema cada vez más grave que puede llevar a una situación en la cual no existan terapias efectivas frente a enfermedades infecciosas comunes. *Streptococcus pneumoniae* no es una excepción, el número de cepas resistentes a antibióticos de esta bacteria está en aumento. Este hecho, sumado a la alta mortalidad que causan las enfermedades neumocócicas en la actualidad, hace necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra esta bacteria

Las proteínas de la superficie de *S. pneumoniae* constituyen un atractivo blanco de antimicrobianos. Dentro de este grupo destacamos las proteínas de unión a colina (CBPs) comunes a todas las cepas que desempeñan papeles fisiológicos importantes. Previamente, el grupo ha identificado que tanto los ésteres de aminas bicíclicas (EBAs) como los péptidos derivados de las repeticiones de unión a colina que forman las CBPs, alteran el crecimiento normal de la bacteria.

Se han estudiado posibles sinergias en el uso combinado de EBAs y péptidos derivados de CBPs, caracterizando posibles efectos en el crecimiento en cultivos planctónicos, descenso en la viabilidad y alteraciones en la morfología de *S. pneumoniae*.

PALABRAS CLAVE (5): neumococo, proteínas de unión a colina, antimicrobianos, EBAs, péptidos derivados de CBRs.

Antimicrobial resistance to traditional antibiotics is a first-order problem that can lead to a situation in which there are no longer effective therapies against common infective diseases. As for *Streptococcus pneumoniae*, the number of antibiotic-resistant strains is on the increase. This fact, added to the high mortality of the pneumococcal infections nowadays, makes necessary the development of new antimicrobials against this bacterium.

A common target to all strains are the choline-binding proteins (CBPs). As they are involved in crucial functions for the bacterium, they could be an interesting new approach for the design of new antimicrobials. Previously, the group has separately identified esters of bicyclic amines and choline-binding repeats derivate peptides from CBPs as an agents capable of affect normal growth of the bacterium.

Possible synergies between different combinations of EBAs and CBP-derivate peptides have been studied, characterizing possible effects on the growth, viability and morphology of *S. pneumoniae*.

KEYWORDS (5): pneumococcus, choline-binding proteins, antimicrobials, EBAs, CBR peptides

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	4
1.2. Estructura de la superficie del neumococo	4
1.3. Proteínas de unión a colina	5
1.4. Proteína de unión a colina LytA.....	7
1.5. Péptidos derivados de LytA	8
1.6. Ésteres de aminas bicíclicas.....	8
2. OBJETIVOS	9
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	10
3.1. Métodos generales	10
3.1.1. Preparación del medio de cultivo C+Y	10
3.1.2. Preparación del medio de cultivo agar sangre.....	11
3.2. Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
3.3. Seguimiento de la curva de crecimiento	11
3.4. Recuento de viables.....	11
3.5. Ensayo de actividad bacteriolítica/bactericida en <i>resting cells</i>	11
3.6. Solubilización y preparación de EBAs	12
3.7. Preparación de péptidos.....	13
3.8. Toma de muestras y visualización en microscopio óptico y confocal	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. EBA 31	14
4.2. EBA 27	22
4.3. EBA 18	26
4.4. Ensayo de viabilidad mediante el método de <i>resting cells</i>	30
4.4.1. EBA31, EBA27 y EBA18	30
4.4.2. EBAs 31 y 27 con P3B y P3C.....	32
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, conocido como neumococo, es una bacteria Gram-positiva patógena de humanos, responsable de enfermedades potencialmente mortales como meningitis, septicemia y neumonía, siendo el principal patógeno causante de neumonía adquirida en la comunidad (Blasi y cols., 2012). Las enfermedades neumocócicas causan más de 1.6 millones de muertes anuales (OMS, 2007), por lo que es, junto a la desnutrición, una de las mayores causas de mortalidad infantil en el mundo (UNICEF, 2006).

A pesar de los esfuerzos en estrategias de vacunación, las vacunas actuales sólo son capaces de cubrir una pequeña parte de los más de 90 serotipos distintos de neumococo (Weil-Olivier y cols., 2012). Además, el reemplazo de serotipo lleva a que a medio plazo aumente la incidencia de otros no cubiertos (Alexandre y cols., 2010).

Por otro lado, la terapia antibiótica se encuentra con un problema cada vez mayor: la disminución en el ritmo de descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos desde los años 60, sumado a la aparición de cepas resistentes a antibióticos (Coates y cols., 2011). Esto ha supuesto que hasta un 50% de bacterias *S. pneumoniae* aisladas en el sur de Europa no sean susceptibles a penicilina (Albrich y cols., 2004).

En este contexto, queda patente la necesidad de desarrollar nuevos antimicrobianos para *S. pneumoniae* cuya diana sea específica y común a todos los serotipos, lo que dificultaría la aparición posibles cepas resistentes.

1.2. Estructura de la superficie del neumococo

La pared *S. pneumoniae* consta de varias capas de peptidoglicano que contiene numerosos ácidos teicoicos. Estos polímeros están formados por glúcidos y otras biomoléculas, donde destacan dos N-acetilgalactosaminas que pueden estar modificadas con fosfocolina (Karlsson y cols., 1999). Estas fosfocolinas de los ácidos teicoicos están involucradas en diversas funciones fisiológicas (Hakenbeck y cols., 2009). Además, la pared celular de neumococo contiene diversas proteínas de superficie que contribuyen a la interacción del patógeno con el huésped (**Figura 1**). Una de las familias más destacadas son las proteínas de unión a colina (*choline binding proteins*, CBPs), que como su nombre indica, son capaces de interactuar con las fosfocolinas de los ácidos teicoicos antes mencionadas.

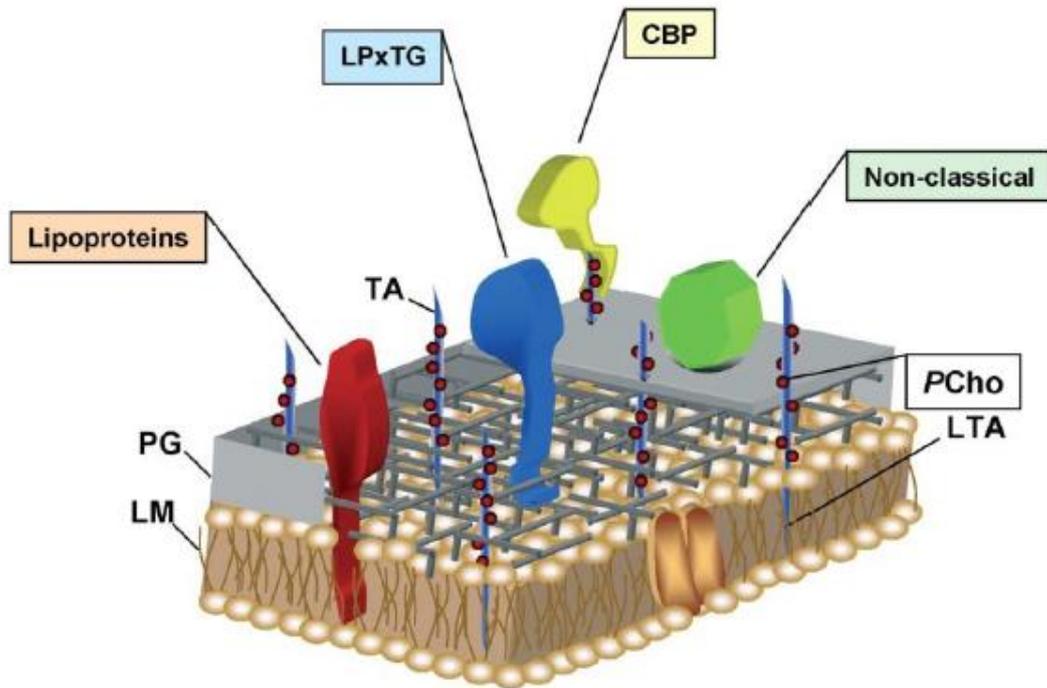


Figura 1. Estructura de la superficie de *Streptococcus pneumoniae*. La pared celular está formada por una membrana lipídica (LM), peptidoglicano (PG), ácidos teicoicos (TA) y ácidos lipoteicoicos (LTA). La fosfocolina (PCho) está unida a estos ácidos y sirve de anclaje a las CBPs (Bergmann y Hammerschmidt, 2006) (imagen modificada).

1.3. Proteínas de unión a colina

Las CBPs aparecen en todas las cepas de neumococo. Están formadas por dos módulos: un módulo funcional (*functional module*, FM) y un módulo de unión a colina altamente conservado (*choline-binding module*, CBMs) (**Figura 2A**) (Maestro y Sanz, 2016). A su vez, los CBMs están constituidos por repeticiones cortas en tándem de unos 20 residuos, llamadas repeticiones de unión a colina (*choline-binding repeats*, CBRs). Las repeticiones de unión a colina son ricas en aminoácidos aromáticos, que estructuralmente forman una horquilla β de unos 14 aa seguidos de un bucle de 6 o 7 residuos. Dos de estas CBRs seguidas forman los sitios de unión entre la fosfocolina y la proteína (**Figura 2B**). Esta interacción no covalente es posible gracias a los aminoácidos aromáticos mencionados, que favorecen interacciones catión- π y de Van der Waals con las colinas cargadas positivamente. (Bergmann y Hammerschmidt, 2006; Maestro y Sanz, 2016).

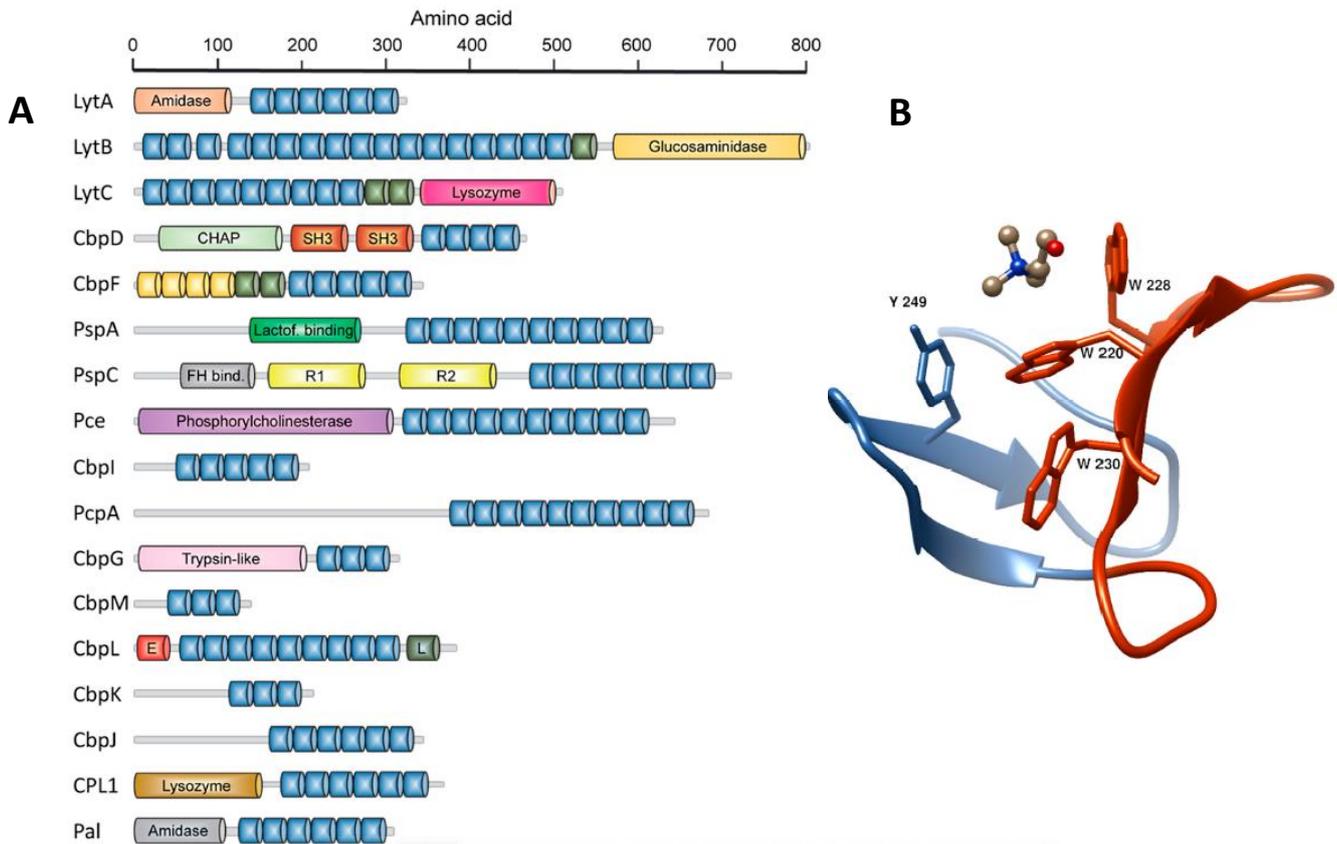


Figura 2A. Organización de los módulos de unión a colina de las CBP de neumococo. En azul se representan las repeticiones de unión a colina que configuran cada módulo. En verde, las repeticiones no conservadas y en amarillo, repeticiones incapaces de unirse a colina. La función de los módulos funcionales también está indicada. **Figura 2B.** Estructura de un sitio de unión a colina en la CBP LytA [PDB: 1GVM] mostrando dos CBRs consecutivos (en azul y en naranja) y los residuos aromáticos implicados en la unión (Maestro y Sanz, 2016).

La interacción entre las CBPs con las fosfocolinas de la pared celular posibilita el anclaje de las proteínas a la estructura macromolecular de la pared bacteriana. Esta unión está implicada en importantes funciones para la bacteria, como la adherencia a células huésped, separación de células durante la división celular, formación de biopelículas y en la autohidrólisis de la pared para provocar la liberación factores de virulencia y de material genético para transferencia horizontal (López y García, 2004; Moscoso y cols., 2006; Claverys y Havarstein, 2007). Debido a esta variedad de roles que desempeñan las CBPs, sería interesante encontrar compuestos análogos de la fosfocolina que se unan a las repeticiones de unión a colina e impidan que la bacteria lleve a cabo estas funciones.

1.4. Proteína de unión a colina LytA

La proteína LytA es la proteína de unión a colina más estudiada. Se trata de una amidasa implicada en la autohidrólisis de la pared celular al final de la fase estacionaria (Howard y Gooder, 1974). Participa en algunas de las funciones mencionadas anteriormente: liberación de factores de virulencia y de proteínas de evasión del sistema inmune del huésped, así como intervención en el fenómeno “fratricida” de liberación de material genético (Maestro y Sanz, 2016).

La estructura tridimensional de la proteína ha sido resuelta recientemente (Li y cols., 2015). La proteína está formada por un dominio amidasa encargado de la lisis y un dominio de unión a colina formado por 6 CBRs (**Figura 3A**). En presencia de colina, se forma un dímero entre dos CBMs a través de la horquilla β en el C-terminal de estas (**Figura 3B**). La dimerización es fundamental para la actividad de la proteína, ya que versiones mutadas incapaces de formar dímeros experimentan una disminución en su estabilidad y actividad (García y cols., 1994; Varea y cols., 2000). Asimismo, se conoce la secuencia de la proteína correspondientes a las horquillas β de las CBRs (**Figura 3C**).

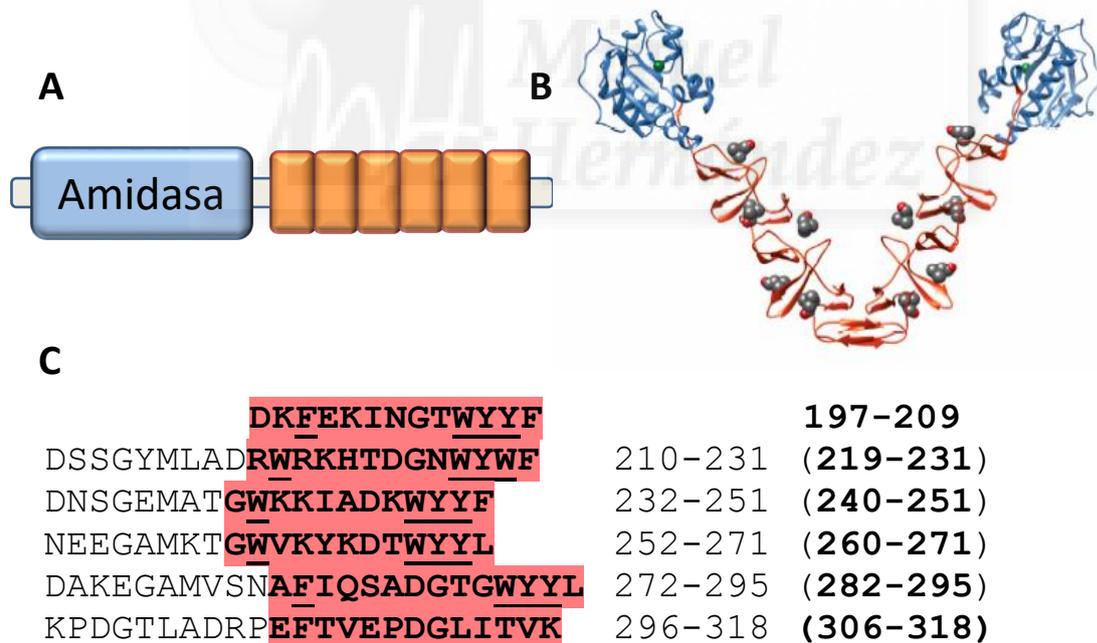


Figura 3. Estructura de la proteína de unión a colina LytA. **(A)** Representación de los módulos de LytA, en la región N-terminal (azul) se encuentra el dominio funcional; en la región C-terminal (naranja) se encuentran las 6 repeticiones de unión a colina que forman el CBM. **(B)** Estructura tridimensional de LytA [PDB: 4X36], los módulos FM y CBM se encuentran coloreados en azul y naranja respectivamente, las fosfocolinas están representadas en esferas de van der Waals. (Maestro y Sanz, 2016). **(C)** Secuencia de las repeticiones del módulo de unión a colina de LytA (proteína C-LytA). Se destaca en rojo la secuencia de las horquillas de cada una de las seis repeticiones, y los aminoácidos aromáticos conservados están subrayados; entre paréntesis, la posición de cada horquilla.

1.5. Péptidos derivados de LytA

Se conoce que el módulo de unión a colina posee una alta afinidad por la pared bacteriana, llegándose a observar que la adición de módulos de unión a colina (C-LytA y C-CPL1) de algunas CBPs son capaces de inhibir la actividad de las proteínas completas (LytA y CPL1) al impedir su unión a las fosfocolinas de los ácidos teicoicos de neumococo (Sánchez-Puelles y cols., 1990).

La búsqueda de agentes antimicrobianos de origen proteico es por tanto, una interesante estrategia. Se ha mencionado anteriormente que el CBM está formado por 6 repeticiones de unión a colina (P1-P6), todas ellas candidatas a numerosas aplicaciones biotecnológicas. El grupo ha probado recientemente con éxito la capacidad de péptidos sintéticos basados en la secuencia de la tercera repetición de unión a colina (P3) para afectar el crecimiento de *S. pneumoniae* en medio líquido, provocando cambios en la membrana celular que lleva a muerte bacteriana. Por este motivo, el uso de estos péptidos como agentes antimicrobianos aporta una nueva aproximación biotecnológica al contexto actual.

1.6. Ésteres de aminas bicíclicas

El uso de pequeñas moléculas análogas a la colina capaces de unirse a las CBR, para así inhibir la unión de las fosfocolinas de neumococo con las proteínas, es otra prometedora estrategia para interferir en el ciclo vital de la bacteria y disminuir su patogenicidad. Esto está apoyado por el hecho de que cepas con LytA inactivada presentan menor virulencia (Martner y cols., 2009). Además, como el CBM está altamente conservado, estas pequeñas moléculas afectarían simultáneamente a toda la familia de CBPs, haciendo improbable la aparición de resistencia por mutaciones puntuales. Por tanto, la búsqueda de análogos de colina es otra interesante fuente de nuevos compuestos antimicrobianos.

Aunque en un primer momento puede parecer que la adición de colina exógena al medio es una buena estrategia para interferir con las CBPs (ya que es su ligando natural), las proteínas tienen mucha más afinidad por las múltiples fosfocolinas de los ácidos teicoicos (Monterroso et al, 2008). Por tanto, es necesario concentraciones demasiado elevadas de colina exógena para afectar a la bacteria (alrededor de 150 mM).

Un grupo de moléculas capaces de inhibir eficazmente las CBPs a menores concentraciones son los ésteres de aminas bicíclicas (EBAs) (**Figura 4**). No actúan como meros análogos de colina, ya que no inducen la formación de cadenas de bacterias (señal de que las

CBPs están inhibidas y las bacterias no pueden separarse durante la división), pero, al contrario que aquella, afectan a su crecimiento y viabilidad (Maestro y cols., 2007; Retamosa y cols., 2015).

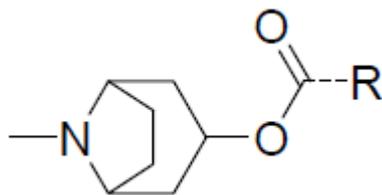


Figura 4. Estructura general de los ésteres de aminas bicíclicas. La R representa el sustituyente distintivo que caracteriza los diferentes tipos de EBAs.

2. OBJETIVOS

En concordancia con lo expuesto en la introducción de este trabajo, tanto los EBAs como los péptidos derivados de la tercera CBR de LytA (péptido P3), resultan de elevado interés por sus posibles aplicaciones como antimicrobianos. Hasta la fecha, se han llevado a cabo experimentos para evaluar los efectos de EBAs y péptidos por separado. Sin embargo, no existe apenas información sobre el mecanismo por el que actúan unos y otros, ni mucho menos acerca del posible efecto sinérgico que tendría sobre *Streptococcus pneumoniae* la adición de estos dos compuestos juntos. Dicho efecto sinérgico podría tener lugar si ambos compuestos operaran por mecanismos antibacterianos diferentes pero relacionados entre sí, como se ha descrito en varios casos de combinación de medicamentos (Jia Jia y cols., 2009).

Por ende, en este trabajo se llevará a cabo un estudio sobre la capacidad de afectar el crecimiento, la viabilidad y la morfología de la cepa R6 de *S. pneumoniae* de tres ésteres de aminas bicíclicas (los EBAs 18, 26 y 31) junto con tres péptidos (P3A, P3B, P3C) derivados de la tercera repetición del módulo de unión a colina de LytA, con los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Observar los efectos producidos por diferentes concentraciones de EBAs y péptidos derivados de LytA sobre el crecimiento de *S. pneumoniae*, atendiendo a varios aspectos: cinética de crecimiento, viabilidad y morfología celular mediante el uso de microscopía óptica de contraste de fases y confocal.

Objetivo 2: Comprobar si la adición de EBAs junto con péptidos tiene algún efecto sinérgico o antagónico sobre *S. pneumoniae* distinta de la adición de los compuestos por separado.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Métodos generales

3.1.1. Preparación del medio de cultivo C+Y

El medio C+Y (Lacks y Hotchkiss, 1960) está constituido por diferentes compuestos resumidos en la **Tabla 1**. Todos ellos fueron esterilizados por filtración o autoclavado.

Compuesto	Cantidad	Composición
Medio Pre-C	40 ml	Sodio Acetato 3H ₂ O (2 g) Casaminoácidos DIFCO (5 g) L-Trp (5 mg) L-Cys (50 mg) H ₂ O (1000 ml)
Suplemento B	1,3 ml	10 ml Sales 3 en 1 (MgCl ₂ *6H ₂ O, CaCl ₂ *2H ₂ O, MnSO ₄ , H ₂ O) Glucosa 20% (20 ml) Sacarosa 50% (1 ml) Adenosina 2 mg/ml (20 ml) Uridina 2 mg/ml (20 ml)
L-glutamina (1 mg/ml)	1 ml	
Adams III	1 ml	64 ml Adams I (Biotina, Ac. nicotínico, Piridoxina, Pantotenato de Ca, Tiamina-HCl, Riboflavina, H ₂ O) 16 ml Adams II (SO ₄ Fe*7H ₂ O, SO ₄ Cu*5H ₂ O, SO ₄ Zn*7H ₂ O, Cl ₂ Mn ₄ *4H ₂ O, HCl, H ₂ O) L-asparagina (800 mg) Colina (80 mg) Cl ₂ Ca 1% (0,64 ml) H ₂ O (400 ml)
Piruvato 2%	0,5 ml	
Tampón fosfato potásico pH=8	1,5 ml	KH ₂ PO ₄ 1M (2,65 ml) K ₂ HPO ₄ 1M (47,35 ml)
Extracto de levadura	0,9 ml	Extracto de levadura (4 g) H ₂ O (100 ml)

Tabla 1: Composición del medio C+Y empleado para el cultivo líquido de *Streptococcus pneumoniae*.

3.1.2. Preparación del medio de cultivo agar sangre

Para el recuento de viables, se utilizaron placas de agar sangre. La preparación de este medio consistió en la mezcla de: 16 g de Agar TSA (Cat 1068, Conda) con agua hasta los 400 ml. La mezcla fue autoclavada y posteriormente se añadió 20 ml de sangre de oveja defibrinada (Ref: SR 0051C, Thermo Scientific Oxoid). Finalmente se distribuyó el medio en las placas.

3.2. Cepas de *Streptococcus pneumoniae*

Las cepas utilizadas pertenecen a la colección del laboratorio. Se trata de *Streptococcus pneumoniae* R6, una cepa carente de cápsula y no virulenta. Se almacena a 0,4 de DO_{550nm} en presencia de 10% de glicerol final a -80°C.

3.3. Seguimiento de la curva de crecimiento

Cuando el preinóculo se encuentra en DO_{550nm} de 0.4 se lleva a cabo una dilución 1:20 en medio C+Y precalentado a 37°C. Pasados unos minutos tras la inoculación, se comenzó a medir la densidad óptica a intervalos regulares hasta alcanzar una DO_{550nm} de 0,1, momento en el cual se añadía el compuesto a ensayar (EBA, péptido o ambos).

Tras la adición de los compuestos de ensayo, se realizaron mediciones en el espectrofotómetro a intervalos de tiempo regulares hasta el inicio de la autólisis.

3.4. Recuento de viables

Para determina el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se inoculan las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ del cultivo tratado en placas de agar sangre y se incuban 16 horas a 37°C. Finalmente se llevó a cabo el recuento de colonias con ayuda de la herramienta *Cell Counter* del programa ImageJ (National Institutes of Health, EEUU).

3.5. Ensayo de actividad bacteriolítica/bactericida en *resting cells*

Para ensayar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad de *Streptococcus pneumoniae* también se realizó un segundo método donde se detiene el crecimiento de las células.

Cuando el preinóculo se encuentra en DO_{550nm} de 0.4 se lleva a cabo una dilución 1:20 en medio C+Y precalentado a 37°C. Posteriormente, cuando el cultivo llega a DO_{550nm} 0.35 se incubó en hielo unos minutos para detener el crecimiento y se centrifugó a 3800 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, utilizando una centrífuga 5424 R

(Eppendorf). Tras resuspender el pellet en tampón fosfato 5 mM pH 6,5 + 280 mM de sorbitol

En una placa multipocillo se añadió la cantidad necesaria de cada compuesto a ensayar y del cultivo preparado hasta llegar a un volumen total de 150 μ l (realizado por duplicado). Se dejó la placa en incubación a 37°C y regularmente, se tomaron muestras para realizar las diluciones necesarias y sembrarlas en agar sangre, siguiendo el protocolo ya comentado para el recuento de viables.

3.6. Solubilización y preparación de EBAs

Los ésteres de aminas bicíclicas utilizados fueron el EBA31, EBA27 y EBA18, cuya estructura se muestra en la **Tabla 2**. Se optó por estos tres debido a su baja concentración mínima inhibitoria (MIC), también representada en la tabla (Retamosa y cols., 2015). Los compuestos fueron adquiridos al Parque Científico de Barcelona.

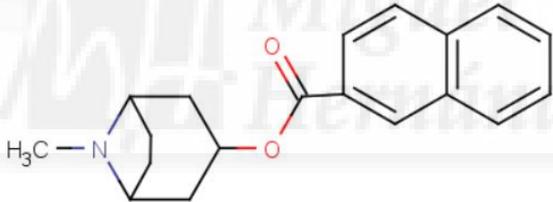
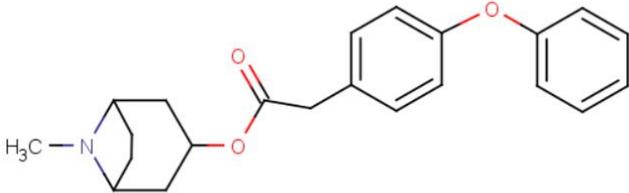
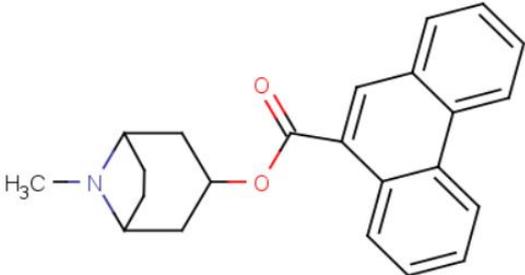
Compuesto	Estructura	MIC (Retamosa y cols., 2015)
EBA18		180 μ M
EBA27		90 μ M
EBA31		22 μ M

Tabla 2: Estructura y concentración mínima inhibitoria de los distintos ésteres de aminas bicíclicas utilizados en los ensayos. Las estructuras fueron creadas utilizando el programa *MarvinSketch* (ChemAxon).

El protocolo para solubilizar los EBAs es idéntico para los tres compuestos ensayados (EBA18, 27 y 31). Para cada uno, se preparó un stock inicial a 10 mM disuelto en HCl. Se pesó la correspondiente masa del EBA y se dejó varias horas en agitación con HCl 15 mM hasta su solubilización por la creación del clorhidrato (en el caso del EBA27 se utilizó 10 mM).

Las disoluciones se almacenaron a temperatura ambiente y se fue comprobando periódicamente que los EBAs seguían solubles y no había contaminación.

3.7. Preparación de péptidos

Se utilizaron tres péptidos derivados de LytA obtenidos por síntesis (Genescript, EEUU). Se trata de la tercera repetición de unión a colina (P3), repetida una (P3A), dos (P3B) o tres veces (P3C), manteniendo el conector nativo que conecta la repetición P3 en la proteína (**Figura 5**). Los péptidos P3B y P3C péptidos no existen de forma natural, sino que fueron diseñados con repeticiones idénticas para facilitar el estudio de las diferencias de comportamiento entre ellos.

P3A - TGWKKIADKWYFFN (14)

P3B – TGWKKIADKWYFFN **EEGAMKT** TGWKKIADKWYFFN (34)

P3C – TGWKKIADKWYFFN **EEGAMKT** TGWKKIADKWYFFN **EEGAMKT** TGWKKIADKWYFFN (54)

Figura 5: Secuencia de los diferentes péptidos empleados derivados de tercera repetición de unión a colina. En azul se destacan los aminoácidos correspondientes a la repetición número 3; en rojo, el conector que los une. En número entre paréntesis representa la longitud de cada péptido.

Antes de cada ensayo con péptidos, era necesario determinar la concentración del péptido en disolución. Se realizó mediante espectroscopia de absorción a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Evolution 201 (Thermo Scientific) con una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico. A partir de la medida de absorbancia, se obtuvo la concentración del péptido mediante la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 1**).

$$A_{280nm} = C * \epsilon_{280} * l$$

Ecuación 1: ley de Lambert-Beer, la ecuación relaciona transmisión de luz a través de una sustancia con la concentración de la misma. “C” es la concentración, “ ϵ_{280} ” es el coeficiente de extinción molar del péptido a 280 nm y “l” es el paso óptico de la cubeta.

El coeficiente de extinción molar de los diferentes péptidos fue calculado mediante el programa *Protparam* del servidor rExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). A continuación, en la **Tabla 3**, se adjuntan los coeficientes de extinción molar de cada péptido:

Péptido	ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)
P3A (P3)	13980
P3B (P33)	27960
P3C (P333)	41940

Tabla 3: Coeficientes de extinción molar de los distintos péptidos, calculados mediante el programa *Protparam* (rExpasy).

Se trabajó con unidades de absorbancia inferiores a la unidad para permanecer dentro del rango de linealidad de la ley de Lambert-Beer, realizando diluciones cuando fue necesario.

3.8. Toma de muestras y visualización en microscopio óptico y confocal

Durante los ensayos, se tomaron muestras de los diferentes cultivos líquidos de *Streptococcus pneumoniae* para su observación microscópica. Para la observación, se utilizó un microscopio óptico con contraste de fases Bx50 (Olympus).

También se tomaron muestras para su observación por microscopía confocal (ZEISS LSM 800 (Carl Zeiss AG). Las muestras fueron teñidas utilizando el protocolo de tinción *LIVE/DEAD BacLight* (Life Technologies, Thermo Fisher), donde se utilizan dos fluorocromos: el SYTOX9, que penetra todas las células y da lugar al color verde y yoduro de propidio, capaz de penetrar únicamente en las células cuya membrana ha sido comprometida, dando lugar a color rojo. Se emplearon muestras de 50 μ l incubadas con 1,5 μ l de la mezcla de fluorocromos de BacLight (diluido 1:10 con agua *Mili-Q*) durante 15 minutos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento de la densidad óptica a 550nm del cultivo líquido de *Streptococcus pneumoniae* R6 ha permitido obtener datos sobre la evolución de su crecimiento. Para cada EBA, se siguió la misma estrategia: en un primer ensayo se probaba el EBA seleccionado sobre neumococo para determinar con más precisión la concentración mínima inhibitoria (*minimum inhibitory concentration*, MIC) de cada compuesto en nuestro sistema, debido a que es conveniente utilizar una concentración de EBA que por sí sola cause poco o ningún efecto. De esta manera se podría detectar un efecto sinérgico en caso de ver efectos significativos sobre la bacteria en ensayos con péptidos y EBAs juntos.

4.1. EBA 31

La MIC del EBA31 es de 22 μ M, de acuerdo con lo descrito en la literatura (Retamosa y cols., 2015). Partiendo de este dato, se probaron concentraciones del **EBA31 de 100 μ M, 10 μ M**

y 1 μM junto a los controles correspondientes, adicionando el tampón donde se encuentran disueltos los EBAs (el EBA31 se encontraba disuelto en un tampón compuesto por HCl 15 mM y tampón fosfato 20 mM a pH 7).

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 6**), se tomaron muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 7**) y para su observación en el microscopio óptico (**Figura 8**).

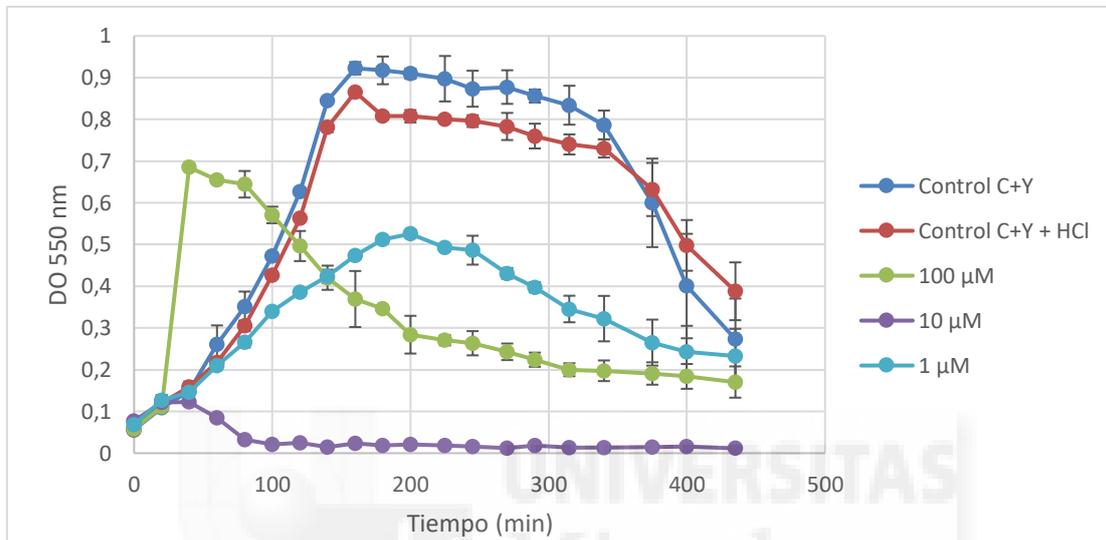


Figura 6: Efectos del EBA31 en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO_{550} durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO_{550} de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

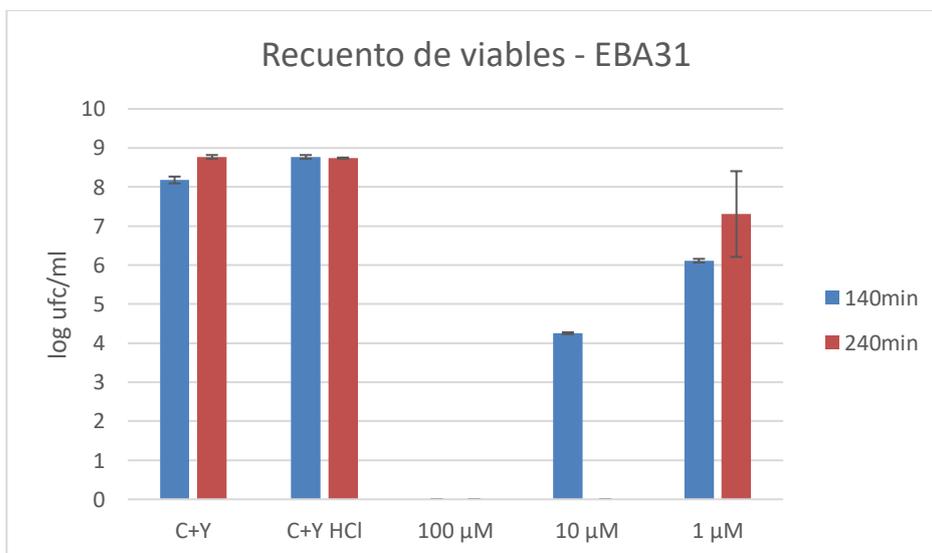


Figura 7: Efectos del EBA31 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a 140 min y 240 min. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

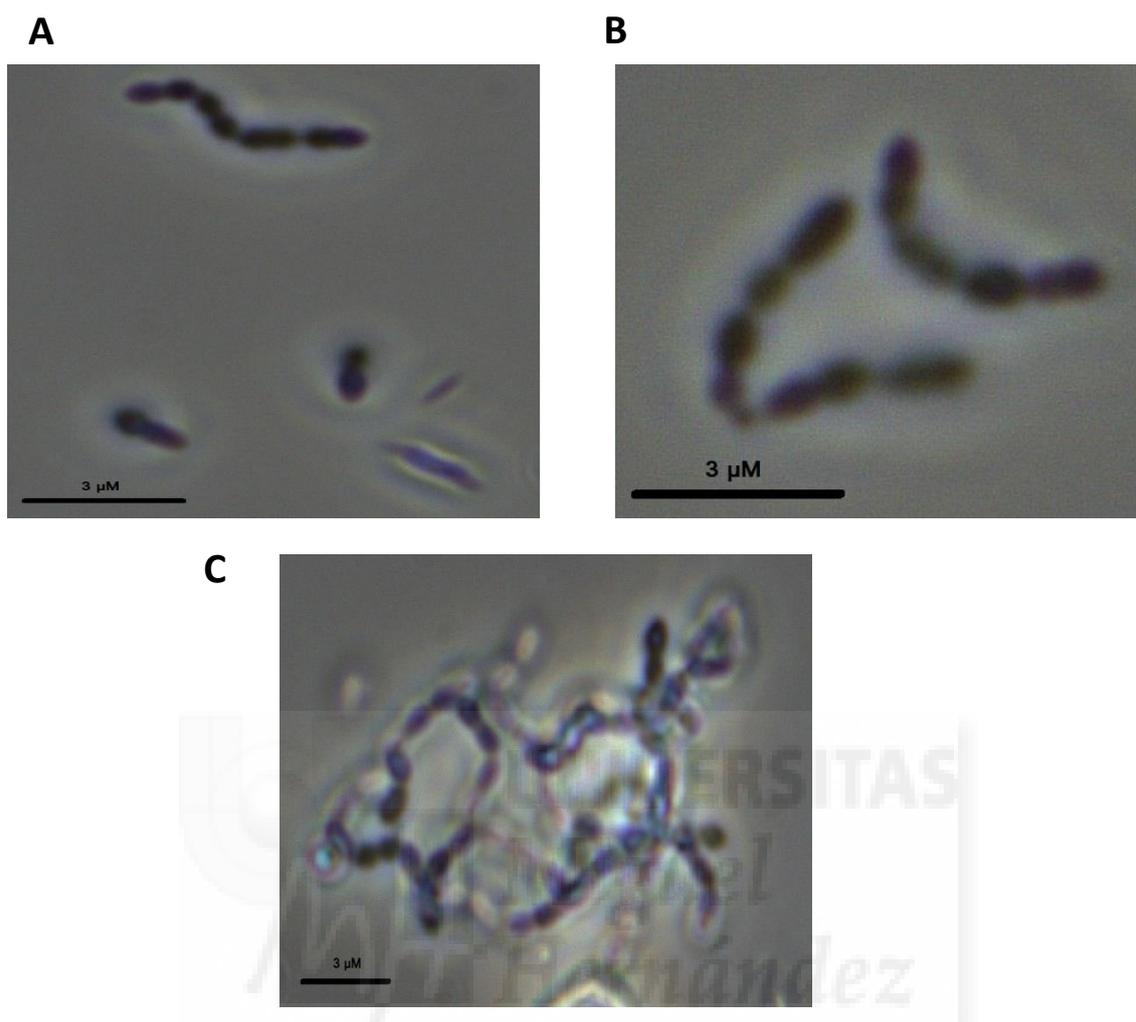


Figura 8: Imágenes de microscopía óptica del cultivo de *S. pneumoniae* con EBA31, a 240 min. **A)** Control. **B)** Control + HCl. **C)** EBA31 100 μM.

Se puede ver en la **Figura 6** como el crecimiento de neumococo se ve afectado a las tres concentraciones probadas (100 μM, 10 μM y 1 μM). El aumento de DO registrado a 100 μM es debido a que se formaron agregados del EBA31 que dispersaban la luz.

La viabilidad se ve igualmente comprometida, como se demuestra en la **Figura 7**, las concentraciones probadas disminuyen varias unidades logarítmicas el número de unidades formadoras de colonias por mililitro.

Además se observa un cambio en la morfología de la bacteria tal y como muestra la **Figura 8**. A medida que aumenta la concentración del compuesto se observa un descenso en el

número de células y un incremento en la formación de agregados bacterianos característicos de la inhibición de las proteínas de unión a colina.

Aunque la MIC descrita en la literatura era de 22 μM , en nuestro caso una concentración de 10 μM bastaba para afectar el crecimiento, la viabilidad y la morfología. Por tanto, con estos resultados, se vio necesario volver a repetir un ensayo similar a concentraciones inferiores, que causasen un menor efecto y permitiera dilucidar mejor un efecto sinérgico en posteriores ensayos con péptidos. También se observó que el uso de HCl no tiene efectos significativos sobre el crecimiento y la viabilidad de la bacteria a las concentraciones utilizadas (**Figs. 6-8**).

Usando menores concentraciones de EBA, a **0,5 μM , 0,2 μM y 0,1 μM** , se siguió la curva de crecimiento (**Figura 9**), tomándose muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 10**).

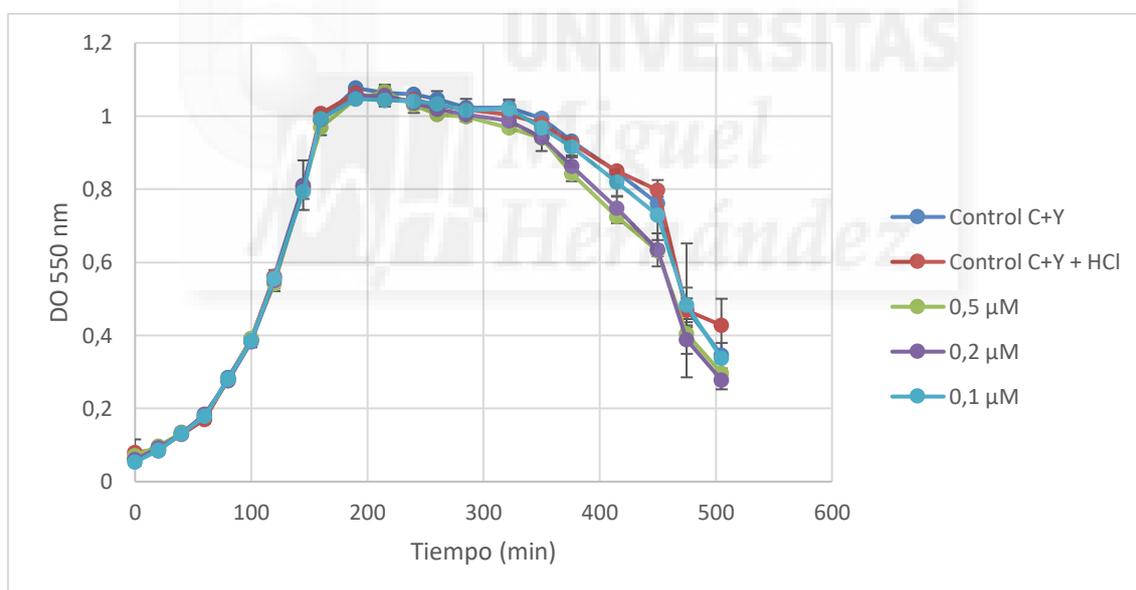


Figura 9: Efectos del EBA31 en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO_{550} durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO_{550} de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

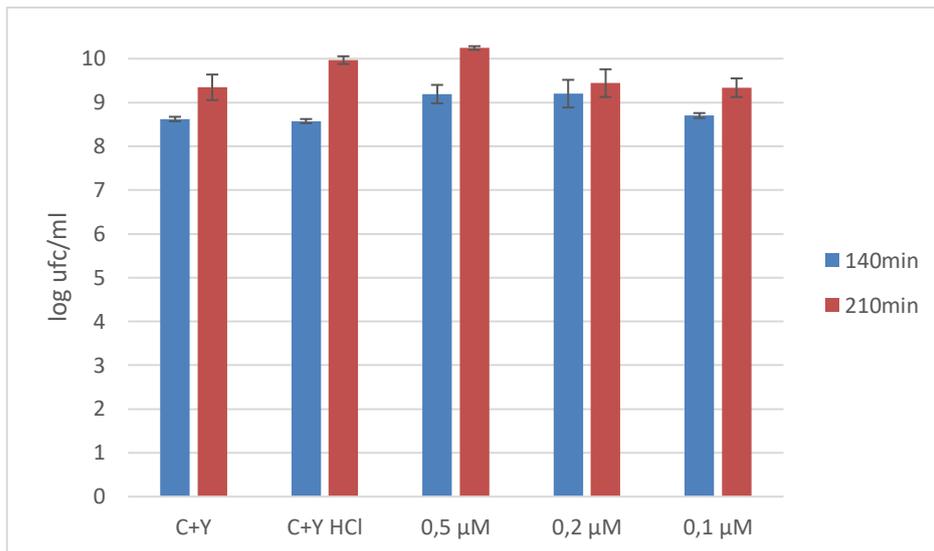


Figura 10: Efectos del EBA31 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a 140 min y 240 min. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Tras los resultados obtenidos se decide utilizar este compuesto a una concentración de 0,5 µM o de 1 µM (la mínima concentración donde se nota algún efecto) para ensayos donde se utilice algún péptido junto con el EBA31.

Se realizó un primer ensayo con los péptidos **P3A, P3B y P3C a 1 µM junto con el EBA31 a 0,5 µM** (a la cual no se observó ningún efecto por sí sola). Los tres péptidos también se utilizaron a concentraciones por debajo de las capaces de causar efectos en *S. pneumoniae* de acuerdo con conocimientos previos del grupo (datos no mostrados).

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 11**). Se tomaron muestras en fase estacionaria a un tiempo para el recuento de viables (**Figura 13**).

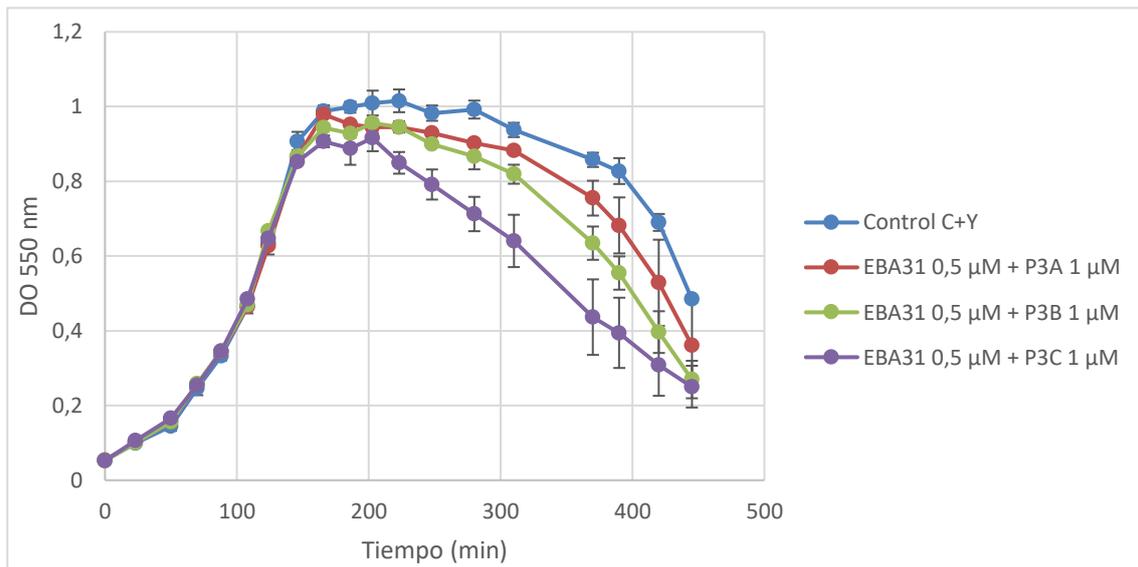


Figura 11: Efectos del EBA31 junto con P3A, P3B o P3C en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO₅₅₀ durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

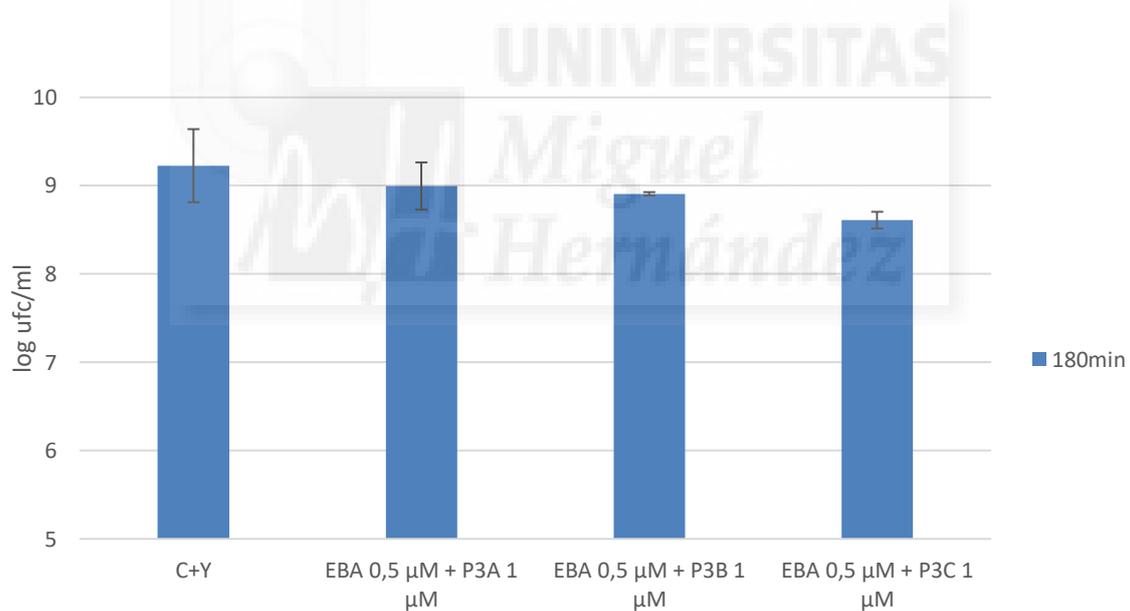


Figura 12: Efectos del EBA31 junto con P3A, P3B o P3C en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 180. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Se observa como en la **Figura 11**, el crecimiento de neumococo se ve ligeramente afectado al utilizar el EBA31 junto a P3A, P3B y P3C. El efecto en el crecimiento es mayor en el caso de los péptidos P3B y P3C. En todo caso, la viabilidad celular no se ve altamente comprometida en ninguno de los casos (**Fig. 12**).

Se realizó un nuevo ensayo con el **EBA31 a 1 μM junto al péptido P3B a 25,5 μM** , una concentración de péptido que en principio sí afecta al crecimiento, pero no a la viabilidad, según resultados de ensayos realizados por el grupo en el pasado (**Figuras 14 y 15B**). Se tomaron los datos de los ensayos como control de los efectos del péptido P3B sólo.

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 13**) y se tomaron muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 15A**).

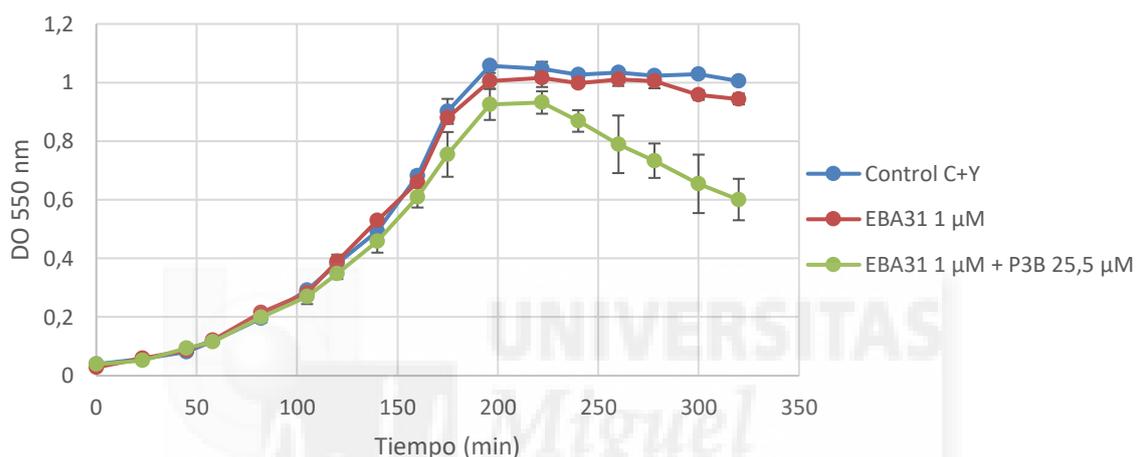


Figura 13: Efectos del EBA31 junto con P3B en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO_{550} durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO_{550} de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

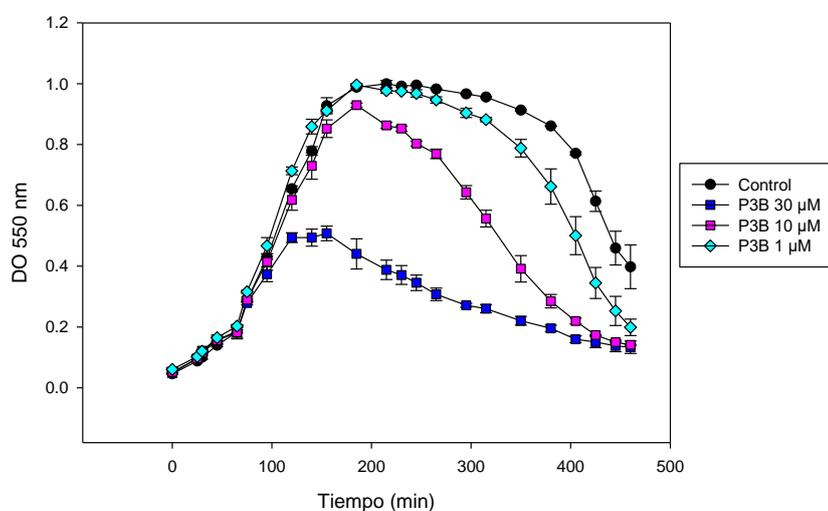


Figura 14: Efectos del péptido P3B en la curva de crecimiento de *S. pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO_{550} durante varias horas. Resultados obtenidos previamente por el grupo.

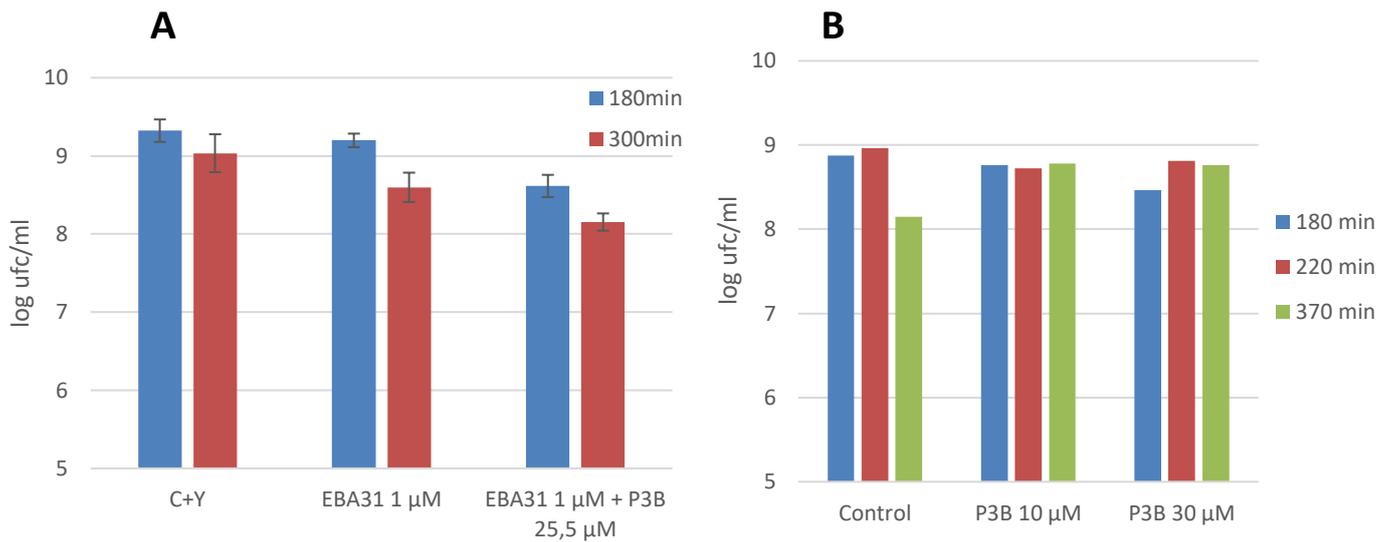


Figura 15A: Efectos del EBA31 y el péptido P3B en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a los minutos 180 y 300. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto. **Figura 15B:** Efectos del péptido P3B en la viabilidad celular de *S. pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado. Resultados obtenidos previamente por el grupo.

Los resultados presentados en la **Figura 13** muestran como el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* se ve algo afectado al probar EBA31 junto con P3B. Esto no se observa con el EBA31 por separado. En la **Figura 14** se mostraba el ensayo realizado por el grupo este péptido por separado, donde P3B a concentraciones de 10 y 30 μ M afectaba al crecimiento de mayor a como lo hace con el EBA31 junto con P3B, es decir, hay un cierto efecto antagónico.

Tal y como muestra la **Figura 15A**, el uso conjunto de EBA31 con P3B afecta la viabilidad, detectándose una disminución de cerca de una unidad logarítmica tanto a 180 min como a 300 min. Este efecto no se observa con otras muestras, ya que la viabilidad de la bacteria tras su exposición al EBA31 solo, no difiere del control. El uso de P3B solo tampoco afectaba a la viabilidad, como ya demostró el grupo, mostrado en la **Figura 15B**. Cabe resaltar que en las **Figuras 6 y 7** el EBA31 a 1 μ M sí afectaba a la bacteria, mientras que en las **Fig. 14 y 15** no lo hace. Considerando los conocimientos previos de ensayos realizados por el grupo (no mostrado), tiene más sentido estos últimos resultados, donde una concentración baja del compuesto solo no produce efectos adversos.

4.2. EBA 27

La MIC descrita en la literatura del EBA27 es de 90 μM (Retamosa y cols., 2015). Como ya se realizó con el otro EBA, primero se probó un rango amplio concentraciones del **EBA27 de 100, 70, 30, 20, 10 y 1 μM** .

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 16**), se tomaron muestras en fase estacionaria a un tiempo para el recuento de viables (**Figura 17**).

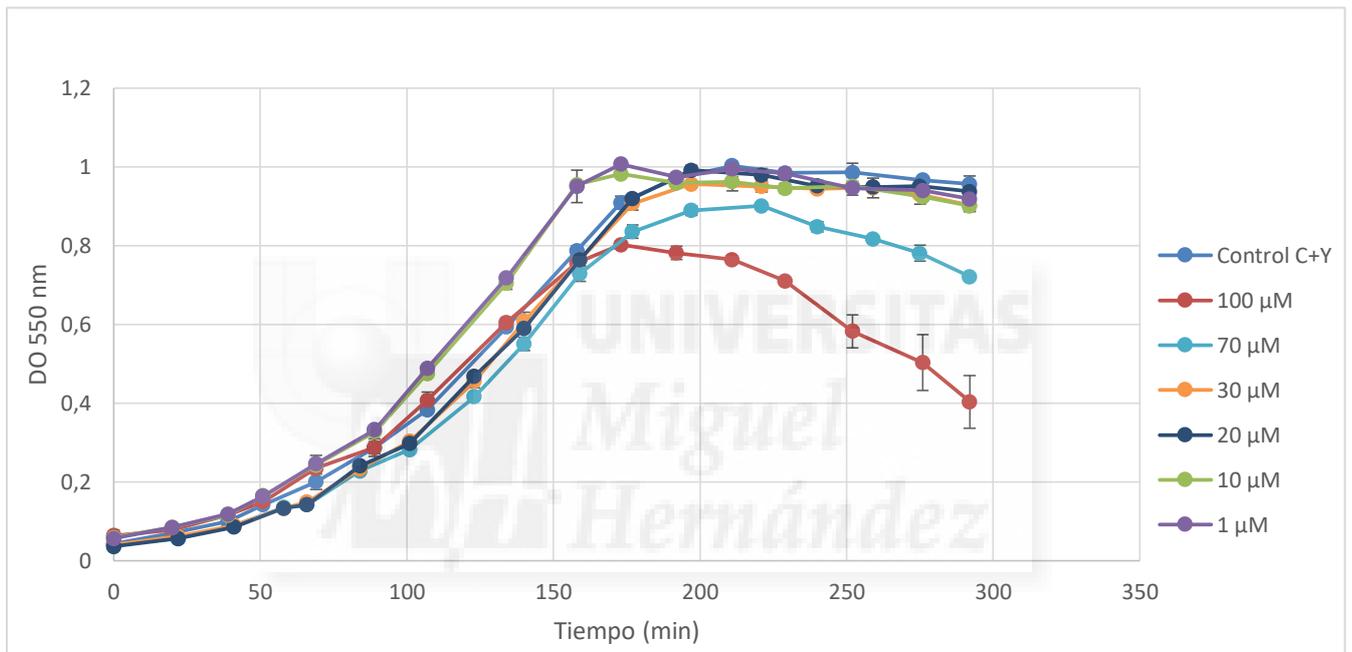


Figura 16: Efectos del EBA27 en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la $\text{DO}_{550\text{nm}}$ durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

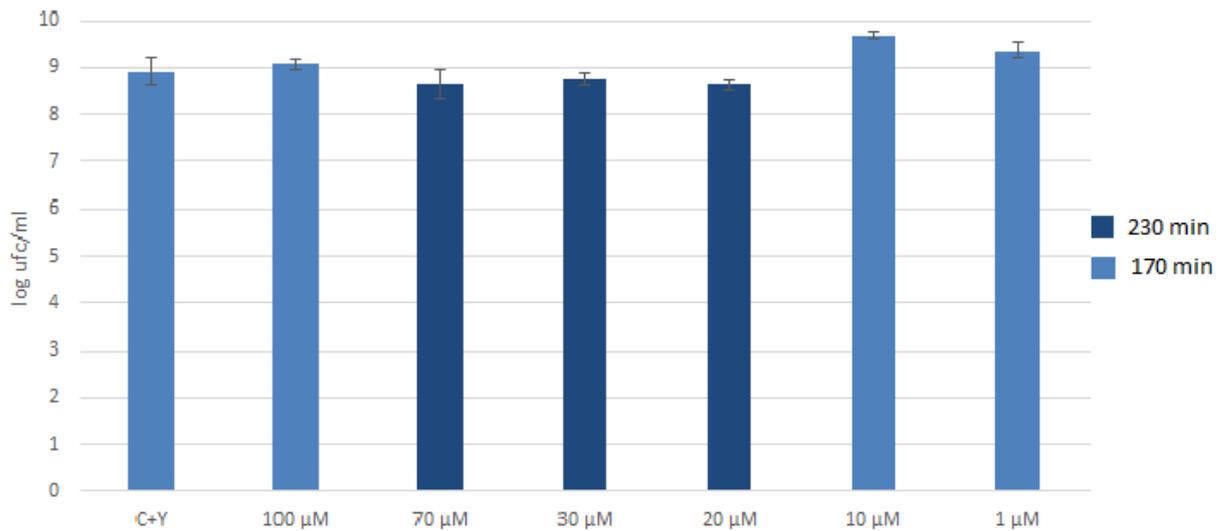


Figura 17: Efectos del EBA27 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 170 ó 230 min. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Tal y como muestra la **Figura 16** sólo el EBA27 a 100 µM y a 70 µM afecta al crecimiento de *S. pneumoniae*. Sin embargo, según la representación de la viabilidad de la **Figura 17**, no se aprecia ningún efecto sobre el número de unidades formadoras de colonias con ninguna concentración de este compuesto. En las tres concentraciones donde se tomaron muestras a 230 min, parece haber un descenso proporcional en las viables, pero no es significativo viendo la barra de error del control.

30 µM fue la máxima concentración que no afectaba ni a la curva normal de crecimiento ni al número de unidades formadoras de colonias, por lo que se eligió esta concentración para su ensayo junto con los péptidos.

En un nuevo ensayo conjunto de ambas estrategias antimicrobianas, se utilizó el **EBA27 a 30 µM junto con el péptido P3B a 21 µM**. Como control del péptido se utilizó los datos obtenidos por el grupo anteriormente (**Figura 14**).

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 18**), se tomaron muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 19A**).

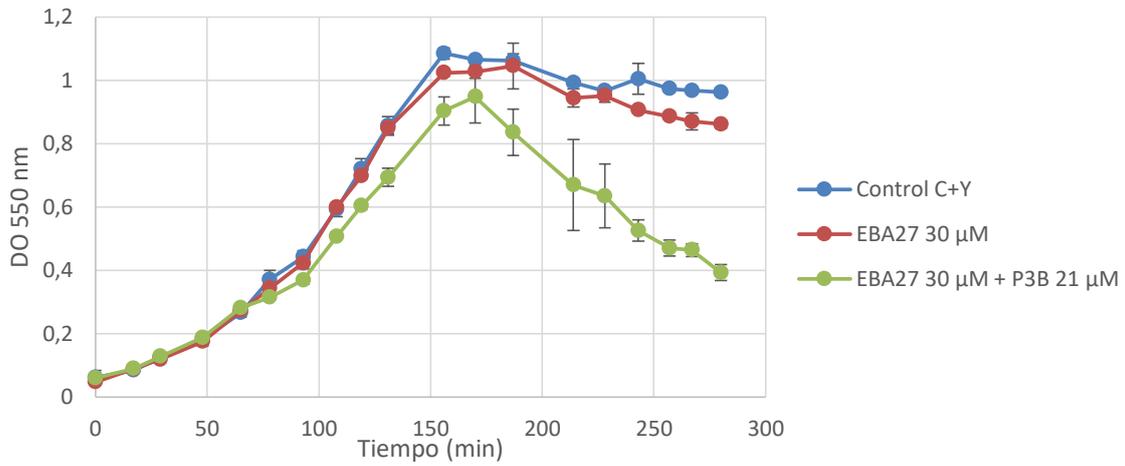


Figura 18: Efectos del EBA27 junto con el péptido P3B en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO₅₅₀ durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

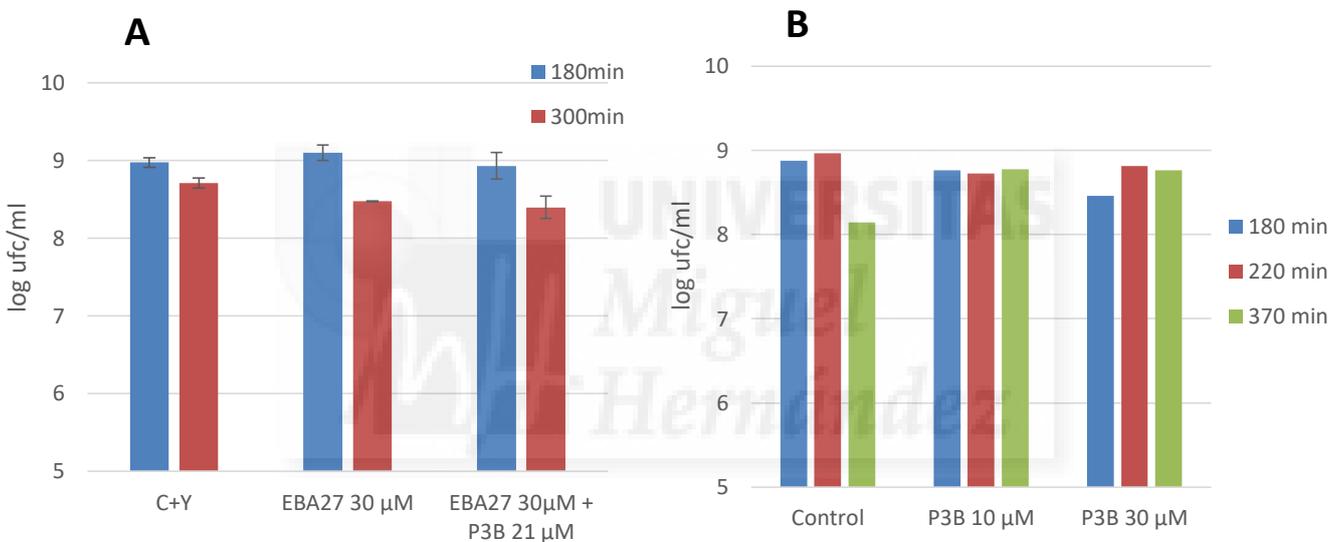


Figura 19A: Efectos del EBA27 y el péptido P3B en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a los minutos 180 y 300. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto. **Figura 19B:** Efectos del péptido P3B en la viabilidad celular de *S. pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado. Resultados obtenidos previamente por el grupo.

Los resultados mostrados en la **Figura 18** indican que el uso combinado del EBA27 junto con P3B tiene un efecto adverso en el crecimiento de *S. pneumoniae*, presentando una menor densidad óptica que el control. Sin embargo, es similar al efecto provocado por P3B a 10 μM solo, como mostraba la **Figura 14**.

La viabilidad de neumococo no se vio comprometida al ser expuesto a la combinación de péptido más EBA. Como se muestra en la **Figura 19A**, a ninguno de los tiempos se observa

una disminución significativa en las unidades formadoras de colonias por mililitro. Por tanto, en este caso no se aprecia sinergia.

Se decidió realizar el mismo ensayo con **EBA31 a 30 μ M junto con P3C a 10 μ M**, un péptido que produce una mayor caída del crecimiento que P3B, a una concentración que en teoría debería afectar tanto a la viabilidad como al crecimiento de *S. pneumoniae*.

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 20**), se tomaron muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 21**).

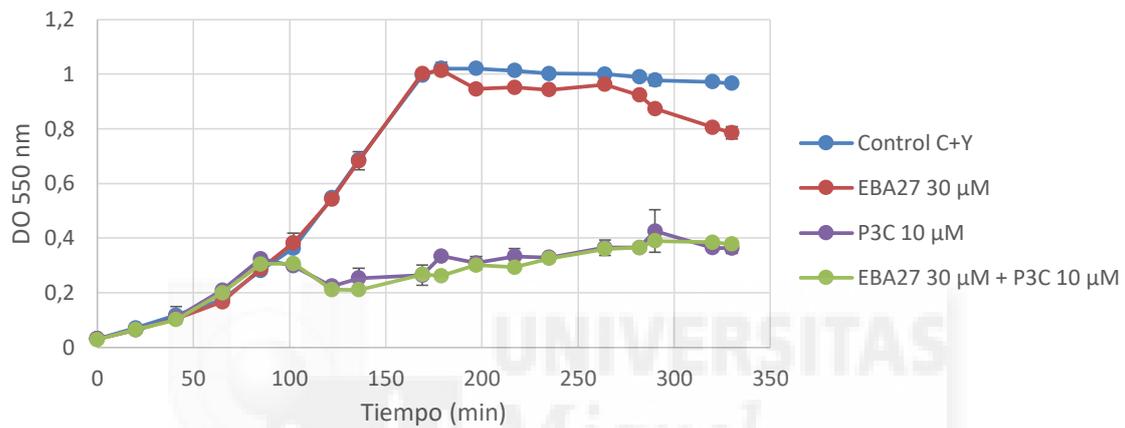


Figura 20: Efectos del EBA27 junto con el péptido P3C en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO₅₅₀ durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

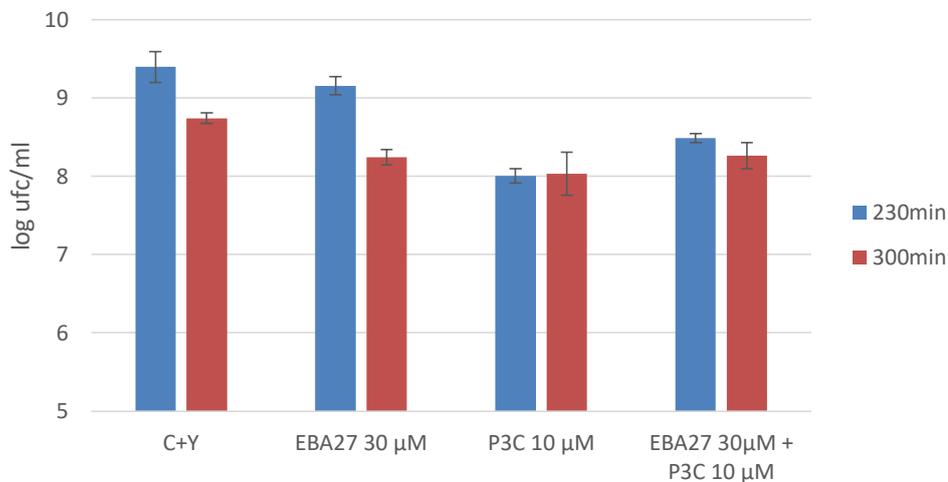


Figura 21: Efectos del EBA27 y el péptido P3C en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a los minutos 230 y 300 desde el inicio del ensayo. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Los resultados de la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* representados en la **Figura 20** muestran que tanto los cultivos con P3C solo, como los que tenían P3C junto con el EBA27 ven afectados su crecimiento normal en comparación con el control y con el cultivo donde sólo había EBA27.

De forma similar, los resultados de viabilidad representados en la **Figura 21** muestran una disminución en el número de unidades formadoras de colonias por mililitro en los cultivos con P3C sólo y con EBA27+P3C, sin diferencias significativas entre ambos a 230 min. La viabilidad de los cultivos con EBA27 no parece diferir del control.

Esto parece indicar que los efectos observados al utilizar ambos antimicrobianos son debidos al péptido P3C, sin apreciarse sinergia al utilizar al combinarlo con EBA27 a las concentraciones empleadas.

4.3. EBA 18

La MIC del EBA18 es de 180 μM , según se ha descrito en la literatura (Retamosa y cols., 2015). Como se venía haciendo hasta ahora, primero se probó un rango amplio de concentraciones del **EBA18 de 250 μM , 150 μM , 100 μM y 50 μM .**

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 22**), se tomaron muestras en fase estacionaria a un tiempo para el recuento de viables (**Figura 23**).

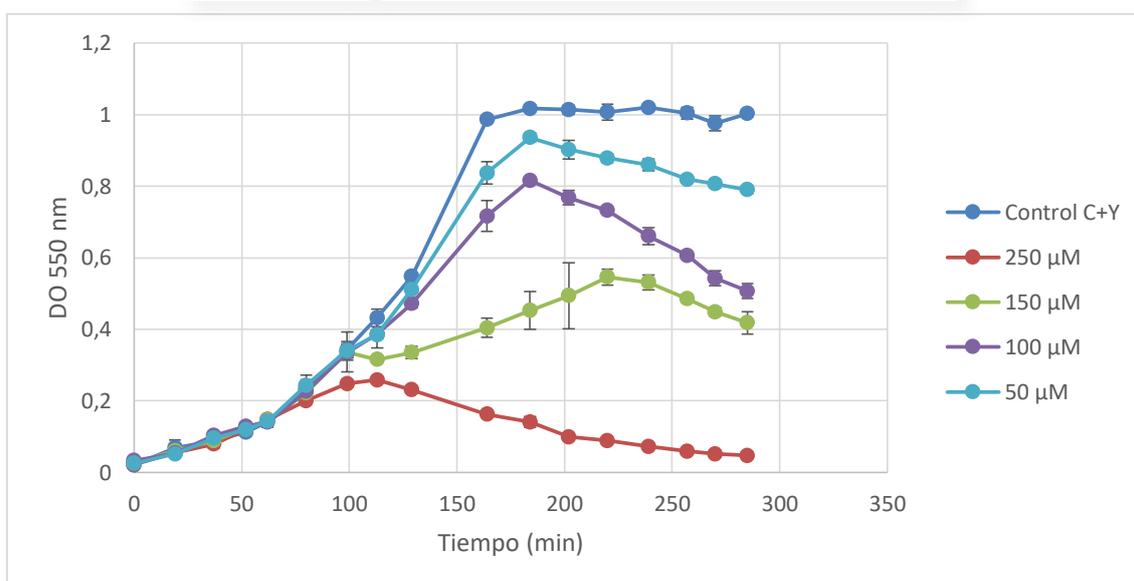


Figura 22: Efectos del EBA18 en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO_{550} durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO_{550} de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

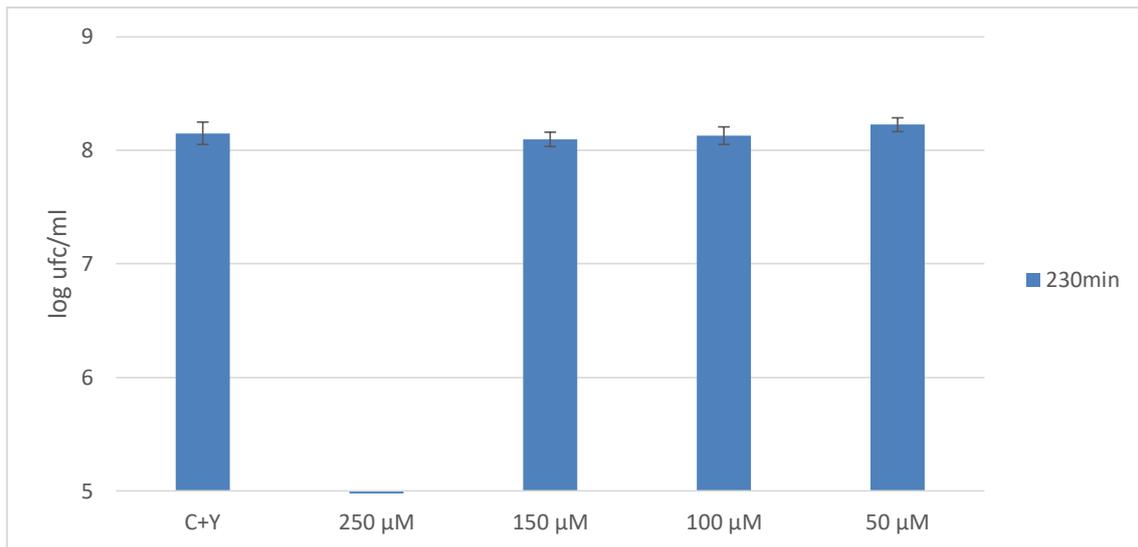


Figura 23: Efectos del EBA18 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 230. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Todas las concentraciones del EBA18 afectan al crecimiento de *S. pneumoniae* como se muestra en la **Figura 22**. Las concentraciones más elevadas probadas tienen un efecto casi inmediato en los cultivos desde su adicción, mostrando una menor densidad óptica en fase exponencial y estacionaria.

Se vio conveniente utilizar el EBA18 a 50 μM, puesto que su efecto era prácticamente inexistente sobre la curva de crecimiento y nulo sobre la viabilidad.

Se decidió utilizar el **EBA27 a 50 μM junto con P3B a 20 μM**, una concentración similar a las empleadas hasta ahora (21 y 25,5 μM).

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de Métodos, se siguió la curva de crecimiento (**Figura 24**), se tomaron muestras en fase estacionaria a dos tiempos para el recuento de viables (**Figura 25**) y para su observación en el microscopio óptico (**Figura 26**).

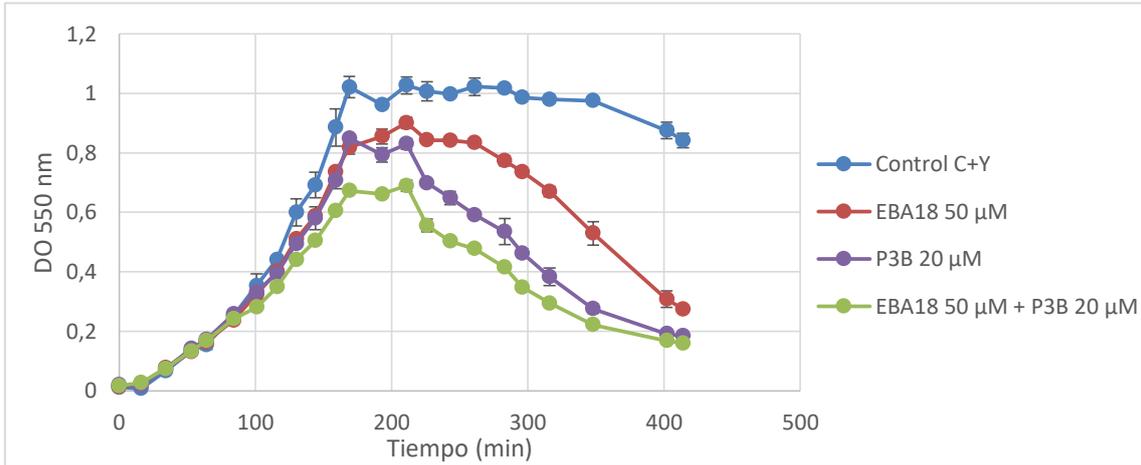


Figura 24: Efectos del EBA18 junto con el péptido P3B en la curva de crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el seguimiento de la DO₅₅₀ durante varias horas. El compuesto de ensayo fue añadido cuando todos los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de 0,1. Cada punto representa la media de los duplicados con su respectiva desviación estándar.

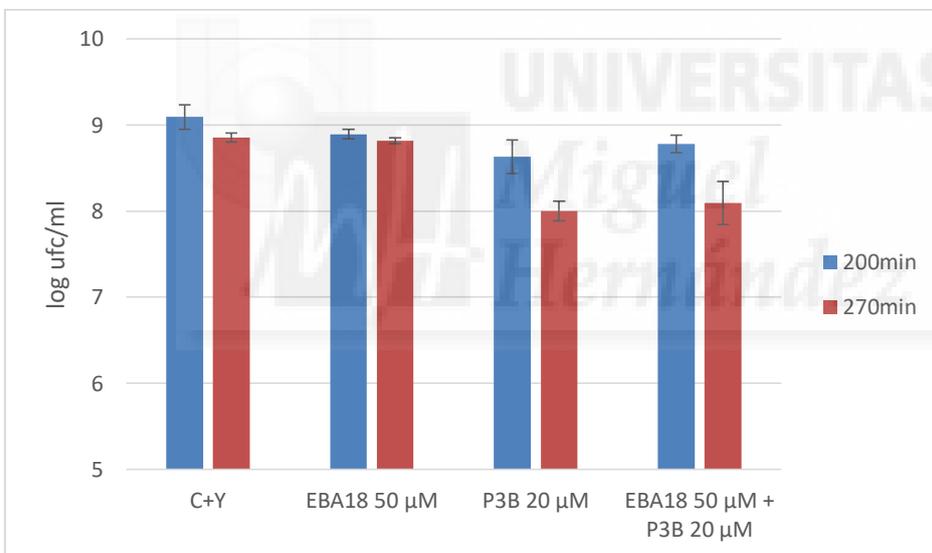


Figura 25: Efectos del EBA18 y el péptido P3B en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas a los minutos 230 y 300 desde el inicio del ensayo. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto .

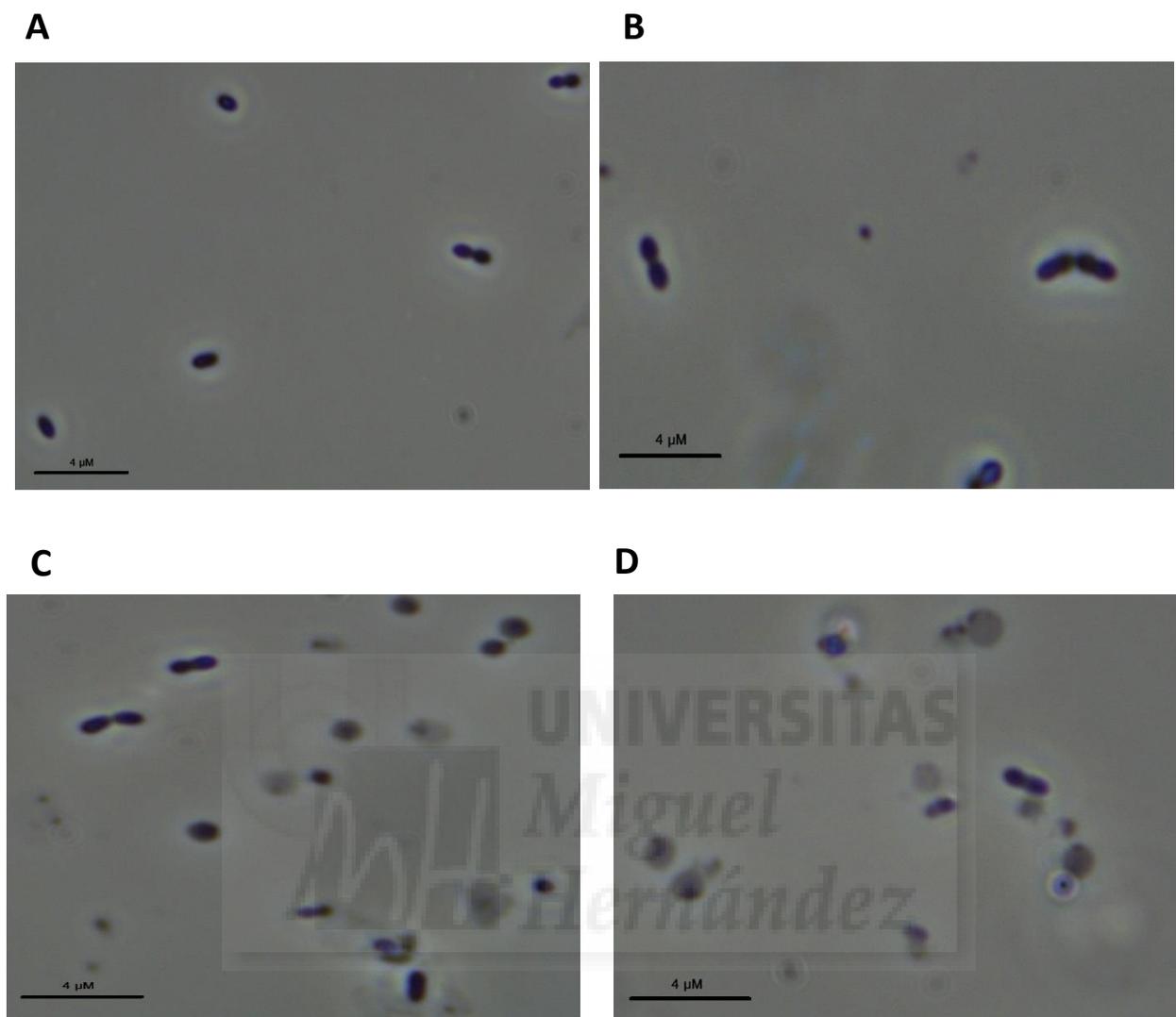


Figura 26: imágenes de microscopía óptica del cultivo de *Streptococcus pneumoniae* con EBA18 y P3B, de muestras tomadas a 270 minutos. Las imágenes corresponden a: **A)** Control. **B)** EBA18 50 μM . **C)** P3B 20 μM . **D)** EBA18 50 μM + P3B 20 μM .

Los resultados de la **Figura 24** muestran una disminución en la densidad óptica del cultivo de *S. pneumoniae* al ser expuesto a los compuestos de ensayo. El efecto del EBA18 por sí sólo es el mismo al descrito en el ensayo anterior, mientras que P3B sólo y el EBA18+P3B parecen tener un efecto similar.

La viabilidad del cultivo no se ve afectada en ningún caso a 200 min, como muestra la **Figura 25**. A 270 minutos sí que existe una disminución de cerca de una unidad logarítmica en el número de unidades formadoras de colonias por mililitro en los cultivos con P3B y EBA18+P3B. Este efecto es igual en ambos.

Como refleja la **Figura 26C-D**, la adición de P3B provoca la aparición de células redondeadas. Esto es debido al efecto del péptido, ya que la adición del EBA18 solo (**Fig. 26B**) no causa ese efecto.

Nuevamente, el efecto observado al utilizar ambos antimicrobianos en conjunto es el mismo que el del uso del péptido sólo. Por tanto, en las alteraciones en la viabilidad y el crecimiento no parece haber efecto sinérgico.

4.4. Ensayo de viabilidad mediante el método de *resting cells*

Como ya se ha mencionado, la ventaja de este método es que utiliza células con un pase previo donde las bacterias se encontrarán diluidas en un buffer y no en el medio. Se hizo así porque durante el transcurso del TFG, se observó que el medio C+Y provocaba la precipitación de los péptidos en alguna ocasión. De esta forma, las condiciones serán de máxima solubilidad para los péptidos.

4.4.1. EBA31, EBA27 y EBA18

En primer lugar se probaron los EBAs por separado, ya que se esperaba que pudiese haber algún cambio en la concentración a la cual estos compuestos inhiben el crecimiento de *S. pneumoniae*. En principio, para cada uno de los ésteres de aminas bíclicas se utilizaron tres concentraciones: una de ellas afectará significativamente la viabilidad y las otras dos afectarían en menor medida o nada. Por ello, se escogió utilizar: **EBA31 a 10, 1 y 0,1 μM ; EBA27 a 250, 100 y 70 μM ; EBA18 a 250, 150 y 75 μM** . Tras 180 desde la adición del compuesto, se tomaron muestras para llevar a cabo las viables en placas de agar sangre (**Figura 27**).

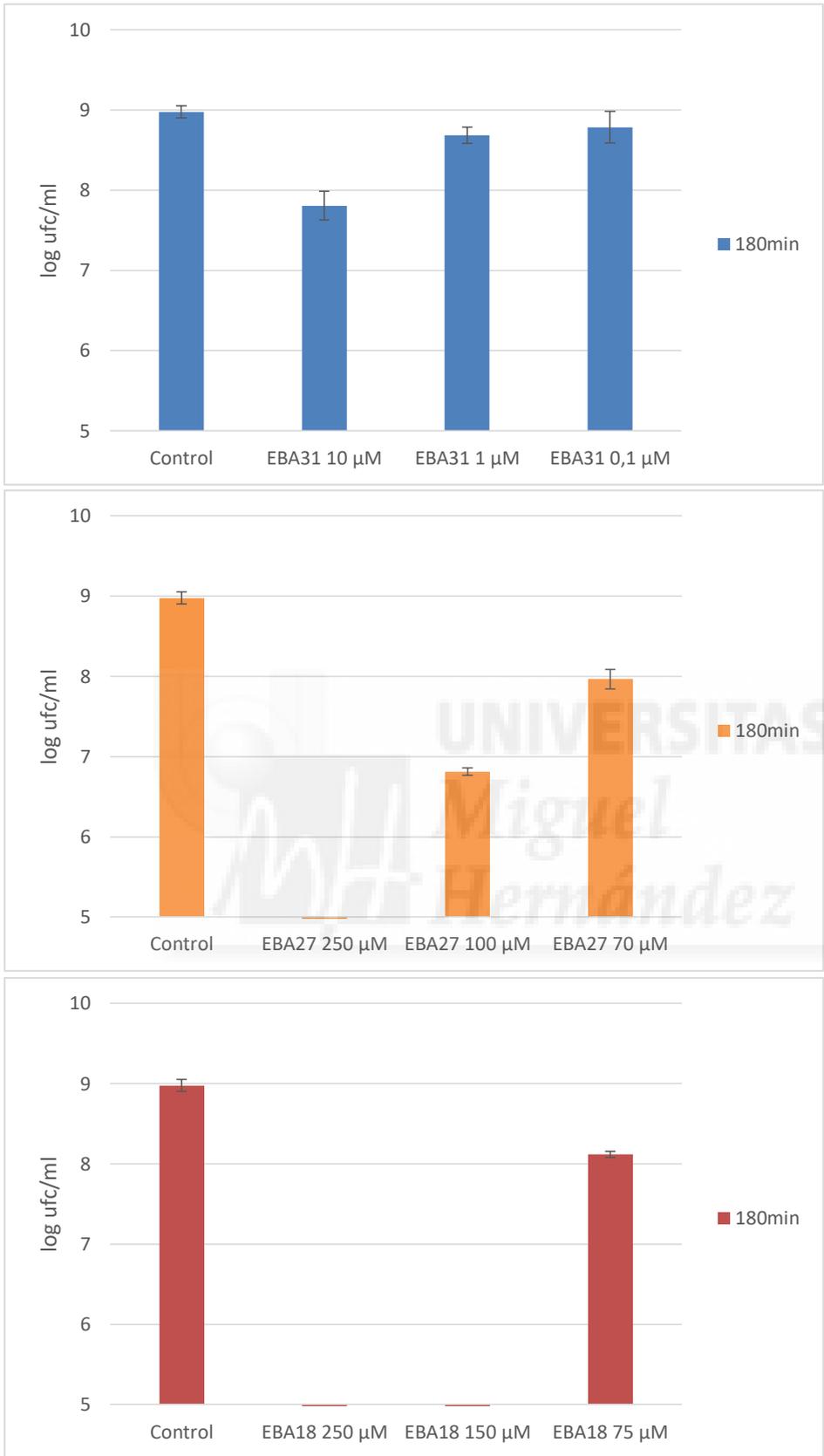


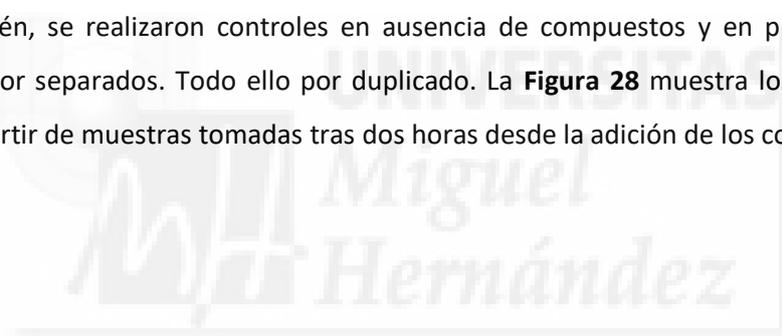
Figura 27: Efectos de los EBAS31, 27 y 18 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 180 desde el inicio del ensayo. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Como se observa en la **Figura 27**, los resultados de viabilidad son algo diferentes a los presentados con anterioridad, obtenidos con los ensayos de seguimiento de crecimiento. A excepción del EBA31, cuyos efectos son similares, con el EBA27 y el EBA18 se observa un mayor efecto en la viabilidad en las concentraciones cercanas probadas, demostrando que el medio C+Y podría estar interfiriendo en la solubilidad de los compuestos.

4.4.2. EBAs 31 y 27 con P3B y P3C

Una vez conocidas las concentraciones con efectos en la viabilidad con este método, se utilizaron concentraciones sin efecto de los EBAs 31 y 27, esto es, el **EBA31 a 1 μM y el EBA27 a 30 μM y a 10 μM , cada una con los péptidos P3B a 20 μM y P3C a 10 μM** . El motivo por el que se utilizan concentraciones de EBA 27 menores a las del ensayo anterior, es que el efecto sobre la viabilidad fue demasiado elevado. Por otra parte, no se utilizó EBA18 debido a que los resultados con este compuesto venían siendo menos prometedores que los del EBA27, por lo que se optó por utilizar dos concentraciones de éste.

También, se realizaron controles en ausencia de compuestos y en presencia de los compuestos por separados. Todo ello por duplicado. La **Figura 28** muestra los resultados de viabilidad a partir de muestras tomadas tras dos horas desde la adición de los compuestos.



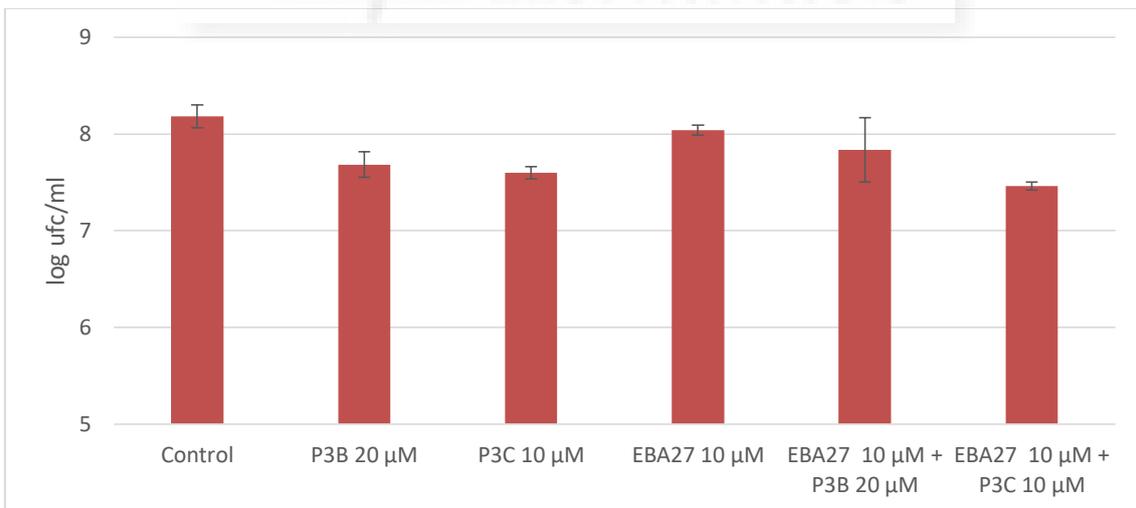
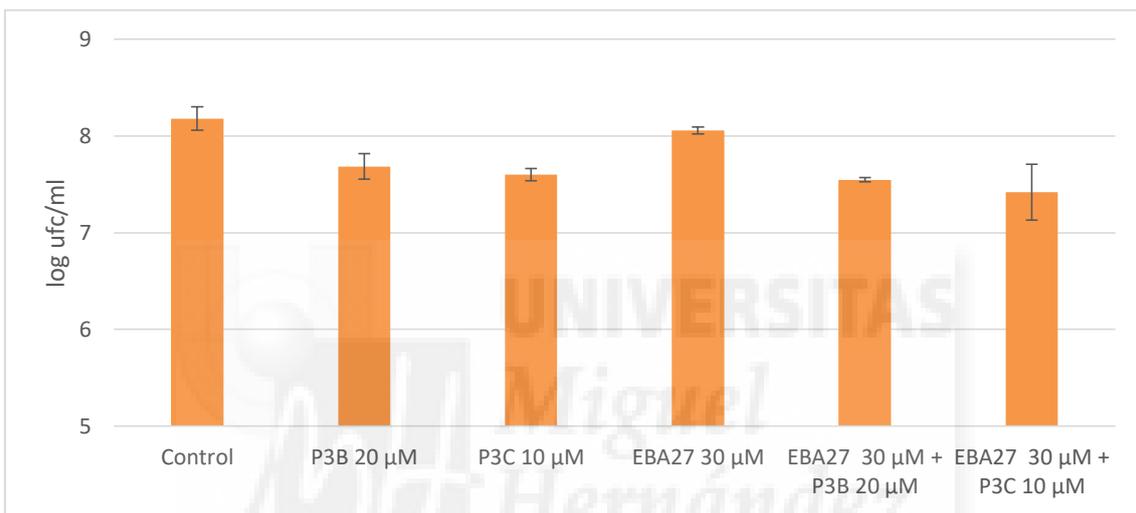
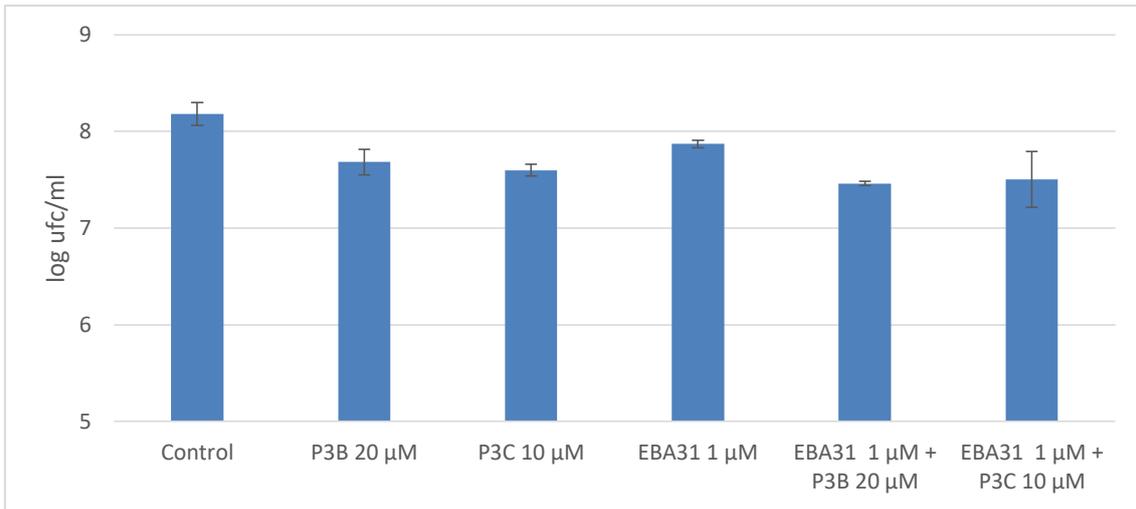


Figura 28: Efectos de los EBAs 31 y 27 (a dos concentraciones) en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 180 desde el inicio del ensayo. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

Los resultados muestran unos resultados coherentes con lo visto hasta ahora. En los cultivos donde se adicionó alguno de los péptidos (P3B y P3C) ya sean solos o con EBA, hay un ligero descenso en la viabilidad, pero no se aprecian diferencias significativas entre el uso de péptidos junto con EBAs respecto a los controles con únicamente péptido.

Con los resultados anteriores, se repitió el mismo ensayo pero disminuyendo a la mitad las concentraciones de EBA31, P3B y P3C, ya que el efecto en la viabilidad al usarlos en combinación parece ser causado en exclusividad por estos, apreciable al observar los controles. El uso de concentraciones menores permitiría apreciar mejor si hay sinergia, sin que en los efectos observados domine la acción de la alta concentración de estos compuestos mencionados.

Por tanto, se realizó un nuevo ensayo en el que se utilizó: el **EBA31 a 0,5 μ M, en combinación con los péptidos P3B a 10 μ M y P3C a 5 μ M**. En paralelo se realizaron los controles necesarios, todo por duplicado.

La **Figura 29** muestra los resultados de viabilidad a partir de muestras tomadas tras dos horas desde la adición de los compuestos. También se tomaron muestras para su observación en el microscopio confocal, obteniéndose las imágenes de la **Figura 30**.

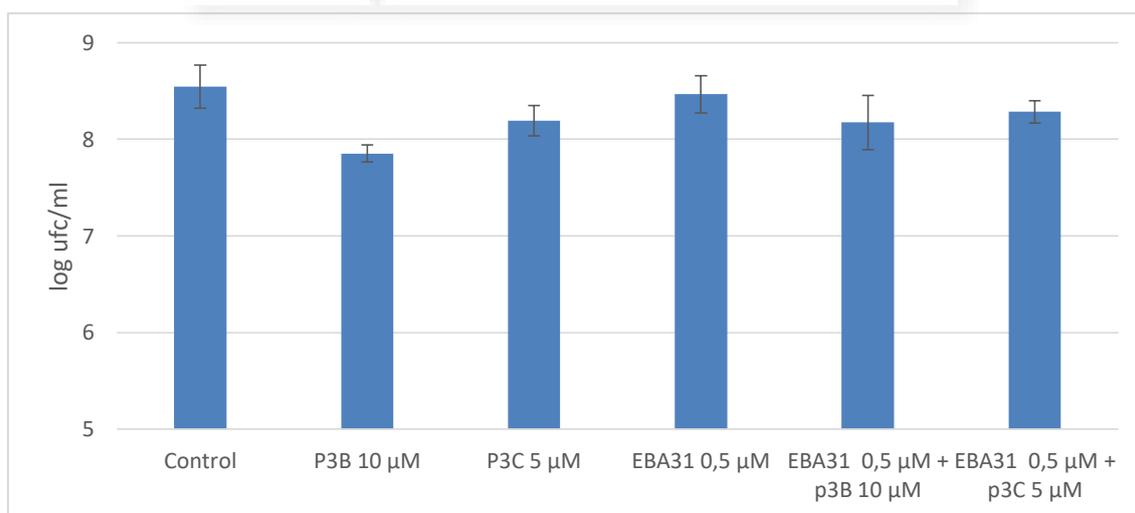


Figura 29: Efectos del EBAs 31 en la viabilidad celular de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por triplicado de muestras tomadas al minuto 180 desde el inicio del ensayo. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias de cada control frente la concentración de compuesto.

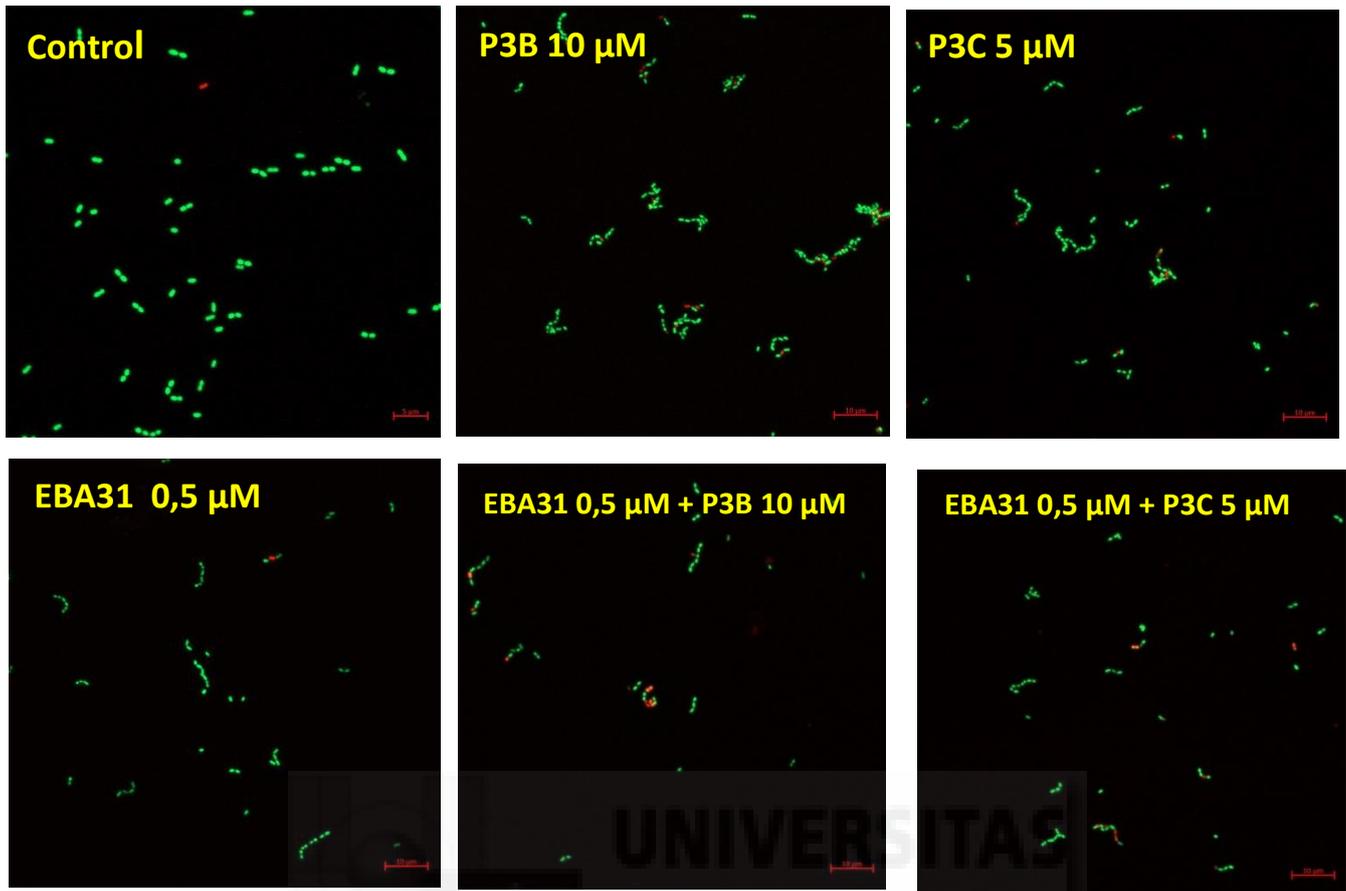


Figura 30: imágenes de microscopía confocal del cultivo de *Streptococcus pneumoniae* con EBA31 junto con P3B y P3C, tras 180 minutos desde la adición de los compuestos. Las bacterias viables aparecen de color verde, mientras que aquellas cuya membrana ha sido comprometida aparecen en rojo, debido a los fluorocromos utilizados.

Los resultados obtenidos en el ensayo (**Figura 29**) muestran una ligera disminución de la viabilidad en los cultivos donde se adicionó alguno de los péptidos, tanto con P3B como con P3C. Esto ocurre tanto en el uso de péptidos solos (en los controles) como con su uso combinado con el EBA31. Los cultivos donde se utilizaron ambos agentes antimicrobianos muestran unos resultados de viabilidad similares a los controles sólo con péptidos. Estos resultados concuerdan con los del ensayo anterior, demostrando de nuevo que la combinación de compuestos no origina resultados distintos a los que se obtiene en su uso por separado.

Por lo que respecta a las imágenes de la **Figura 30** obtenidas por microscopía confocal, se puede observar que no hay alteraciones llamativas en la viabilidad de *Streptococcus pneumoniae* tras su exposición al EBA31 y a los péptidos.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras los ensayos realizados, no se ha encontrado el efecto sinérgico que se buscaba entre el uso de EBAs y péptidos derivados de la tercera repetición de unión a colina de LytA, demostrado por el hecho de que el uso conjunto de ambos compuestos no tiene efectos adversos superiores sobre el crecimiento, viabilidad y morfología de *S. pneumoniae* que su uso por separado. Esto quiere decir que es posible que ambos antimicrobianos actúen por mecanismos similares.

Como fue descrito en la introducción, estos péptidos forman horquillas β en estado nativo, pero se ha visto que tienen capacidad de formar hélices anfipáticas e insertarse, por encima de una cierta concentración, en micelas de detergentes y en vesículas lipídicas (Zamora-Carreras y cols., 2015). Posiblemente el efecto sobre la viabilidad provocado por los péptidos sobre *S. pneumoniae* sea debido a daños en la membrana. Por otro lado, los EBAs, como se ha dicho en la introducción, no son meros análogos de colina porque ésta produce formación de cadenas pero sin afectar la viabilidad, mientras que los EBAs sí provocan muerte celular (Maestro y cols., 2007; Retamosa y cols., 2015), también observado en los ensayos realizados. Según Retamosa y cols., 2015, las partes aromáticas de las CBPs interactúan con las partes aromáticas y el grupo amonio de los EBAs. Es posible que estos grupos aromáticos puedan tener un segundo papel provocando daños en la membrana, al igual que hacen los péptidos.

De cara al futuro, una interesante proyección sería la realización de experimentos de interacción entre los EBAs y la membrana de *S. pneumoniae*, que puedan demostrar si los grupos aromáticos de estos compuestos son capaces de dañarla. También, sería de interés comprender mejor el mecanismo de acción de los péptidos y conformar si ocurre una inserción en la membrana, comprometiendo su estructura y causando daños. Asimismo, considerando el problemático panorama de las resistencias a antibióticos descrito en la introducción, se debe continuar con la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Blasi, F.; Mantero, M.; Santus, P.; Tarsia, P. *Understanding the burden of pneumococcal disease in adults*. Clin. Microbiol. Infect. 2012, 18 (Suppl. 5), 7–14.
2. OMS. *Weekly Epidemiological Record*; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, Suiza, 2007; pp. 93–104.
3. UNICEF. *Pneumonia: The Forgotten Killer Of Children*; Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia: New York, NY, USA, 2006.
4. Weil-Olivier, C.; van der Linden, M.; de Schutter, I.; Dagan, R.; Mantovani, L. *Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: A European perspective*. BMC Infect. Dis. 2012, 12, 207.
5. Alexandre, C.; Dubos, F.; Courouble, C.; Pruvost, I.; Varon, E.; *Hospital Network for Evaluating the Management of Common Childhood Diseases*; Martinot, A. *Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in Northern France: Effect of serotype replacement*. Acta Paediatr. 2010, 99, 1686–1690.
6. Coates, A.R.; Halls, G.; Hu, Y. *Novel classes of antibiotics or more of the same?* Br. J. Pharmacol. 2011, 163, 184–194.
7. Albrich, W.C.; Monnet, D.L.; Harbarth, S. *Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes*. Emerg. Infect. Dis. 2004, 10, 514–517.
8. Karlsson, C.; Jansson, P.E.; Skov Sorensen, U.B. *The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms. Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine*. Eur. J. Biochem. 1999, 265, 1091–1097.
9. Hakenbeck, R.; Madhour, A.; Denapate, D.; Bruckner, R. *Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in Streptococcus pneumoniae and commensal streptococci*. FEMS Microbiol. Rev. 2009, 33, 572–586.
10. Bergmann, S.; Hammerschmidt, S. *Versatility of pneumococcal surface proteins*. Microbiology 2006, 152, 295–303.
11. Maestro B, Sanz JM. *Choline binding proteins from Streptococcus pneumoniae: A dual role as enzybiotics and targets for the design of new antimicrobials*. Antibiotics (Basel) 2016; 5. pii: E21.
12. Lopez, R.; Garcia, E. *Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage*. FEMS Microbiol. Rev. 2004, 28, 553–580.
13. Moscoso, M.; Domenech, M.; Garcia, E. *Vancomycin tolerance in clinical and laboratory Streptococcus pneumoniae isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide*. Mol. Microbiol. 2010, 77, 1052–1064
14. Claverys, J.P.; Havarstein, L.S. *Cannibalism and fratricide: Mechanisms and raisons d'être*. Nat. Rev. Microbiol. 2007, 5, 219–229.
15. Howard, L.V.; Gooder, H. *Specificity of the autolysin of Streptococcus (diplococcus) pneumoniae*. J. Bacteriol. 1974, 117, 796–804
16. Li, Q.; Cheng, W.; Morlot, C.; Bai, X.H.; Jiang, Y.L.; Wang, W.; Roper, D.I.; Vernet, T.; Dong, Y.H.; Chen, Y.; *γ* cols. *Full-length structure of the major autolysin LytA*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2015, 71, 1373–1381.
17. Garcia, J.L.; Diaz, E.; Romero, A.; Garcia, P. *Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin*. J. Bacteriol. 1994, 176, 4066–4072.

18. Varea, J.; Saiz, J.L.; Lopez-Zumel, C.; Monterroso, B.; Medrano, F.J.; Arrondo, J.L.; Iloro, I.; Laynez, J.; Garcia, J.L.; Menendez, M. *Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase?* J. Biol. Chem. 2000, 275, 26842–26855.
19. Sanchez-Puelles, J.M.; Sanz, J.M.; Garcia, J.L.; Garcia, E. *Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases.* Gene 1990.
20. Martner, A.; Skovbjerg, S.; Paton, J.C.; Wold, A.E. *Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines.* Infect. Immun. 2009, 77, 3826–3837.
21. Monterroso, B.; Saiz, J.L.; Garcia, P.; Garcia, J.L.; Menendez, M. *Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1.* J. Biol. Chem. 2008, 283, 28618–28628.
22. Maestro, B.; Gonzalez, A.; Garcia, P.; Sanz, J.M. *Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines.* FEBS J. 2007, 274, 364–376.
23. de Gracia Retamosa, M.; Diez-Martinez, R.; Maestro, B.; Garcia-Fernandez, E.; de Waal, B.; Meijer, E.W.; Garcia, P.; Sanz, J.M. *Aromatic esters of bicyclic amines as antimicrobials against Streptococcus pneumoniae.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015, 54, 13673–13677.
24. Jia Jia, Feng Zhu, Xiaohua Ma, Zhiwei W. Cao, Yixue X. Li, Yu Zong Chen. *Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives.* Nature Reviews Drug Discovery. 2009, 8, 111-128.
25. S. Lacks, R. D. Hotchkiss. *A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus.* Biochim. Biophys. Acta 1960, 39, 508–517.
26. Zamora-Carreras, H., Maestro, B., Strandberg, E., Ulrich, A. S., Sanz, J. M. and Jiménez, M. Á. *Micelle-Triggered β -Hairpin to α -Helix Transition in a 14-Residue Peptide from a Choline-Binding Repeat of the Pneumococcal Autolysin LytA.* (2015). Chem. Eur. J., 21: 8076–8089.