

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Compuestos relacionados con ramoplanina
producidos por actinomicetos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Mercedes de la Cruz Moreno

Directores

**Francisca Vicente Pérez
José Fernando Reyes Benítez
José Rubén Tormo Beltrán**

Madrid



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

**COMPUESTOS RELACIONADOS CON RAMOPLANINA
PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por

Mercedes de la Cruz Moreno

Directores

Francisca Vicente Pérez
José Fernando Reyes Benítez
José Rubén Tormo Beltrán

Tutora

Rebeca María del Mar Alonso Monge

MADRID, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Mercedes de la Cruz Moreno,
estudiante en el Programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología,
de la Facultad de Farmacía de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

"Compuestos relacionados con ramoplanina producidos por actinomicetos"

y dirigida por: Francisca Vicente Pérez, José Fernando Reyes Benítez y José Rubén Tormo Beltrán

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 9 de julio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



Fundación MEDINA
Avda. de Conocimiento, 34
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
18016 Granada

Dña. **M.ª Francisca Vicente Pérez**, Jefa del Departamento de Screening y Validación de Dianas de la Fundación MEDINA, D. **José Fernando Reyes Benítez**, Jefe del Departamento de Química de la Fundación MEDINA y D. **José Rubén Tormo Beltrán**, Co-responsable de Área del Departamento de Química de la Fundación MEDINA

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada **“COMPUESTOS RELACIONADOS CON RAMOPLANINA PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS”** que presenta Dña. **Mercedes de la Cruz Moreno** para optar al grado de **Doctor por la Universidad Complutense de Madrid**, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro de Investigación Básica de España (CIBE) de Merck Sharp & Dohme de España S. A. y en el Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía (Fundación MEDINA), y que reúne los requisitos adecuados para su presentación a trámite, lectura y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado,

Granada, a 9 de julio de 2019

Fdo.: M.ª. Francisca Vicente Pérez Fdo.: José Fernando Reyes Benítez Fdo.: José Rubén Tormo Beltrán

A mis padres, a Pepe y a Pedro

Agradecimientos

Sin duda y por diferentes razones este ha sido el reto que, hasta el momento, más me ha costado realizar. Sé que sin los apoyos y las ayudas que he recibido no lo habría conseguido, y por eso en estas páginas quiero hacer llegar mi más profundo agradecimiento a quienes han contribuido de una forma u otra a que esta Tesis Doctoral sea una realidad. Pido disculpas de antemano a los que por descuido olvide nombrar.

En primer lugar, a Francisca Vicente, Fernando Reyes y Rubén Tormo, directores de este trabajo que además de guiarme, enseñarme, y asesorarme a nivel científico en esta investigación, me han respaldado y apoyado incondicionalmente en todo momento. Y también a Olga Genilloud, directora de la Fundación MEDINA, por contar conmigo para formar parte del equipo de la Fundación y por permitirme continuar y concluir este proyecto facilitándome todos los recursos que he necesitado.

En segundo lugar, a las personas que decidieron darme la primera oportunidad cuando recién acabadas mis prácticas universitarias surgió la inimaginable posibilidad de trabajar en CIBE. A Fernando Peláez, director del Centro y a quien desde entonces es mi jefa Francisca Vicente. Es increíble mirar atrás y darse cuenta del tiempo que ha pasado.

Con mucho cariño recuerdo a todos mis compañeros y compañeras de CIBE y a todos ellos estoy agradecida por lo mucho que me enseñaron y por ayudarme en los inicios de esta tesis, porque de allí es su origen. Quiero dedicar un gracias muy especial a Cartu, por su alegría, por su gran corazón y por ser un modelo de disciplina, de superación y de perfección en el trabajo, no he podido tener mejor maestra en todos los sentidos. Y cómo no, a Manolo, Ángela y Antonio por su amistad y por apoyarme durante mis primeros pasos profesionales.

De igual manera quiero dar las gracias a todos y cada uno de mis compañeros y compañeras de MEDINA. No hay nadie que no me haya dado ánimos y no haya estado dispuesto a colaborar en lo que fuera necesario. Especialmente a Nacho, Sara, Mar y Marina del departamento de Microbiología y a Nouredine, Jesús, Ignacio, Isa, Paqui y Carlos del departamento de Química. Y, por supuesto a Cari, Ángeles, Pili, Patricia y Ariadna con quienes trabajo codo con codo en el departamento de Screening, por su buen hacer en el laboratorio y sobre todo por su paciencia conmigo, por su buen

talante, y por su apoyo sincero y absoluto. También a Germán por su amabilidad y ayuda con todo lo relacionado con la informática, y a Nathalie y a Imane por estar pendientes de mí y animarme cuando lo he necesitado.

Además, quiero dar las gracias a Diana, Yolanda y Elena porque a pesar de la distancia las siento cerca y a Trini, que ha estado a mi lado en los momentos más críticos y por sus lecciones de fuerza de voluntad.

Las palabras de agradecimiento más bonitas querría dedicárselas a mis padres. Me emociona imaginar lo orgullosos que se van a sentir el día que defienda esta tesis. Y gracias al resto de mi familia: a mi hermano, Toñi, Lucía y Elena; a Manuela y Bruno; a Mayte, Manuel, Diego, Clara y Miguel; a Lola por ser mi mejor fan; y a Pepe porque, aunque ahora no lo recuerde, fue en realidad el fundador de mi club de fans.

Las últimas líneas las he reservado para, desde el rincón más especial de mi corazón, darles las gracias a Pepe y a Pedro por su cariño, por su apoyo, por su humor siempre, y por ser parte de lo que le da sentido a todo.

ÍNDICE

1 RESUMEN/SUMMARY	27
2 INTRODUCCIÓN	37
2.1 LOS PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE NUEVOS MEDICAMENTOS.	39
2.1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS	39
2.1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN MICROBIANO	45
2.1.2.1 Proceso de descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales de origen microbiano	47
2.1.3 LOS ACTINOMICETOS	48
2.2 LOS ANTIBIÓTICOS	51
2.2.1 LOS ANTIBIÓTICOS: BREVE HISTORIA.....	51
2.2.2 MODOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	54
2.2.3 SÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO	58
2.2.3.1 Antibióticos que inhiben la primera etapa de la biosíntesis del PG..	60
2.2.3.2 Antibióticos que inhiben la segunda etapa de la biosíntesis del PG.	64
2.2.3.3 Antibióticos que inhiben la tercera etapa de la biosíntesis del PG...	66
2.2.4 RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS.....	72
2.3 NUEVAS DIANAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE ANTIBIÓTICOS	77
2.3.1 EL LÍPIDO II COMO DIANA DE ANTIBIÓTICOS.....	77
2.3.2 EL SISTEMA LiaRS.....	82
2.3.2.1 Los sistemas de dos componentes en bacterias	82
2.3.2.2 Sistema LiaRS de dos componentes	85
2.4 LAS RAMOPLANINAS.....	87
2.4.1 INTRODUCCIÓN	87
2.4.2 DESCUBRIMIENTO	89
2.4.3 ESTRUCTURA	89
2.4.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	92
2.4.5 RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (REA)	95
2.4.6 MECANISMO DE ACCIÓN.....	97
2.4.7 BIOSÍNTESIS	98
2.4.8 ENSAYOS CLÍNICOS.....	100
3 OBJETIVOS	103

3.1	OBJETIVOS.....	105
3.1.1	ANTECEDENTES	105
3.1.2	OBJETIVO GENERAL.....	105
3.1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	105
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
4.1	COLECCIÓN DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES	109
4.1.1	COLECCIÓN DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES	109
4.2	BIOENSAYOS	110
4.2.1	ENSAYO DE CRIBADO LiARS EN AGAR	110
4.2.1.1	Esquema general del proceso de cribado de alto rendimiento	111
4.2.2	ENSAYO DE MARCAJE DE MACROMOLÉCULAS.....	112
4.2.3	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	113
4.2.3.1	Actividad frente a bacterias Gram-negativas.....	114
4.2.3.1.1	Acinetobacter baumannii, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa	114
4.2.3.2	Actividad frente a bacterias Gram-positivas	115
4.2.3.2.1	Staphylococcus aureus sensible a meticilina, Staphylococcus aureus resistente a meticilina y Enterococcus faecalis	115
4.2.3.3	Actividad frente a levadura	115
4.2.3.3.1	Candida albicans.....	115
4.2.3.4	Actividad frente a hongo filamentoso.....	116
4.2.3.4.1	Aspergillus fumigatus	116
4.2.3.5	Test de concentraciones mínimas inhibitorias.....	116
4.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU ACTIVIDAD EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO	117
4.3.1	ORIGEN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	117
4.3.2	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS SELECCIONADAS	117
4.3.3	TÉCNICAS GENOTÍPICAS BASADAS EN LOS PERFILES PCR- <i>fingerprinting</i>	118
4.3.3.1	Extracción de ADN.....	118
4.3.3.2	PCR- <i>fingerprinting</i> : REP-PCR y BOX-PCR	118
4.3.3.3	Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS	120
4.3.3.4	Digestión con Hin F1 de productos de amplificación del sistema NRPS 121	
4.3.4	ANÁLISIS DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS	121
4.3.4.1	Geles de agarosa	121

4.3.4.2	DNA chips	121
4.3.5	SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S ARNr Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	122
4.3.6	ANÁLISIS DE <i>CLUSTERS</i> SEGÚN LOS PATRONES DE AMPLIFICACIÓN O DE DIGESTIÓN (PCR- <i>fingerprinting</i>).....	123
4.3.6.1	Estimación de la diversidad de las cepas seleccionadas	123
4.4	FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS: PEQUEÑA, MEDIANA Y GRAN ESCALA.....	125
4.4.1	CULTIVO DE LAS CEPAS	125
4.4.2	FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS	126
4.5	EXTRACCIÓN DE LAS FERMENTACIONES: PEQUEÑA, MEDIANA Y GRAN ESCALA	127
4.5.1	EXTRACCIÓN DE LAS FERMENTACIONES.....	127
4.5.2	EXTRACCIÓN CON ACETONA A PEQUEÑA ESCALA.....	128
4.5.3	EXTRACCIÓN CON BUTANOL A MEDIA ESCALA.....	128
4.5.4	EXTRACCIÓN CON BUTANOL A GRAN ESCALA	129
4.6	DESREPLICACIÓN QUÍMICA MEDIANTE HPLC-MS.....	130
4.7	FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS A MEDIA Y GRAN ESCALA	132
4.7.1	FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN POR HPLC	132
4.8	PURIFICACIÓN DE RAMOPLANINAS A PARTIR DE LA CEPA CA-178528	133
4.8.1	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	133
4.8.2	FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN	134
4.8.3	ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE NUEVAS RAMOPLANINAS	135
4.9	ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO.....	136
4.9.1	ENSAYO DE DETECCIÓN DE INHIBICIÓN DE CITOCROMOS POR LC-MS ..	136
4.9.2	CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	139
4.9.2.1	Ensayo colorimétrico de reducción de MTT.....	139
4.9.3	TOLERABILIDAD LOCAL.....	141
4.9.3.1	Actividad hemolítica <i>in vitro</i>	141
5	RESULTADOS	143
	ESQUEMA GENERAL DEL FLUJO DE TRABAJO DESARROLLADO EN LA TESIS.....	145
5.1	PROCESO DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO	146
5.1.1	ENSAYO “LiaRS”	146
5.1.1.1	Validación del ensayo LiaRS	147

5.1.2	CRIBADO PARA LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DEL LÍPIDO II	149
5.2	CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO	151
5.2.1	ENSAYO DE MARCAJE DE MACROMOLÉCULAS (<i>Labeling</i>)	151
5.2.2	DESREPLICACIÓN MEDIANTE LC-MS	152
5.3	CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	153
5.3.1	ORIGEN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	153
5.3.2	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.....	154
5.4	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS.....	156
5.4.1	FERMENTACIONES A PEQUEÑA ESCALA	156
5.4.1.1	Extracción con acetona	157
5.4.1.2	Confirmación de la actividad biológica en el ensayo LiaRS.....	157
5.4.1.3	Perfil de actividad antimicrobiano	159
5.4.1.4	Perfil químico (LCMS/HRMS)	161
5.4.2	REFERMENTACIONES A MEDIA ESCALA	163
5.4.2.1	Extracción con acetona	164
5.4.2.2	Actividad biológica de los extractos de acetona en el ensayo LiaRS 165	
5.4.2.3	Estudio de los extractos de acetona por metabolómica.....	165
5.4.2.4	Extracción con butanol.....	165
5.4.2.5	Actividad biológica de los extractos de butanol en el ensayo LiaRS 166	
5.4.2.6	Estudio de los extractos de butanol por LC-MS (METABOLÓMICA) 168	
5.4.2.7	Perfil antimicrobiano de los extractos de butanol.....	168
5.4.2.8	Perfil citotóxico de los extractos de butanol.....	171
5.5	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU ACTIVIDAD EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO	173
5.5.1	SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S ARNr	173
5.5.2	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS IDENTIFICADAS.....	175
5.5.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE PERFILES DE AMPLIFICACIÓN (<i>fingerprinting</i>).....	177
5.5.3.1	Técnica BOX-PCR.....	178

5.5.3.2	Técnica REP-PCR	180
5.5.3.3	Comparación de las técnicas utilizadas	182
5.5.3.4	Estimación de la diversidad de las cepas	182
5.5.4	DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE GENES BIOSINTÉTICOS: PKS-I, PKS-II Y NRPS.....	183
5.5.4.1	Perfiles de digestión con enzima <i>HinF1</i> de los productos de amplificación del sistema NRPS	185
5.6	FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO DE LOS EXTRACTOS.....	187
5.6.1	SELECCIÓN DE EXTRACTOS PARA FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO	187
5.6.2	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FRACCIONAMIENTOS EN EL ENSAYO LiaRS	188
5.6.3	ANÁLISIS DE FRACCIONES ACTIVAS MEDIANTE LC-HRMS: METABOLÓMICA	192
5.7	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2	195
5.7.1	PURIFICACIÓN DE NUEVO ANÁLOGO A PARTIR DE LA CEPA CA-178528	195
5.8	ESTRUCTURA DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2.....	205
5.8.1	ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ANÁLOGO “Ramoplanina_2572”	205
5.9	PERFIL BIOLÓGICO DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2.....	207
5.9.1	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>C. difficile</i> , <i>SARM</i> , <i>E. faecalis</i> Y <i>E. faecium</i>	207
5.9.1.1	<i>Clostridium difficile</i> (<i>Clostridioides difficile</i>)	207
5.9.1.2	<i>SARM</i> , <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	209
5.10	PERFIL FARMACOLÓGICO DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2.....	214
5.10.1	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CITOCROMOS	214
5.10.2	CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	219
5.11	TOLERABILIDAD LOCAL <i>IN VITRO</i>	222
5.11.1	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	222
6	DISCUSIÓN.....	224
6.1	RAMOPLANINA: ANTIBIÓTICO DE GRAN INTERÉS.....	226
6.2	ENSAYO DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO.....	227
6.2.1	VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO LiaRS.....	227
6.3	EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MICROBIANO COMO FUENTE DE NUEVOS ANÁLOGOS DE RAMOPLANINA	228

6.4 ACTINOMICETOS: PRODUCTORES DE RAMOPLANINA Y NUEVOS ANÁLOGOS	229
6.4.1 DIVERSIDAD DE LAS CEPAS SELECCIONADAS Y POTENCIAL BIOSINTÉTICO	230
6.5 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS.....	232
6.5.1 FERMENTACIONES DE PEQUEÑA ESCALA	232
6.5.2 FERMENTACIONES DE MEDIANA ESCALA	233
6.5.2.1 Extracción con butanol.....	234
6.6 PROCESO DE FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO	235
6.7 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL NUEVO ANÁLOGO	236
6.8 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y FARMACOLÓGICAS DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA.....	238
6.8.1 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	238
6.8.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	239
6.8.2.1 Inhibición del citocromo P450	239
6.8.2.2 Citotoxicidad <i>in vitro</i>	240
6.8.2.3 Actividad hemolítica <i>in vitro</i>	240
7 CONCLUSIONES.....	242
8 BIBLIOGRAFÍA.....	247
9 ANEXOS.....	281
10 ARTÍCULO	307

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AMBA	del inglés 2-Amino-3-methylaminobutanoic Acid (Ácido 2-amino-3-N-metilaminobutírico)
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ARNP	ARN polimerasa
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosómico
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
BHI	del inglés Brain Heart Infusion (extracto de cerebro y corazón de ternera)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (herramienta informática de alineamiento de secuencias (ADN o proteínas) de tipo local)
BSA	del inglés Bovine Serum Albúmine (Sero albúmina bovina)
°C	Grados centígrados
CDR	Curva Dosis Respuesta
Chp	Clorhidroxifenilglicina
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50%
CLSI	del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria

CYP450	Citocromo P450
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DAD	del inglés Diode Array Detector (Detector de diodos)
DE ₅₀	Dosis efectiva al 50%
Dhpg	Dihidroxifenilglicina
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato (monómeros del ADN), desoxiadenilato trifosfato (dAMP), desoxitimidilato trifosfato (dTMP), desoxicitidilato trifosfato (dCMP), desoxiguanilato trifosfato (dGMP)
EDTA	del inglés Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
ERV	enterococos resistentes a vancomicina
EtOAc	Acetato de etilo
EUCAST	del inglés European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	del inglés Food and Drug Administration
FAO	del inglés Food and Agriculture Organization
g/L	cantidad de gramos por unidad de volumen en litros
GlmM	Fosfoglucosaminamutasa
GlmS	Glucosamina-6-P-Sintetasa
GlmU	Glucosamina-1-P-acetiltransferasa
h	hora
Hpg	Hidroxifenilglicina
HK	Histidina quinasa

HLM	del inglés Human Liver Microsoms (Microsomas hepáticos humanos)
HPLC	del inglés High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
HRMS	del inglés High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometría de masas de alta resolución)
HTS	del inglés High-Throughput Screening (criado de alto rendimiento)
I+D	Investigación y Desarrollo
ICD	Infecciones por <i>Clostridium difficile</i>
IDSA	del inglés Infectious Diseases Society of America
Kb	Kilobase
KDO	Ácido 3-desoxi-D-mono-oct-2-ulosómico
Kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Luria Bertani (medio de cultivo LB)
LCMS	del inglés Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Cromatografía Líquida a coplada a la espectrometría de Masas)
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
Lys	Lisina
µg	migramo
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micra

MEM	Medio Esencial Mínimo
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MMS	Metil-metanosulfonato
MoA	Modo de Acción
MRM	Monitorización de múltiples reacciones
MRSA	del inglés Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina)
MSSA	del inglés Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina)
MS	del inglés Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas)
NCLCS	del inglés National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	nanogramo
NGS	del inglés Next-Generation Sequencing (siguiente generación de secuenciación)
NJ	Neighbour Joining (algoritmo de distancias)
nm	nanómetro
NRPS	del inglés Nonribosomal Peptide Synthetase (sintetasa de péptidos no ribosomales)
nt	nucleótido
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud

ORF	del inglés Open Reading Frame (Fase de Lectura Abierta)
Orn	Ornitina
OTU	del inglés Operational Taxonomic Unit (Unidad Taxonómica Operacional)
pb	pares de bases
PBP	del inglés Penicillin Binding Protein
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PG	Peptidoglicano
Phe	Fenilalanina
PKS	del inglés Polyketide Synthase (sintasa de policétidos)
PM	Peso Molecular
PNs	Productos Naturales
ppb	partes por billón
PUM	Pseudouridimicina
REA	Relación estructura-actividad
REP-PCR	del inglés Repetitive Extragenic Palindromic-PCR
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	revoluciones por minuto
RR	Reguladores de Respuesta
SDA	del inglés Sabouraud Dextrose Agar (Sabouraud con dextrosa y agar)
SDB	del inglés Sabouraud Dextrose Broth (Sabouraud con dextrosa)
SDS	del inglés Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato sódico)

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
sp.	especie
spp.	especies
T	temperatura
TA	del inglés Teichoic Acid (Ácido teicoico)
TCA	del inglés Trichloroacetic acid (Ácido tricloroacético)
Taq pol	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TFA	del inglés Trifluoroacetic Acid (ácido trifluoroacético)
TGH	Tranferencia Génica Horizontal
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPGMA	del inglés Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (agrupamiento por pares no ponderado con media aritmética)
UV	Ultravioleta
Val	Valina
WBE	del inglés Whole Broth Equivalent
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YME	Yeast Malt Extract (medio de cultivo con Extracto de Malta)

1 RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

COMPUESTOS RELACIONADOS CON RAMOPLANINA PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS

Las ramoplaninas son una familia de antibióticos de tipo lipoglicodepsipéptido, de síntesis no ribosomal, estructuralmente relacionadas con los lipodepsipéptidos janiemicina, enduracidina y daptomicina, y funcionalmente con los glicopéptidos vancomicina y teicoplanina, así como con los lantibióticos mersacidina, actagardina, nisina y epidermina.

La ramoplanina A2 fue descubierta a partir de una fermentación de la cepa *Actinoplanes* ATCC33076, aislada de una muestra de suelo recogida en la India, y como componente mayoritario de una mezcla de 3 compuestos (A1, A2 y A3) que estructuralmente solo se diferencian en la cadena lipídica que se encuentra en el residuo de Asn¹ N-terminal, y que presentan actividades antimicrobianas virtualmente indistinguibles.

La ramoplanina A2 es un prometedor candidato a fármaco ya que presenta actividad frente a bacterias Gram-positivas aerobias y anaerobias resistentes a antibióticos como glicopéptidos, macrólidos y penicilinas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, streptococos, enterococos resistentes a vancomicina, *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, y *Clostridium difficile*. Además, inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose al transportador lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, y no es susceptible de los mismos mecanismos de resistencia que la vancomicina ya que el sitio de unión al transportador lipídico de ambos antibióticos es diferente.

Pese a ser un compuesto tan interesante tanto su aprobación como su uso clínico se han visto obstaculizados por la actividad hemolítica que presenta cuando se administra por vía intravenosa. Como consecuencia de esta limitación, encontrar nuevos análogos que puedan salvar este inconveniente se hace necesario.

Partiendo del potencial biosintético de los microorganismos, se realizó un ensayo mediante cribado de alto rendimiento de 37,000 extractos de la colección de Productos Naturales pertenecientes a la Fundación MEDINA usando como diana el

transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano con el objetivo de encontrar compuestos relacionados en actividad biológica o estructura química con las ramoplaninas y confirmar si estos tenían o no propiedades mejoradas tanto a nivel de actividad antimicrobiana como a nivel farmacológico y de tolerabilidad local, especialmente con respecto a su actividad hemolítica.

Con un ensayo de marcaje radiactivo de macromoléculas y mediante el análisis de los extractos por cromatografía líquida y espectrometría de masas de baja y alta resolución se corroboró, por una parte, si los extractos eran verdaderos inhibidores de la síntesis del peptidoglicano y, por otra, si su perfil químico sugería la presencia de compuestos relacionados con la clase estructural de las ramoplaninas.

Siguiendo esta estrategia se seleccionaron 71 extractos que procedían de la fermentación en diferentes medios de cultivo de un total de 49 cepas de actinomicetos aisladas a partir de muestras ambientales recogidas en diferentes partes del mundo.

Estas cepas fueron estudiadas en mayor profundidad para determinar su taxonomía, su relación filogenética y su diversidad. El grupo taxonómico más abundante fue la familia *Micromonosporaceae*. El resto de las cepas se distribuyeron en tres familias distintas: *Streptomycetaceae*, *Pseudonocardiaceae* y *Nocardiaceae*. Del análisis de la presencia y distribución de sistemas biosintéticos se obtuvieron altas frecuencias de amplificaciones específicas positivas para NRPS y PKS-I y significativamente bajas para PKS-II. Además, los resultados obtenidos mediante las técnicas BOX-PCR y REP-PCR resaltaron la elevada diversidad del grupo taxonómico mayoritario.

Además, se caracterizó el perfil de actividad antimicrobiano de los extractos frente a un panel de microorganismos formado por tres bacterias Gram-positivas, tres bacterias Gram-negativas, una levadura y un hongo. De los resultados de estos ensayos se confirmó que la mayor parte de los extractos seleccionados tenían un perfil de actividad antimicrobiano similar al de las ramoplaninas.

Posteriormente, dado el pequeño volumen que de los extractos contiene la colección, se prepararon nuevas fermentaciones a pequeña y mediana escala para tener material suficiente con el que poder realizar la identificación química y el aislamiento de los compuestos de interés.

Se confirmó el perfil químico y la actividad antimicrobiana de los nuevos extractos, así como su citotoxicidad, y se seleccionaron los 36 mejores para fraccionamiento guiado por bioensayo mediante HPLC semipreparativo, intentando escoger al menos un representante de cada familia de microorganismos identificada.

La mayoría de los fraccionamientos presentaron zonas de actividad en el intervalo comprendido entre las fracciones 40 y 48. Solo en el caso de los fraccionamientos de los extractos de las familias *Pseudonocardiaceae* y *Streptomycetaceae*, las fracciones activas se observaron desplazadas. Se eligieron las fracciones activas que mayor actividad presentaron y se analizaron por HRMS para asociar la presencia de los diferentes valores de m/z característicos de las moléculas relacionadas con las ramoplaninas con los picos de los perfiles cromatográficos de cada fraccionamiento.

De la cepa CA-178528 se consiguió obtener una fracción en la que se detectaron dos compuestos de peso molecular 2572 y 2556. El compuesto con peso molecular 2572 pudo ser purificado, aislado, y su estructura elucidada por comparación de sus espectros con los de un patrón de ramoplanina A2.

El nuevo análogo comparte las características estructurales de la ramoplanina A2, salvo el aminoácido de la posición 13 que en vez de ser hidroxifenilglicina (Hpg¹³) es dihidroxifenilglicina (Dhpg¹³) y el aminoácido de la posición 15 que en vez de ser leucina (Leu¹⁵) es valina (Val¹⁵). Ambos compuestos también se diferencian en la cadena alifática lateral, que es saturada y con un carbono adicional en el caso de la ramoplanina_2572.

Se estudiaron las propiedades antimicrobianas y farmacológicas del nuevo compuesto en comparación a la ramoplaina A2. En todos los casos se obtuvieron resultados muy similares excepto en los ensayos de actividad hemolítica donde los valores que presentó el nuevo análogo fueron muy inferiores a los de la ramoplanina A2.

Afortunadamente, estamos ante un nuevo compuesto potencialmente capaz de sortear la limitación de la tolerabilidad local de la ramoplanina A2, y con el que merece la pena seguir realizando investigaciones adicionales.

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede inferir que la producción de ramoplanina y sus análogos está relativamente extendida entre los actinomicetos.

Sin duda, los resultados obtenidos apoyan la idea de que los extractos de productos naturales de origen microbiano son una importante fuente de compuestos con actividad biológica. También demuestran que combinar nuevas estrategias de *screening* con librerías de productos naturales es un buen método para encontrar fármacos frente a patógenos resistentes.

SUMMARY

COMPOUNDS RELATED TO RAMOPLANIN PRODUCED BY ACTINOMYCETES

Ramoplanins are a family of lipoglycopeptide antibiotics, of non-ribosomal synthesis (NRPS), structurally related to the lipopeptides janiemycin, enduracidin and daptomycin, and functionally related to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin, as well as with the lantibiotics mersacidin, actagardine, nisin and epidermin.

Ramoplanin A2 was discovered from a fermentation broth of *Actinoplanes* ATCC33076, isolated from a soil sample collected in India, as a major component of a mixture of 3 compounds (A1, A2 and A3) that structurally only differ in the lipid chain found in the N-terminal Asn¹ residue, and whose antimicrobial activities are virtually indistinguishable.

Ramoplanin A2 is a promising drug candidate since it is active against aerobic and anaerobic Gram-positive bacteria resistant to antibiotics such as glycopeptides, macrolides and penicillins, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, streptococci, vancomycin-resistant enterococci, *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Clostridium difficile*. Furthermore, it inhibits the synthesis of the bacterial cell wall by binding to the lipid II transporter of peptidoglycan biosynthesis and it is not susceptible to the same resistance mechanisms as vancomycin because the binding site to the lipid transporter of both antibiotics is different.

Although being an interesting compound, both its approval and its clinical use have been limited by the hemolytic activity it presents when it is administered intravenously. As a consequence of this limitation, finding new analogs that overcome this inconvenience becomes necessary.

Based on the biosynthetic potential of microorganisms, a total of 37,000 extracts from the Natural Products collection belonging to the Fundación MEDINA were tested in a High-Throughput Screening assay whose target is the lipid transporter of peptidoglycan biosynthesis, with the objective of finding compounds related in biological activity or chemical structure with ramoplanins and confirm whether these compounds showed or not improved antimicrobial and pharmacological properties including local tolerability, especially regarding hemolytic activity.

Both, macromolecular labeling assay and liquid chromatography hyphenated to low and high resolution mass spectrometry (LCMS and HRMS), were used to verify whether the extracts were true inhibitors of peptidoglycan biosynthesis and if their chemical profile suggested the presence of compounds related to the structural class of ramoplanins.

According to this strategy, a total of 71 extracts were selected which arose from the fermentation broth in different culture media of 49 strains of actinomycetes isolated from environmental samples collected worldwide.

These strains were further studied to determine their taxonomy, their phylogenetic relationship and their diversity. The most abundant taxonomic group was the *Micromonosporaceae* family. The rest of the strains were distributed in three different families: *Streptomycetaceae*, *Pseudonocardiaceae* and *Nocardiaceae*. From the analysis of the presence and distribution of biosynthetic systems, high frequencies of positive specific amplifications for NRPS and PKS-I were obtained while significantly lower for PKS-II. Additionally, the results obtained through the BOX-PCR and REP-PCR techniques pointed out the high diversity of the majority taxonomic group.

Furthermore, the antimicrobial activity profile of the extracts was characterized against a panel of microorganisms including three Gram-positive bacteria, three Gram-negative bacteria, one yeast and one fungus. From the results of these tests, it was confirmed that most of the selected extracts had an antimicrobial activity profile similar to that of ramoplanins.

Subsequently, given the small volume of the extracts contained in the collection, new fermentations were prepared at small and medium scale to have enough material for the chemical identification and isolation of the compounds of our interest.

The chemical profile and the antimicrobial activity of the new extracts were confirmed, as well as their cytotoxicity, and the 36 best ones were selected for semi-preparative HPLC bioassay-guided fractionation choosing at least one representative of each family of microorganisms identified.

Most of the chromatographic profiles displayed active zones between fractions 40 and 48. Only in the case of the extracts from *Pseudonocardiaceae* and *Streptomycetaceae* families, the active fractions were in a different zone. The active fractions with the highest activity were chosen and analyzed by HRMS to associate the presence of the different values of characteristic m/z of the molecules related to the ramoplanins with the peaks of the chromatographic profiles of each fractionation.

From strain CA-178528 a fraction was obtained in which two compounds of molecular weights 2572 and 2556 were detected. The compound with molecular weight 2572 could be purified and isolated, and its structure elucidated by comparison with a standard of ramoplanin A2.

The new analogue shares the structural features of ramoplanin A2, except for the amino acid at position 13 which instead of being hydroxyphenylglycine (Hpg¹³) is dihydroxyphenylglycine (Dhpg¹³) and the amino acid at position 15 instead of being leucine (Leu¹⁵) is valine (Val¹⁵). They also differ in the lateral aliphatic chain, which is saturated and longer in one methylene in the case of ramoplanina_2572.

Antimicrobial and pharmacological properties of the new compound were studied in comparison to ramoplanin A2. Very similar results were obtained in all the cases, except for the hemolytic activity test where the values showed by the new analogue were much lower than those of ramoplanin A2.

Certainly, this is a new analog potentially capable of avoiding the limitation of the local tolerability of ramoplanin A2, and with which it is worthwhile to continue carrying out additional research.

Our results additionally suggest that the production of ramoplanin analogs is widespread within the actinomycetes, especially among strains of the family *Micromonosporaceae*.

The results obtained in this thesis also support the fact that natural products of microbial origin are an unlimited source of compounds with biological activity. They also demonstrate the power of using novel screening strategies that combine new knowledge in biotechnology with libraries of natural products in order to find new drug candidates against multi-drug resistance pathogens.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 LOS PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE NUEVOS MEDICAMENTOS

2.1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

La naturaleza, por su extraordinaria diversidad, constituye una fuente inagotable de productos naturales biológicamente activos. Muchos de los beneficios de estos productos naturales como antimicrobianos, insecticidas y antioxidantes son conocidos y utilizados desde la antigüedad y sus propiedades han ido transmitiéndose de generación en generación basadas en la experiencia adquirida sobre su uso a lo largo de la historia. No obstante, su descubrimiento se fundamentaba en la intuición y la casualidad en la mayoría de los casos. El desarrollo de la química desde principios del siglo XIX hasta la actualidad ha permitido aislar y caracterizar los componentes responsables de los efectos beneficiosos de estos productos. Así, hoy en día, al hablar de productos naturales (PNs) se hace referencia a todos aquellos compuestos orgánicos de bajo peso molecular (no más de 3000 Da), procedentes del metabolismo secundario de los seres vivos, que no son esenciales para el organismo que los produce, ya sea hongo, bacteria, planta, invertebrado marino o insecto. Por lo general, se originan en familias de moléculas relacionadas químicamente dentro de cada organismo, son dependientes de las condiciones de crecimiento, y suelen ser específicos de un grupo reducido de organismos (Ravelo y Braun, 2009).

Recientemente, se ha definido a este grupo de moléculas, cuya función en la naturaleza de una gran parte de ellas está aún por determinar, con el término de *parvoma*, del latín *parvus*, que significa pequeño (Davies y Ryan, 2012) (Figura 1). Así, por ejemplo, en el caso de los metabolitos secundarios en los que se ha identificado una actividad antibiótica a la que originalmente no se le atribuyó ninguna función ecológica, sin embargo, se ha comprobado que los genes implicados en las rutas de biosíntesis de antibióticos incluso los que confieren resistencias, se desarrollaron miles de años antes a su uso en la práctica clínica. Por ello se cree que estas moléculas deben tener además alguna función en la fisiología de sus productores o en el ecosistema en los que estos se encuentran. De hecho hay evidencias que sugieren que, a las bajas concentraciones en las que se encuentran en la naturaleza, los antibióticos pueden actuar como señalizadores interviniendo en diversos procesos celulares y pueden influir en la expresión de genes específicos relacionados con la motilidad, virulencia,

formación o inhibición de *biofilms* e incluso en fenómenos de *quorum sensing* (Sengupta *et al.*, 2013). Se considera por tanto, que en la naturaleza los antibióticos tienen un efecto hormético, es decir a altas concentraciones son tóxicos, pero a bajas concentraciones pueden inducir respuestas adaptativas y/o beneficiosas (Davies *et al.*, 2006).

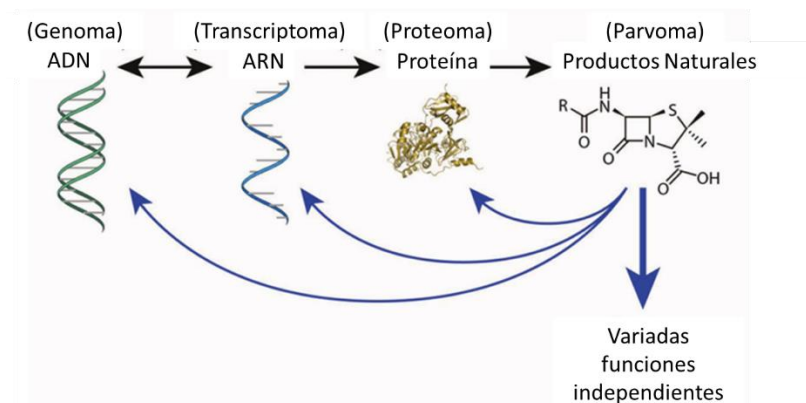


Figura 1. Incorporación del término parvoma en el dogma central de la biología (Davies y Ryan, 2012).

Tanto a lo largo de la historia como actualmente, los productos naturales o sus derivados constituyen el origen de una gran parte de los fármacos ya comercializados o en fases de desarrollo clínico, principalmente en las áreas de cáncer y anti-infecciosos (Harvey, 2009; Newman y Cragg, 2016). A finales del año 2013, de los 100 compuestos procedentes de productos naturales o sus derivados sometidos a estudios clínicos, la mayoría de ellos estaban siendo estudiados para enfermedades cancerígenas (38) y anti-infecciosas (26) (Figura 2) (Butler *et al.*, 2014).

En un estudio realizado, por Newman y colaboradores sobre los nuevos medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981 y 2010 (Newman y Cragg, 2012) se concluyó que el 34% de los medicamentos que se basaban en pequeñas moléculas eran productos naturales o derivados directos de los mismos, incluyendo las *estatinas* (fármacos para disminuir los niveles altos de colesterol y triglicéridos en sus distintas formas), medicamentos contra el cáncer de unión a tubulina e inmunosupresores (Cragg y Newman, 2013).

De enero de 2008 a diciembre 2013, se aprobaron para su comercialización un total de 25 compuestos procedentes de productos naturales o sus derivados (Butler *et al.*, 2014), y de acuerdo al análisis más reciente llevado a cabo de nuevo por Newman y colaboradores (Newman y Cragg, 2016) en el que cubren el periodo entre 1981 y 2014, de un total de 1562 nuevos fármacos aprobados por la FDA, el 35% corresponden a productos naturales no modificados y modificados, o cuyo farmacóforo es derivado de un producto natural.

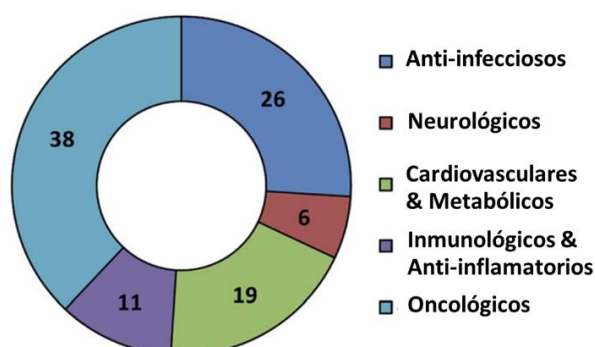


Figura 2. Clasificación por áreas terapéuticas de los 100 compuestos derivados de productos naturales en desarrollo clínico a finales de 2013 (Butler *et al.*, 2014).

Sin duda, estos logros no dejan de ser impresionantes dado el contexto actual, en el que las grandes compañías farmacéuticas, ya desde la década de los 90, han disminuido considerablemente la atención hacia los productos naturales como fuente de nuevos medicamentos, centrándose, en cambio, en los compuestos sintéticos obtenidos mediante técnicas de química combinatoria (Harvey *et al.*, 2015). Los motivos desencadenantes de este hecho son muy variados: a) por un lado, la idea de que los extractos generados a partir de cultivos de microorganismos o plantas son inadecuados para las técnicas de detección utilizadas en los ensayos de HTS; b) por otro, que el tiempo desde el descubrimiento de la actividad biológica hasta la obtención del producto responsable de la misma es demasiado largo y costoso (debido al proceso de aislamiento e identificación del principio activo del extracto); c) también la alta frecuencia de redescubrimiento continuo de compuestos previamente conocidos; d) e incluso la complejidad estructural de muchas de estas moléculas, que ha sido considerada como un inconveniente al suponer un verdadero reto para la síntesis química y su derivatización, que debe realizarse durante los procesos de

optimización de candidatos a fármacos (*Leads*). De la misma forma, otro obstáculo adicional es la necesidad de suministro de grandes cantidades de compuesto durante las fases de estudios preclínicos, clínicos y su comercialización (Peláez, 2006; Lam, 2007), aunque esta problemática se puede salvar mediante fermentación a gran escala en el caso de los productos naturales activos provenientes de microorganismos.

La diversidad química de los productos naturales es complementaria a la diversidad encontrada en los compuestos sintéticos obtenidos mediante química combinatoria. La enorme diversidad de estructuras químicas observada entre los metabolitos de origen microbiano deriva de un número relativamente pequeño de rutas biosintéticas básicas que se han diversificado enormemente durante el curso de la evolución (policétidos, péptidos no ribosomales, terpenoides y de las posibles combinaciones de todas ellas). Los PNs ocupan un espacio químico diferente y más amplio que los compuestos sintéticos (Krause y Tobin, 2013) y tienden a tener farmacóforos con estructuras tridimensionales que son menos lineales y con más grupos funcionales que los compuestos sintéticos (Paterson y Anderson, 2005).

Recientemente pequeñas compañías biotecnológicas, centros de investigación y algunos grupos académicos están contribuyendo al resurgimiento de los productos naturales, basando sus proyectos de búsqueda de nuevos fármacos en diferentes aproximaciones que sortean muchos de los inconvenientes expuestos anteriormente, y apoyándose en el hecho de que la química combinatoria no ha sido todo lo fructífera que se esperaba, principalmente por no ser capaz de proporcionar la novedad y diversidad estructural que se puede encontrar en la naturaleza (Payne *et al.*, 2007). Algunas de esas estrategias incluyen: a) la creación de colecciones de fracciones o de compuestos puros aislados de los extractos para simplificar el proceso de identificación de las moléculas con actividad; b) la manipulación genética de las rutas metabólicas de las cepas productoras que permite modificar los rendimientos en la obtención de productos naturales de interés; c) la utilización de métodos de desreplicación taxonómica para reconocer especies o cepas de microorganismos similares tratando de aportar la mayor biodiversidad posible o bien química para detectar la presencia en los propios extractos de compuestos ya conocidos; d) el co-cultivo de microorganismos para aumentar la producción de metabolitos secundarios que no se expresan en condiciones estándar; e) así como diferentes métodos de identificación de nuevas dianas terapéuticas entre las que destacan la genómica comparada y el análisis

diferencial de la expresión génica en microorganismos productores (Lam, 2007; Harvey *et al.*, 2015).

Dos de los ejemplos más recientes de éxito que han resultado de la confluencia de los progresos, avances y mejoras aplicadas en el desarrollo de nuevos fármacos a partir de productos naturales, son el descubrimiento de dos antibióticos: la teixobactina (Figura 3) (Ling *et al.*, 2015) y la pseudouridimicina (Figura 4) (Maffioli *et al.*, 2017).

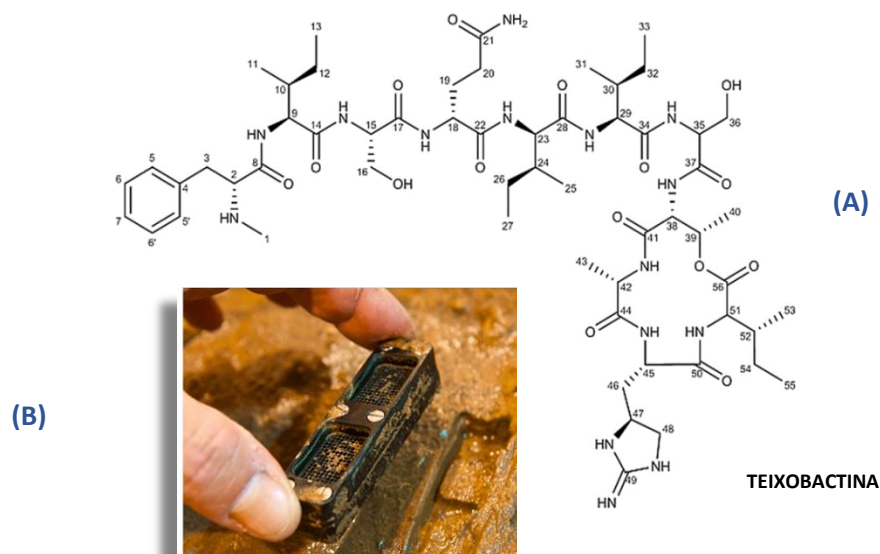


Figura 3. (A) Estructura de la teixobactina. **(B)** Fotografía del *iChip* de aislamiento de la bacteria que dispone de varios cientos de cámaras de difusión en miniatura para inocular en cada una de ellas una única célula y proceder a su cultivo.

La teixobactina (Figura 3) es un antibiótico con actividad específica frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Mycobacterium tuberculosis* y *Enterococcus spp.* (enterococos resistentes a vancomicina, ERV) (Fiers *et al.*, 2017), que ha sido aislado a partir de una bacteria de suelo, *Eleftheria terrae*, que no podía cultivarse en los medios y condiciones habituales de laboratorio (Figura 3). Con el objetivo de cultivar este tipo de bacterias se ha desarrollado una metodología de cámaras de difusión con membranas semipermeables que restringen el movimiento de las células, pero permiten por difusión el libre intercambio con el medio externo de nutrientes y metabolitos. Con

este método, llamado *iChip*, se pueden crecer bacterias del suelo dentro del mismo suelo (Nichols *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de este antibiótico está basado en la inhibición de la biosíntesis de la pared celular dado que se une al lípido II, precursor de la biosíntesis del peptidoglicano (PG), y al lípido III, precursor de la biosíntesis del ácido teicoico de la pared. La impresionante actividad bactericida de la teixobactina se debe a la inhibición sinérgica de ambas dianas, lo que provoca daño de la pared celular, deslocalización de autolisinas y como consecuencia la lisis celular (Homma *et al.*, 2016).

La pseudouridimicina (Figura 4), conocida como PUM, es el primer análogo de nucleósido capaz de unirse selectivamente a la ARN polimerasa (ARNP) bacteriana e inhibir la transcripción.

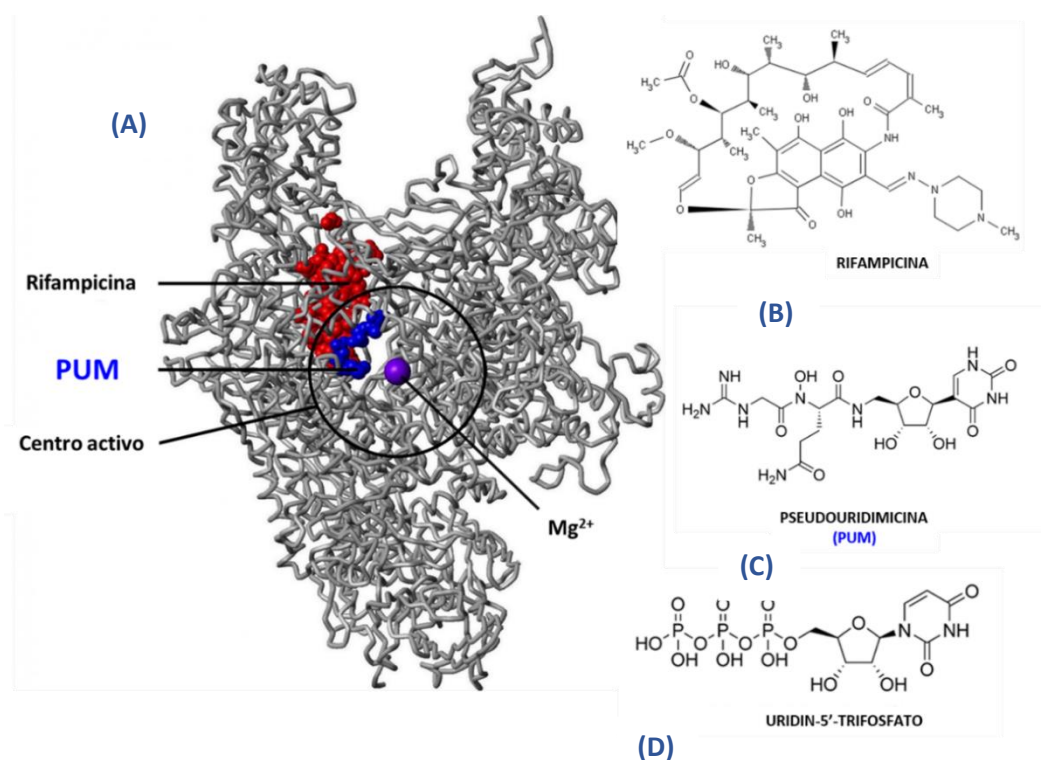


Figura 4. (A) Estructura de la ARN polimerasa bacteriana. Se muestran los sitios de unión para los antibióticos pseudouridimicina (PUM) y rifampicina (Maffioli *et al.*, 2017). (B), (C) y (D) Estructuras de la rifampicina, pseudouridimicina y UTP, respectivamente (Chellat y Riedl, 2017).

La PUM es un producto natural identificado durante el *screening* de una librería de aproximadamente 3000 extractos de origen microbiano llevado a cabo mediante un proyecto liderado en su conjunto por tres grupos académicos de la Universidad de Rutgers (USA), Milán (Italia) y Bonn (Alemania) y por tres compañías biotecnológicas italianas (NAICONS Laboratories Srl, Vicuron Pharmaceuticals y NeED Pharma Srl).

PUM es producido por dos cepas de *Streptomyces* aisladas de unas muestras de suelo recogidas en Italia y Francia (Maffioli *et al.*, 2017) y tiene actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo a algunas multi-resistentes tales como aislados clínicos relevantes de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Trautman y Crawford, 2017).

Se ha demostrado que la pseudouridimicina inhibe la ARNP a través de un mecanismo y sitio de unión diferente al de las rifamicinas (como la rifampicina) (Figura 4) y las lipiarmicinas (como la fidaxomicina), hecho que explica la ausencia de resistencia cruzada con dichos antibióticos, así como su efecto aditivo al ser coadministrada con ellos. Además, como se puede apreciar en la Figura 4, se han encontrado en la ARNP solo de 2 a 4 sitios (color azul) de mutación que confieren resistencia a PUM mientras que para la rifampicina se conocen 25 sitios diferentes (color rojo) (Maffioli *et al.*, 2017).

2.1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN MICROBIANO

Centrándonos en los metabolitos secundarios de origen microbiano, podemos afirmar que estos han tenido un extraordinario impacto en el bienestar de la humanidad, así como en el espectacular aumento de la esperanza de vida observado durante la segunda mitad del siglo XX. Muchos de los agentes antibióticos, antifúngicos, inmunosupresores e hipolipemiantes utilizados en la práctica clínica durante los últimos 60 años son derivados de compuestos de origen microbiano.

Los microorganismos productores de moléculas bioactivas más relevantes son las Actinobacterias (*Actinomycetales*) ya que son responsables de la producción de alrededor del 45% de las mismas, representando además éstas un 60% de los antibióticos comerciales. Los hongos les siguen en importancia con el 38 % de las moléculas bioactivas y, por último, otros grupos bacterianos tales como *Bacillus*,

Pseudomonas, *Cyanobacteria*, *Myxobacteria*, que producen el 17 % de las moléculas bioactivas (Tabla 1) (Berdy, 2005).

Fuente	Moléculas con actividad antibiótica	Moléculas con otra actividad	Moléculas bioactivas	Compuestos en práctica clínica
Bacterias	2900	900	3800	10-12
Actinomycetales	8700	1400	10100	100-120
Hongos	4900	3700	8600	30-35
Total	16500	6000	22500	140-160

Tabla 1. Biomoléculas activas según los distintos productores de origen microbiano (Berdy, 2005).

Se estima que existen alrededor de 3 millones de especies de bacterias y 1,5 millones de especies de hongos, de las cuales solo se conocen el 0,2% en el caso de las bacterias y el 5% en el caso de hongos. Por ello, sin lugar a dudas, los microorganismos siguen siendo una fuente extraordinaria aún por explorar para el descubrimiento de nuevas moléculas candidatas a fármacos (Harvey, 2000). Porciones significativas del genoma microbiano son responsables de la producción de metabolitos secundarios. Un solo microorganismo puede producir 50 o más compuestos con propiedades antibióticas, anticancerígenas, inmunosupresoras y muchos de ellos además tienen aplicaciones como antivirales, antihelmínticos, nutraceúticos o tensoactivos, entre otras (Demain, 2014).

Históricamente la mayor parte de los PN se aislaron a partir de bacterias terrestres, pero actualmente como consecuencia de los avances en las metodologías de muestreo, nuevas fuentes que incluyen ambientes marinos (costas, aguas marinas, invertebrados y sedimentos del fondo marino) además de hábitats inusuales y extremos (regiones de alta o baja temperatura o presión, zonas de alto nivel de acidez o alcalinidad), están siendo objeto de estudio y brindan innumerables oportunidades para aislar microorganismos que hasta el momento no se habían explorado y que pueden proporcionar numerosos y novedosos productos naturales bioactivos (Huang y Lin, 2017).

2.1.2.1 Proceso de descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales de origen microbiano

Los productos naturales de origen microbiano han sido objeto de gran número de proyectos de descubrimiento de nuevos fármacos. El proceso (Figura 5) se inicia con la recogida de muestras ambientales de diferentes lugares del mundo y de diversas fuentes, tales como suelo, plantas, rocas, agua, líquenes, rizosferas, ambientes marinos, etc., tratando así de conseguir la mayor biodiversidad microbiana posible. Una vez que los microorganismos son aislados de las diferentes fuentes, éstos deben ser desreplicados mediante distintas técnicas moleculares que indiquen, por ejemplo, el grado de similitud o el parentesco genético entre las cepas, para asegurar la selección de las más novedosas o de las menos frecuentes.

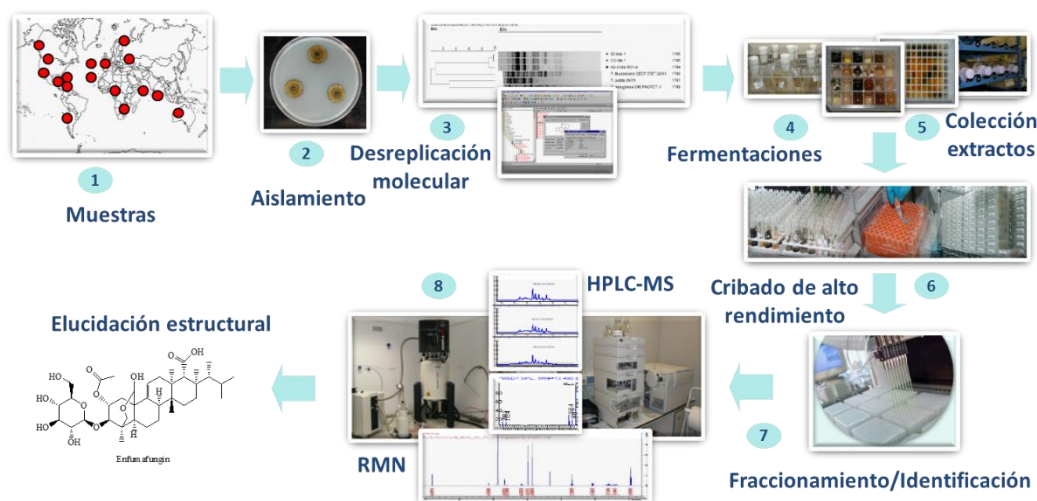


Figura 5. Esquema general del proceso de descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales de origen microbiano.

Posteriormente, las cepas seleccionadas se fermentan en diferentes condiciones ambientales de temperatura, luz, humedad, etc., así como en varios medios de cultivo óptimos para su crecimiento a la vez que estimulan en ellos la producción de nuevos metabolitos secundarios. Seguidamente, se procede a la extracción de dichos metabolitos secundarios con diferentes disolventes orgánicos, y a la generación de colecciones de extractos. Éstos se prueban frente a dianas con diversos intereses terapéuticos y los extractos que resultan activos se fraccionan con el objetivo de aislar el compuesto responsable de la actividad. Finalmente se identifica, se purifica en

cantidad y se determina la estructura de la molécula activa mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a masas (LCMS) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Figura 5).

El éxito en el descubrimiento de fármacos a partir de productos microbianos se basa en la combinación adecuada de tres factores clave: a) la selección apropiada de las cepas que asegure una alta diversidad de microorganismos; b) las condiciones de cultivo que deben facilitar la producción de compuestos con química novedosa; y c) la elección de dianas apropiadas y validadas para el cribado de alto rendimiento de los extractos de metabolitos secundarios producidos (Genilloud *et al.*, 2011).

2.1.3 LOS ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas muy diverso y ampliamente distribuido en suelos, en otros hábitats terrestres, y en ambientes acuáticos dulces y marinos (Leiva P *et al.* 2004). Son bacterias Gram-positivas que se caracterizan porque poseen un complejo ciclo biológico desde la formación inicial de micelio vegetativo a la posterior diferenciación con formación de micelio aéreo y esporulación. Además, forman un grupo taxonómicamente complejo que se ha definido filogenéticamente como una serie de taxones de alto contenido en guanina y citosina (G+C), pertenecientes al *Phylum Actinobacteria*, dentro de la Clase Actinobacteria, integrada por 15 órdenes, 43 familias y 224 géneros (Bergey's, 2012).

Los actinomicetos desempeñan un papel ecológico importante por su participación en la degradación de la materia orgánica y en el reciclaje de los nutrientes existentes en su nicho. La mayoría de las especies descritas son saprófitas y tienen la capacidad de usar casi cualquier fuente de nutrientes disponible para su desarrollo. Incluso también hay algunos que pueden formar asociaciones parasíticas o simbióticas con plantas o animales. Son capaces de colonizar todo tipo de sustratos en los ecosistemas más diversos y, aunque principalmente se aíslan de la zona aeróbica del suelo, se distribuyen ampliamente en sedimentos, rizosferas, material vegetal en descomposición, rocas (Salazar *et al.*, 2006), líquenes (González *et al.*, 2005), ambientes marinos (Hassan y Shaikh, 2017), desérticos (Mohammadipanah y Wink, 2015) (Rateb *et al.*, 2018) e incluso en lagos de la Antártida (Rojas *et al.*, 2009).

Estos microorganismos producen una gran diversidad de compuestos en su metabolismo secundario, en muchos casos, como respuesta a diferentes tipos de estímulos y factores de estrés, ya que comparten hábitat con otras bacterias y hongos con los que compiten por los nutrientes (Davies y Ryan, 2012). También se ha postulado que sus metabolitos secundarios tienen una importante función en el mantenimiento, señalización y colonización del hábitat al que pertenecen (González *et al.*, 2005).

La mayoría de los actinomicetos aislados de los suelos pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* (Figura 6) y pueden estar presentes como esporas o como hifas vegetativas.

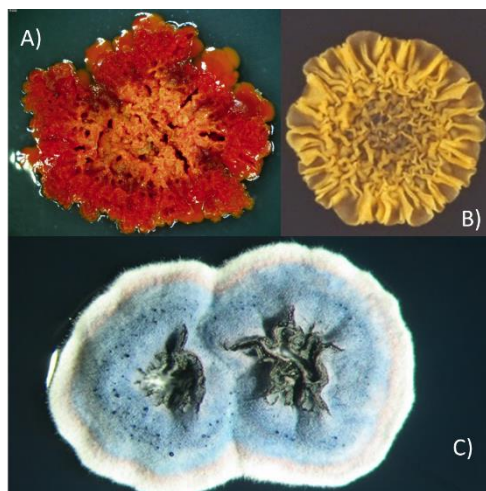


Figura 6. Diferencias morfológicas de los tres géneros de actinomicetos que más comúnmente se aíslan de los suelos: A) *Micromonospora*, B) *Nocardia*, C) *Streptomyces*.

El desarrollo de la morfología de las colonias de los actinomicetos les distingue de las demás bacterias, ya que se originan a partir de esporas u otros propágulos asociados a partículas de tierra. Su crecimiento comienza con la elongación y ramificación de las hifas vegetativas, tanto sobre la superficie como dentro del medio sólido, y continúa con el desarrollo del micelio aéreo que normalmente coincide con el inicio de la producción de metabolitos secundarios que se prolonga durante la maduración del cultivo. Factores como la composición del medio y la temperatura, influyen altamente sobre su producción de micelio aéreo (Williams *et al.*, 1983).

La distinción entre ambos micelios vegetativo y aéreo, no se basa únicamente en su localización, sino que se debe también a que ambos son diferentes morfológica, estructural y fisiológicamente. Durante el desarrollo del micelio aéreo, el micelio vegetativo sufre una fragmentación y lisis que coincide con el desarrollo de las hifas aéreas, de forma que no se produce un cambio neto en el peso seco de la colonia pues los compuestos presentes en el micelio vegetativo son utilizados como nutrientes por el micelio aéreo. A medida que este último se desarrolla, los compuestos del micelio vegetativo migran desde la base de la colonia hacia la región superior. Se ha postulado por ello, que los actinomicetos son propensos a la producción de antibióticos para prevenir la invasión por bacterias de su micelio vegetativo lisado (Chater y Merrick, 1979). Por otro lado, a nivel molecular, tanto la expresión de dichos metabolitos secundarios como su desarrollo morfológico, están altamente regulados por complejas cascadas de señalización controladas por diferentes familias de proteínas reguladoras, en algunos casos exclusivas de este tipo de microorganismos (Bush *et al.*, 2013).

Actualmente, el desarrollo y el abaratamiento de las técnicas de secuenciación masiva han permitido acceder a las secuencias genómicas de miles de actinomicetos, lo que ha puesto de manifiesto el gran potencial de estos microorganismos para producir una multitud de nuevos metabolitos secundarios cuyas rutas de biosíntesis están silenciadas o crípticas en su genoma. Algunas de las estrategias que se han llevado a cabo en el intento de activar la expresión de esas rutas para encontrar nuevos PNs, son aquellas basadas en la minería del genoma (*genome mining*), en la expresión heteróloga de rutas específicas y en la peptidogenómica guiada por espectrometría de masas (Behie *et al.*, 2017).

Una reciente revisión (Genilloud, 2017) que describe los antibióticos descubiertos producidos por actinomicetos entre 2006 y 2017, pone de manifiesto que estos microorganismos continúan siendo una de las fuentes más importantes de nuevos compuestos y con mayor diversidad química. Asimismo, en este estudio se refleja que: el desarrollo de técnicas innovadoras para aislar especies previamente no cultivadas, los nuevos criterios de cribado de colecciones de PNs, así como los enfoques novedosos para encontrar la mayor diversidad microbiana y explotar el potencial biosintético de los actinomicetos, contribuyen al continuo descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y nuevos análogos de moléculas previamente conocidas (Genilloud, 2017).

2.2 LOS ANTIBIÓTICOS

2.2.1 LOS ANTIBIÓTICOS: BREVE HISTORIA

Los antibióticos, del griego αντί – anti (*en contra*) y βιοτικός - biotikos (*dado a la vida*), son sustancias químicas producidas por un ser vivo o fabricadas por síntesis química, capaces de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos por su acción bacteriostática o por causar la muerte de los mismos debido a su acción bactericida.

El empleo de compuestos naturales, como los extractos de algunas plantas para el tratamiento de las infecciones, se conoce desde la antigüedad. Incluso existe constancia documental de la utilización de ciertos hongos que crecen en algunos quesos para el tratamiento tópico de los procesos infecciosos. Sin embargo, no fue hasta los primeros años del siglo XX cuando Paul Ehrlich desarrolló el concepto denominado “toxicidad selectiva”: actividad selectiva frente a los microorganismos infecciosos pero no frente a las células humanas, y descubrió uno de los primeros agentes quimioterapéuticos, el salvarsán (*arsénico que salva*), un compuesto de arsénico con acción selectiva frente a las espiroquetas, las bacterias responsables de la sífilis, siendo el único tratamiento eficaz contra esta enfermedad hasta la comercialización de la penicilina. Más tarde, en 1932, Gerhard Domagk descubrió la actividad del rojo prontosil (precursor de las *sulfamidas*, antimicrobianos sintéticos) para el tratamiento de las infecciones estreptocócicas. Dicho hallazgo, publicado en 1935, le hizo merecedor del Premio Nobel de Medicina en 1939.

Con el descubrimiento en 1928 de la penicilina por Alexander Fleming, metabolito secundario derivado de *Penicillium notatum*, y su posterior introducción en la práctica clínica como antibiótico en 1943, por Ernst B. Chain y Howard W. Florey, comenzó una nueva etapa en la lucha contra las enfermedades infecciosas, la denominada “era moderna de los antibióticos” (Figura 7).

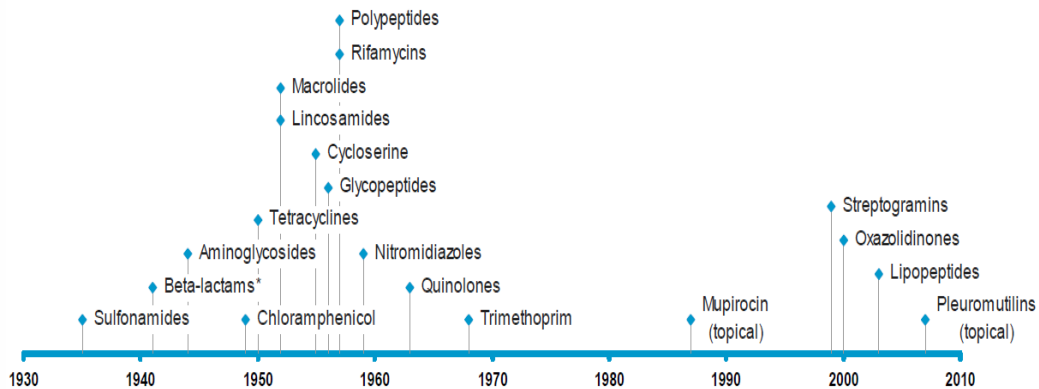


Figura 7. Clases de antibióticos introducidos en el mercado para uso en clínica entre 1935 y 2010.

Entre los años 1940 y 1970, “la época dorada” de los antimicrobianos, se desarrolló un gran número de compuestos altamente eficaces frente a los patógenos más frecuentes. El descubrimiento de la gramicidina en 1939 (Dubos, 1939), el primer agente bactericida aislado de una bacteria del suelo (*Bacillus brevis*), supuso el inicio del aislamiento sistemático y el cribado de alto rendimiento (*screening*) de bacterias y hongos del suelo en busca de nuevos antibióticos. El descubrimiento del aminoglicósido estreptomina en 1943, (Riedlinger *et al.*, 2004) puso a las bacterias que pertenecen a la clase Actinobacteria, los actinomicetos, en el centro de atención de la investigación en el descubrimiento de antimicrobianos. Este compuesto fue el primero de un gran número de metabolitos secundarios derivados del género *Streptomyces* que sigue siendo hoy en día el grupo más prolífico en cuanto a producción de antibióticos y compuestos bioactivos (Bérdy, 2005).

Durante el periodo comprendido entre 1935 y 1968 se descubrieron e introdujeron en el uso clínico para el tratamiento de las infecciones bacterianas catorce clases diferentes de antibióticos, presentando cada una de ellas un nuevo mecanismo de acción, e incluyendo entre otros a los β -lactámicos, las tetraciclinas, los aminoglicósidos y los macrólidos. En concreto, en los 10 años que siguieron al término de la Segunda Guerra Mundial se describieron 96 antibióticos distintos producidos por 57 especies de microorganismos, principalmente actinomicetos. Y en la década de los sesenta se abrió una nueva fase en la era de los antibióticos, ya que se obtuvieron compuestos semisintéticos por modificación química de antibióticos naturales. Así, se consiguieron reducir los problemas de resistencia bacteriana que habían empezado a

aparecer frente a algunos antibióticos, y se disminuyó en muchos casos los efectos secundarios, al tiempo que se amplió su espectro de acción.

Sin embargo, desde el año 1970 el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antibacteriana ha ido disminuyendo. En las décadas siguientes, sólo se logró hacer mejoras en clases de antibióticos ya existentes. Esto ha supuesto un importante problema, sobre todo teniendo en cuenta el incremento alarmante en las resistencias a estos fármacos, que dificultan enormemente el tratamiento de muchas infecciones bacterianas en la actualidad. Desde entonces y hasta el año 2014, tan solo cinco nuevas clases de antibióticos han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Admistration) de Estados Unidos, dos de ellas con uso limitado como tópicos (Laxminarayan *et al.*, 2007). Estas 5 nuevas clases son: las oxazolidinonas (linezolid), los lipopéptidos (daptomicina), las pleuromutilinas (retapamulina), las tiacumicinas (fidaxomicina) y las diarilquinolinas (bedaquilina) (Butler *et al.*, 2013).

En mayo de 2017, 51 nuevos antibióticos con potencial para tratar infecciones bacterianas de alta prioridad clínica se encontraban en desarrollo clínico, siendo en su mayoría modificaciones de clases de antibióticos ya existentes o combinaciones de compuestos ya conocidos. Sin embargo, solo ocho de estas moléculas han sido clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como tratamientos innovadores. Dado que la tasa de éxito en el desarrollo clínico de medicamentos es baja, solo 1 de cada 5 compuestos consiguen llegar a ser aprobados para su uso en pacientes, el reciente informe *Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis* (WHO/EMP/IAU/2017.11) concluye que hay muy pocas opciones terapéuticas posibles para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos.

2.2.2 MODOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

La actividad de los antibióticos frente a las bacterias depende en un primer lugar de su capacidad para atravesar la pared bacteriana y esta capacidad no solo depende de su naturaleza fisicoquímica sino también de la estructura de la barrera que han de atravesar. Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas disponen de una membrana citoplasmática, rica en fosfolípidos y proteínas, que sirve de barrera osmótica solo permeable al agua y a las moléculas orgánicas sin carga y de pequeño tamaño, y sobre ella se sitúa una capa de peptidoglicano (exoesqueleto bacteriano), más gruesa en las bacterias Gram-positivas que en las Gram-negativas (Figura 8).

Para las bacterias Gram-positivas el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared, si bien otra parte corresponde a los ácidos teicoico (TA) y el ácido teicurínico, polímeros hidrosolubles que contienen ribitol o residuos de glicerol unidos por medio de enlaces fosfodiéster y que tienen uno o más aminoácidos o sustitutos del azúcar. Existen dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido teicoico de la pared unido de manera covalente al peptidoglicano y el ácido teicoico de la membrana, o también llamado ácido lipoteicoico (LTA), unido por enlaces covalentes al glucolípidio de esta. Sin embargo, para las bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano constituye solo alrededor del 10% de la pared, y el resto está constituido por una capa compleja (Figura 8). Se diría que tienen una estructura trilaminar: membrana citoplasmática, capa de peptidoglicano y membrana externa.

Así, la membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana celular cuyos lípidos orientados hacia dentro son fosfolípidos típicos, pero que están ubicados hacia la cara externa que es donde se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), moléculas exclusivas de las bacterias Gram-negativas cuyos ácidos grasos están saturados. Estos lipopolisacáridos le confieren carga negativa y repelen moléculas hidrofóbicas y además pueden actuar como antígenos en el reconocimiento de ciertos bacteriófagos (Madigan *et al.*, 2008).

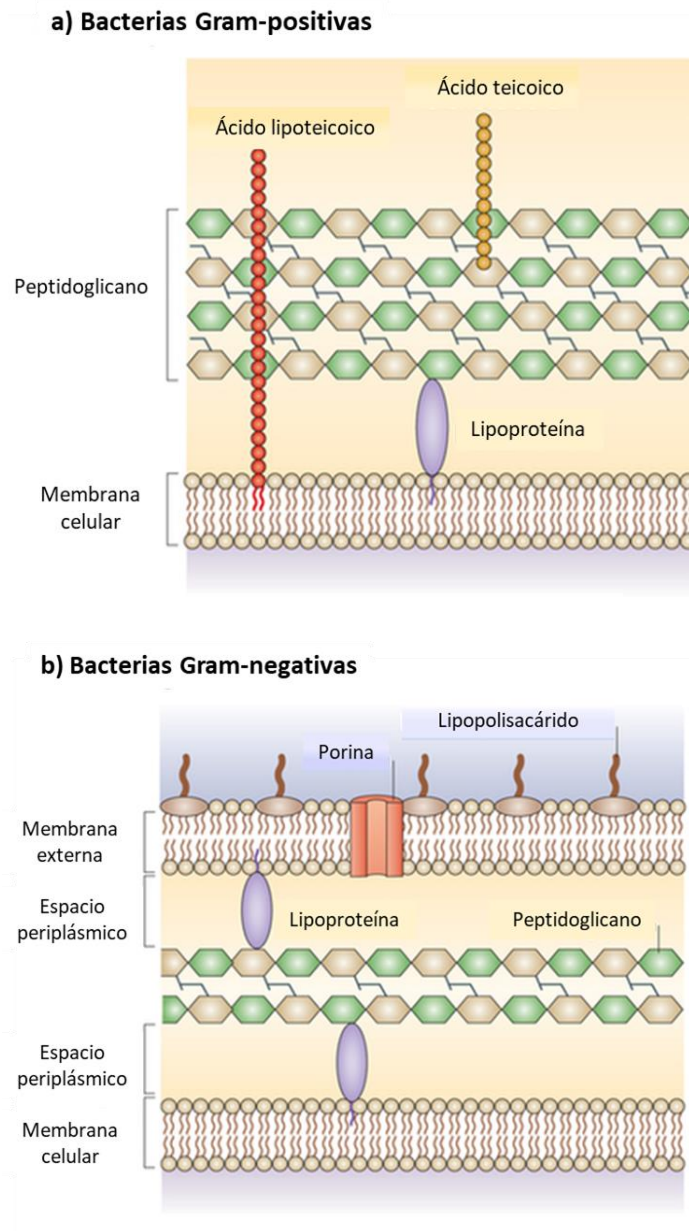


Figura 8. Composición y estructura de la membrana de bacterias Gram-positivas (a) y Gram-negativas (b) (L. Brown *et al.*, 2015).

La parte lipídica de las moléculas de LPS es el lípido A, que se comporta como endotoxina bacteriana cuando es liberada y constituye un importante factor de virulencia en las especies patógenas (Raetz y Whitfield, 2002). Hacia fuera de las moléculas de LPS se sitúan largas cadenas de azúcares de composición y longitud muy variable denominadas antígeno O. Las cadenas O están unidas al lípido A, mediante el oligosacárido central (“core”) que contiene un ácido característico: el ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (KDO). Además, la membrana externa dispone de unos poros,

formados por polímeros de unas proteínas llamadas *porinas*, a través de los que se regula el flujo de sustancias en función de su tamaño, hidrofilia y carga molecular neta.

Entre la membrana externa y la citoplasmática hay un espacio llamado periplasma (Figura 8), en el que se encuentran la fina capa de peptidoglicano y varios enzimas, como por ejemplo las β -lactamasas (Madigan *et al.*, 2008).

Por todo ello, la pared celular es más permeable a los antibióticos en el caso de las bacterias Gram-positivas que en el caso de las bacterias Gram-negativas, ya que estas últimas poseen una barrera de permeabilidad selectiva adicional que constituye una defensa natural a la libre difusión de antibióticos al interior de la bacteria.

Desde el punto de vista molecular, los antibióticos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: a) inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana; b) alterando la integridad de la membrana citoplasmática; c) impidiendo la síntesis proteica; d) bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos; y/o e) protegiendo a otros antibióticos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de β -lactamasas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009) (Kapoor *et al.*, 2017).

Atendiendo a su mecanismo de acción y estructura química, los principales grupos de antimicrobianos de interés clínico y sus principales representantes se muestran en la Figura 9.

Dentro del grupo que interfiere en la síntesis de la pared celular se incluyen los glucopéptidos como la vancomicina y teicoplanina que se unen al extremo terminal de las unidades precursoras de la cadena del peptidoglicano y evitan así la formación de una pared celular estable. También forman parte de este grupo los antibióticos β -lactámicos como penicilinas, cefalosporinas y monobactam que interfieren con enzimas que participan en la síntesis de la capa de peptidoglicano e inhiben por tanto la síntesis de la pared celular (Figura 9).

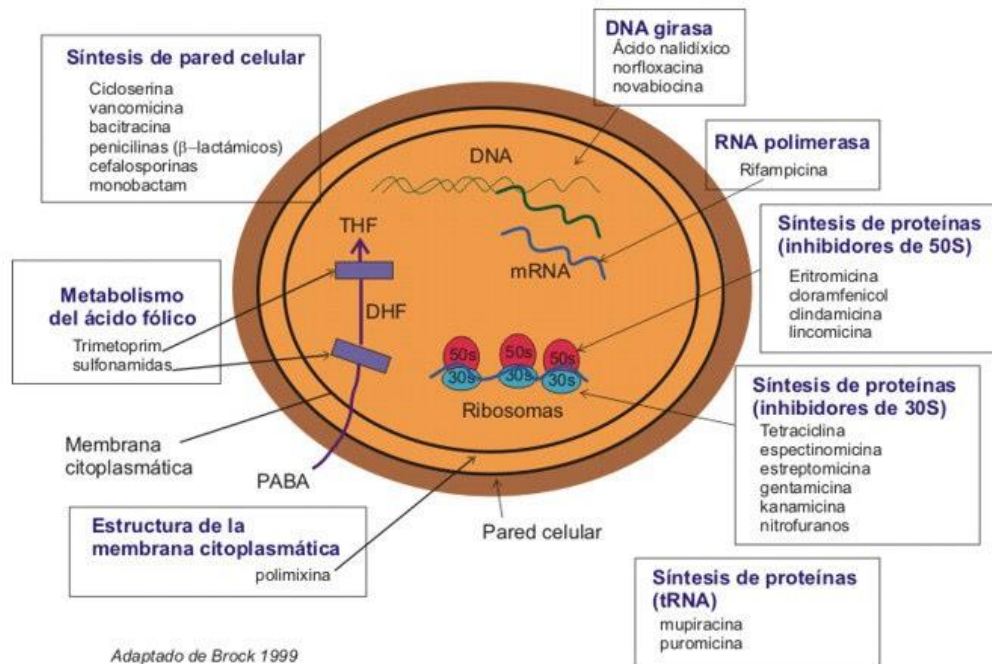


Figura 9. Mecanismos de acción de los antibióticos y principales representantes de cada grupo (Brock, 1999).

Antibióticos como los aminoglicósidos (kanamicina, gentamicina, estreptomicona), macrólidos (eritromicina, claritromicina), cloranfenicol, oxazolidinonas, lincosamidas y tetraciclinas se unen al ribosoma deteniendo la traducción e inhibiendo así la síntesis de proteínas. La interferencia se produce con la subunidad ribosómica 30S en el caso de aminoglicósidos y tetraciclinas, y con la subunidad 50S en el caso de macrólidos, lincosamidas, oxazolidinonas y cloranfenicol. Asimismo, antibióticos como mupiracina y puromicina inhiben competitivamente la enzima isoleucil-ARNt sintetasa, impidiendo la incorporación del aminoácido isoleucina al péptido en formación e inhibiendo consecuentemente la síntesis de proteínas (Figura 9).

Por otro lado, existen varios grupos de antibióticos que inhiben alguno de los componentes esenciales de la síntesis de ácidos nucleicos. En el caso de las quinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacina, norfloxacina) actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas II y IV, indispensables en la síntesis de ADN, que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN cromosómico bacteriano. Y por su parte, las rifamicinas (rifampicina, rifamicina B), inhiben la síntesis de ARN ribosómico y mensajero al bloquear la subunidad beta de la ARN polimerasa (Figura 9).

La ruta metabólica que conduce a la síntesis de ácido fólico se ve bloqueada por la combinación, habitualmente usada en la práctica clínica, de trimetoprim y sulfametoxazol. Y la acción de las polimixinas modifica la estructura de la membrana citoplasmática, ya que aumentan su permeabilidad provocando la pérdida de contenido intracelular (Figura 9).

2.2.3 SÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO

La síntesis de los diferentes componentes de la pared celular es una diana clave en el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos. En concreto, el peptidoglicano es un componente esencial que rodea completamente las células bacterianas proporcionándoles resistencia mecánica frente a la presión osmótica y confiriéndoles la forma característica de los diferentes grupos bacterianos. Al mismo tiempo, representa un papel importante en los procesos de crecimiento y de división celular (J van Heijenoort 2001). El peptidoglicano es un polisacárido en el que se alternan, unidos mediante enlaces β 1-4, monómeros de N-acetil-glucosamina (NAG) y ácido N-acetil-murámico (NAM). A este último se une una cadena lateral pentapeptídica entre cuyos residuos se establecen enlaces amida, resultando así la estructura tridimensional del polímero (Meroueh *et al.*, 2006).

El PG está ausente en la pared celular de la célula eucariótica, incluidas las células humanas, por lo que los antibióticos que actúan afectando a su proceso de síntesis carecen de efectos adversos importantes sobre las células del huésped. Esta característica hace que esta ruta sea una diana atractiva, elegida por numerosos grupos académicos e industrias farmacéuticas, en los programas dedicados a la búsqueda de nuevos antimicrobianos. Históricamente, la biosíntesis del peptidoglicano, junto con la biosíntesis de proteínas en el ribosoma, ha resultado ser el sitio de acción de un gran número de antibióticos descubiertos, ya que ambas vías tienen múltiples etapas reguladas por diversas enzimas, lo que ofrece diversas oportunidades a los antibióticos para interrumpir el ciclo celular de una célula bacteriana sana (Von Döhren, 2004).

La síntesis de peptidoglicano (Figura 10) se describe generalmente en tres etapas, que se producen en tres lugares diferentes en la célula.

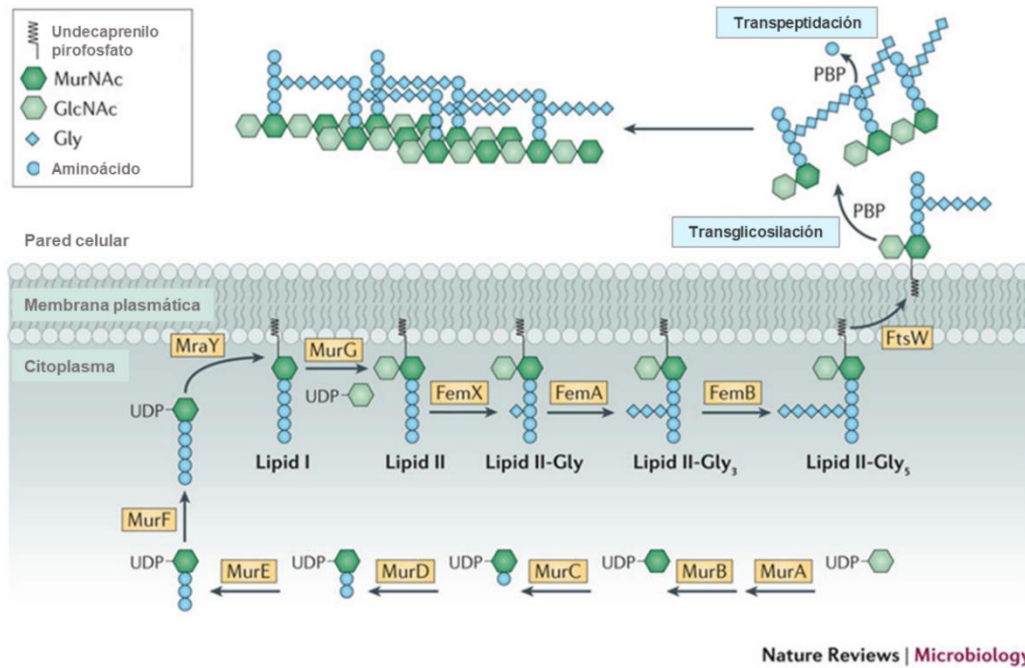


Figura 10. La síntesis del peptidoglicano es un proceso con múltiples etapas reguladas por diferentes enzimas que se lleva a cabo a ambos lados de la membrana citoplasmática (Pinho *et al.*, 2013).

El proceso comienza en el citoplasma, donde se biosintetizan UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-N-acetilmurámico (UDP-MurNAc) y UDP-MurNAc-pentapéptido (Nucleótido de Park). La segunda etapa tiene lugar en la membrana citoplásmica, donde el UDP-MurNAc-pentapéptido se une al lípido de transporte undecaprenilo pirofosfato, dando lugar a la formación de lípido I. Después al incorporarse una unidad de GlcNAc se forma el lípido II. A continuación, el Lípido II es pasado al lado externo de la membrana por proteínas FtsW, y es en este lado donde proteínas PBPs (del inglés *Penicillin-Binding Proteins*, que hace referencia a su capacidad de unir penicilina) lo incorporan al PG incipiente. Durante una tercera etapa, las proteínas PBPs catalizan las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, que generan respectivamente la polimerización y el entrecruzamiento de las hebras de glicano (Pinho *et al.*, 2013).

En la Figura 11 se puede observar un esquema general del proceso con ejemplos de aquellos más representativos y los lugares donde actúan.

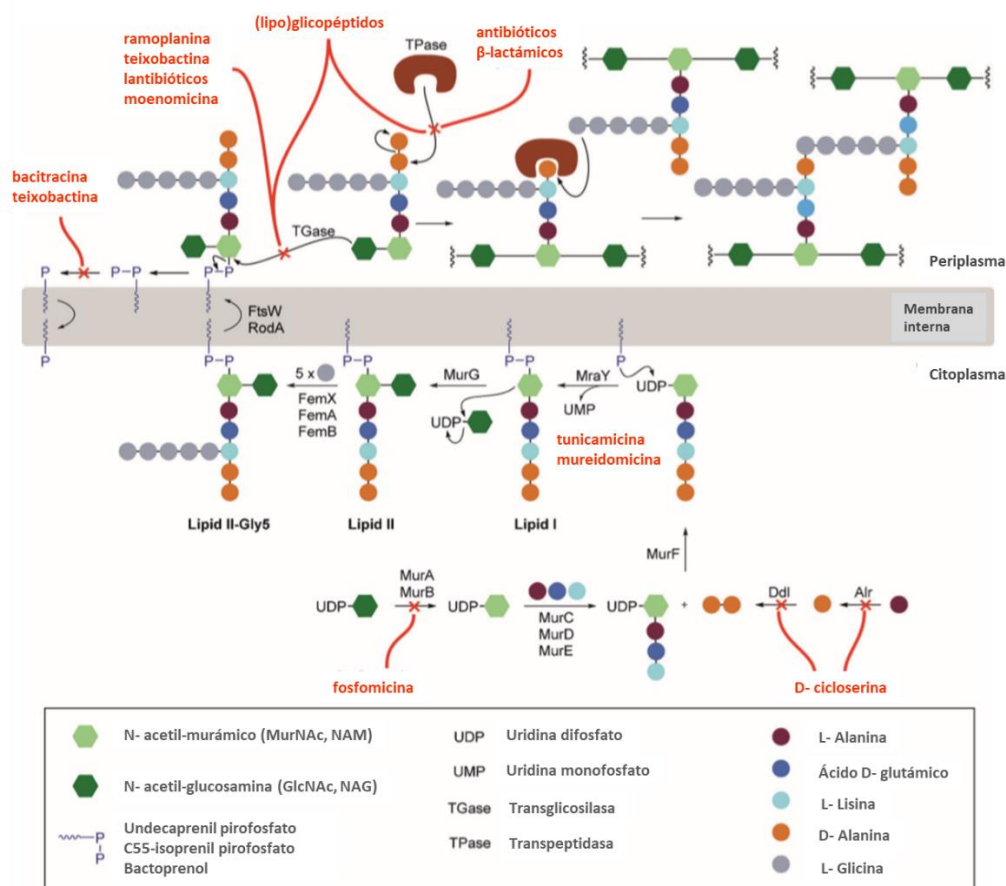


Figura 11. Algunos de los antibióticos más representativos que inhiben las diferentes etapas de la biosíntesis del peptidoglicano (Chellat *et al.*, 2016).

En los siguientes apartados, se describe en detalle cómo diversos antibióticos interfieren bloqueando las diferentes etapas de la biosíntesis del peptidoglicano.

2.2.3.1 Antibióticos que inhiben la primera etapa de la biosíntesis del PG

Como se ha comentado anteriormente, la primera etapa de la biosíntesis de peptidoglicano tiene lugar en el citoplasma de la célula (Barreteau *et al.*, 2008). Para la biosíntesis del precursor UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) se requieren cuatro enzimas: Glucosamina-6-P-sintasa (GlmS), Fosfoglucosaminamutasa (GlmM), Glucosamina-1-P-acetiltransferasa (GlmU) y N-acetilglucosamina 1-P-uridiltransferasa (GlmU) (Figura 11). Seis enzimas, desde **MurA** hasta **MurF**, catalizan las siguientes fases hasta llegar al nucleótido de Park (El Zoeiby *et al.*, 2003).

La enzima **MurA** (Brown *et al.*, 1995) cataliza el acoplamiento de UDP-GlcNAc con PEP (fosfoenolpiruvato) y transfiere el grupo “enol” del PEP al 3’-OH del UDP-GlcNAc para

producir EP-UDP-GlcNAc (UDP-N-acetil-glucosamina enolpiruvato) (Walsh *et al.*, 1996). A continuación, la enzima **MurB**, usando NADPH como agente reductor, reduce el enolpiruvato del EP-UDP-GlcNAc, dando lugar a UDPMurNAc (ácido UDP-N-acetilmurámico) (Benson *et al.*, 1996). Este UDPMurNAc sirve como sustrato para la biosíntesis del UDP-MurNAc-péptido en la que intervienen cuatro enzimas llamadas “Mur-ligasas”: MurC, MurD, MurE y MurF (Figura 12).

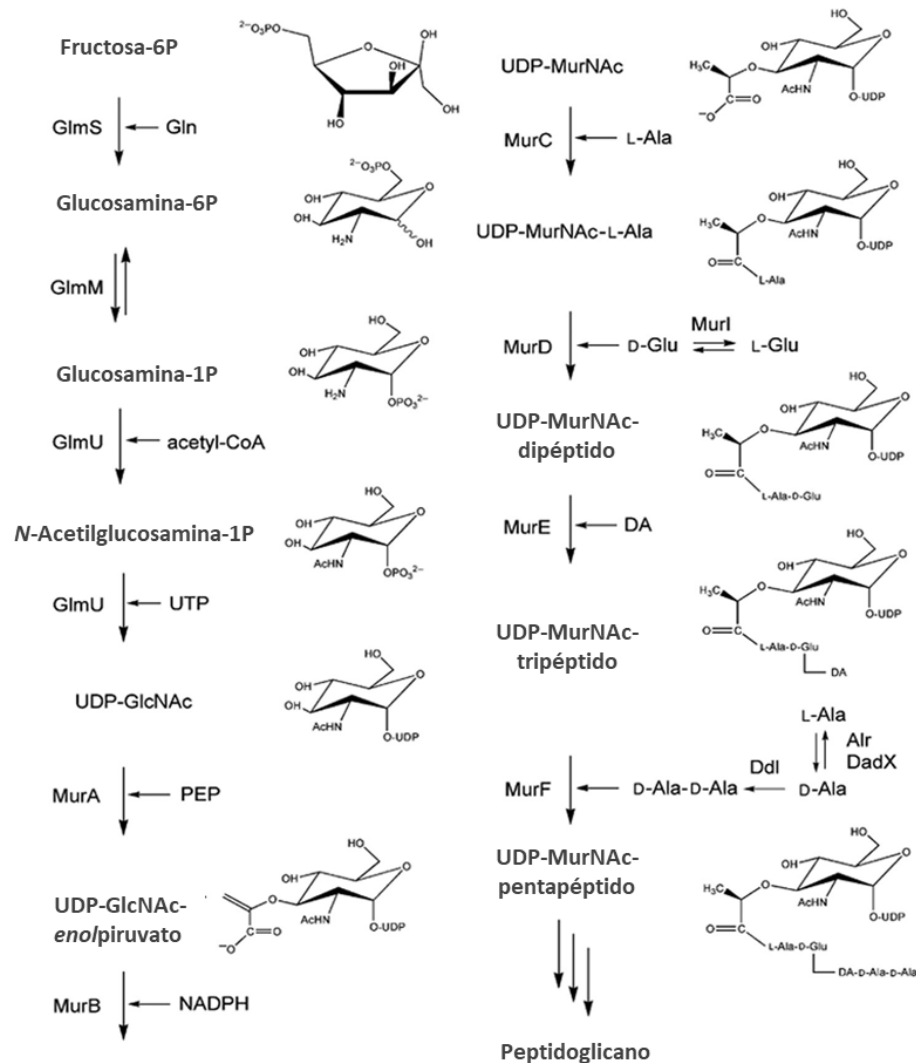


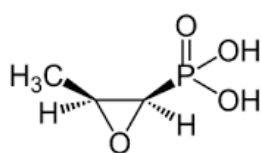
Figura 12. Reacciones citoplasmáticas de la primera fase de la biosíntesis del peptidoglicano (Barreteau *et al.*, 2008).

Las enzimas **MurC** (Mol *et al.*, 2003), **MurD** (Bertrand *et al.*, 1997) y **MurE** (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1999) son una serie de ligasas de aminoácidos dependientes de ATP que llevan a cabo reacciones análogas: la adición de subunidades peptídicas en el lactato

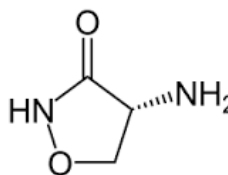
para formar el tripéptido. Así, la enzima **MurC** añade L-alanina al ácido UDP-N-acetilmurámico, continua la enzima **MurD** adicionando D-glutámico (D-Glu), y por último la enzima **MurE** añade L-lisina (L-Lys) en el caso de las bacterias Gram-positivas, o bien ácido meso-diaminopimélico (meso-Dap) en el caso de las bacterias Gram-negativas (Figura 12).

Por último, la enzima **MurF** añade el dipéptido D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) en el grupo lactilo del UDP-MurNAc-tripéptido para formar UDP-MurNAc-pentapéptido, también conocido como nucleótido de Park, precursor monomérico de peptidoglicano (Kahne *et al.*, 2005). Con esta etapa concluye la fase citoplasmática de la biosíntesis de peptidoglicano (Figura 12) (Barreteau *et al.*, 2008).

Se conocen varios antibióticos que inhiben esta primera etapa de la biosíntesis del PG. Por un lado, se encuentra la **fosfomicina** (Figura 13), el único compuesto comercializado hasta el momento, inhibidor natural de la cascada enzimática MurA-MurF. Fue aislado por primera vez en 1969 (Hendlin *et al.*, 1969) a partir del cultivo de varias especies de *Streptomyces*. La fosfomicina actúa como un análogo de PEP inactivando la enzima MurA por alquilación del sitio activo, que es un residuo de cisteína (Cys), produciendo un aducto covalente estable que bloquea dicho sitio y con ello evitando la renovación catalítica posterior (Skarzynski *et al.*, 1998).



Fosfomicina



Cicloserina

Figura 13. Inhibidores naturales de la primera etapa de la biosíntesis del peptidoglicano: fosfomicina y cicloserina.

La **fosfomicina** (Figura 13) es un antibiótico de amplio espectro, activo frente a cepas bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo SARM y VRSA (del inglés Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*), y es usada a menudo en las infecciones del tracto urinario. Sin embargo, *Mycobacterium tuberculosis* no es susceptible a la

fosfomicina ya que la enzima MurA de este microorganismo emplea en el sitio activo un residuo de ácido aspártico (Asp) en vez de uno de Cys (Higgins *et al.*, 2005).

Además, se ha reportado la inhibición de la enzima MurB por algunos derivados de **tiazolidinonas** (Andres *et al.*, 2000) y también se ha estudiado y publicado el efecto inhibitorio sobre las enzimas MurC, MurD, MurE y MurF de diferentes derivados de **fosfinatos** (El Zoeiby *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2001; Tanner *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998), si bien la actividad *in vivo* de estos compuestos no ha sido probada en alguno de los casos y en otros, no aparentan ser compuestos lo suficientemente prometedores como para realizar estudios posteriores. Asimismo, la **feglimicina**, inhibidor natural del virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) aislado de *Streptomyces*, ha sido también descrito como inhibidor específico de las enzimas MurA y MurC (Rausch *et al.*, 2011).

Adicionalmente a los esfuerzos por encontrar inhibidores individuales de las enzimas implicadas en esta etapa, recientemente, ha sido sintetizada una serie de derivados de 5-benzylidenethiazolidin-4-ona que mostraron inhibición multidiana de las enzimas MurD-MurF. Estos compuestos se ensayaron frente a *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* o *P. aeruginosa*, pero ninguno de ellos mostró un efecto antibacteriano considerable frente a estas cepas de bacterias (Tomašić *et al.*, 2010).

La **cicloserina** (Figura 13), es otro inhibidor natural de los primeros pasos de la biosíntesis del PG aunque no actúa en ninguna de las reacciones catalizadas por las enzimas Mur. Fue aislada en 1952 a partir de *Streptomyces orchidaceus*, e inhibe la acción de las enzimas alanina racemasa (Alr o DadX) y D-alanina ligasa (Ddl) responsables de la formación de D-alanil-alanina, sustrato de la enzima MurF (Lambert y Neuhaus, 1972). Este antibiótico es activo frente a la mayoría de las bacterias, incluyendo *M. tuberculosis*, pero rara vez se utiliza debido a sus efectos secundarios adversos, principalmente sobre el sistema nervioso central (Sharma *et al.*, 2015). Sin embargo, recientemente se han hecho estudios en los que exitosamente se utiliza **D-cicloserina** para el tratamiento de los trastornos de ansiedad y depresiones (Attari *et al.*, 2014) y del autismo (Urbano *et al.*, 2014).

2.2.3.2 Antibióticos que inhiben la segunda etapa de la biosíntesis del PG

La segunda etapa de la biosíntesis de peptidoglicano tiene lugar en el citoplasma en la cara interna de la membrana celular e implica a las enzimas **MraY** y **MurG** (Figura 10). **MraY** (fosfo-MurNac-pentapéptido translocasa) o *translocasa I* es una enzima asociada a la membrana que cataliza la reacción en la que interviene UDP-MurNac-pentapéptido con una molécula lipídica transportadora, C₅₅ undecaprenil fosfato (también conocido como *bactoprenol*), que está situada en la superficie de la parte interna de la membrana para generar el **lípidio I** (undecaprenil-pirofosfato MurNac-pentapéptido), liberando una unidad de UMP (Bouhss *et al.*, 2008). Después, el **lípidio I** se conecta con una segunda unidad de GlcNac procedente de otra molécula de UDP-GlcNac mediante una reacción catalizada por la enzima **MurG** (glicosiltransferasa) o translocasa II, dando lugar al **lípidio II** que posteriormente pasará a la cara externa de la membrana citoplasmática (Heijenoort, 2007).

Se ha descrito un número considerable de inhibidores de la enzima **MraY** (Dini, 2005) (Lecerclé *et al.*, 2010), pero existen tres familias representativas de este tipo de antibióticos que además han sido ampliamente estudiadas. Estas están constituidas por el conjunto de compuestos que forman las **tunicamicinas**, las **mureidomicinas** y las **liposidomicinas** (Figura 14) (Bouhss *et al.*, 2008), todos ellos productos naturales de origen microbiano que se piensa que actúan compitiendo con el sustrato (UDP-MurNac-pentapéptido) de dicha enzima.

La **tunicamicina** fue aislada en 1971 de una cepa de *Streptomyces lysosuperificus*, y presenta actividad frente a las bacterias Gram-positivas, levaduras y hongos, así como también actividad antivírica y antitumoral. Estructuralmente está formada por un grupo uracilo, N-acetilglucosamina, dos restos azucarados unidos por enlace O-glucosídico (aminodialdosa de 11 carbonos) que se conoce como *fragmento de tunicamina*, y una cadena de ácido graso ligada al grupo amino.

La **tunicamicina** se produce como una mezcla de varios antibióticos homólogos que se diferencian en la longitud y saturación de la cadena del ácido graso (Figura 14). Su acción biológica no es selectiva frente a la enzima MraY de la biosíntesis del peptidoglicano en células procariotas, ya que además se descubrió que la tunicamicina también era un inhibidor reversible de la UDP-GlcNac-dolicil-fosfato-GlcNac-1-fosfato transferasa, enzima que participa en la biosíntesis de glicoproteínas de células de

mamíferos (Heifetz *et al.*, 1979). Debido a su alta toxicidad, la tunicamicina no se usa como antibiótico en la práctica clínica, pero sí como herramienta experimental ya que induce el desplegamiento de las proteínas como respuesta al estrés celular (Mitra *et al.*, 2002). También se ha usado como modelo en el estudio de mecanismos bacterianos (Ichikawa, 2008) y recientemente se ha utilizado en estudios relacionados con la supresión de la respuesta inmune donde se ha observado que reduce la proliferación de los linfocitos-T y retrasa la incidencia de diabetes tipo 1 (Shaabani *et al.*, 2012).

Existen varios grupos de compuestos relacionados con la familia de las tunicamicinas, como son las **estreptovirudinas** y las **corinetoxinas** (Eckardt, 1983).

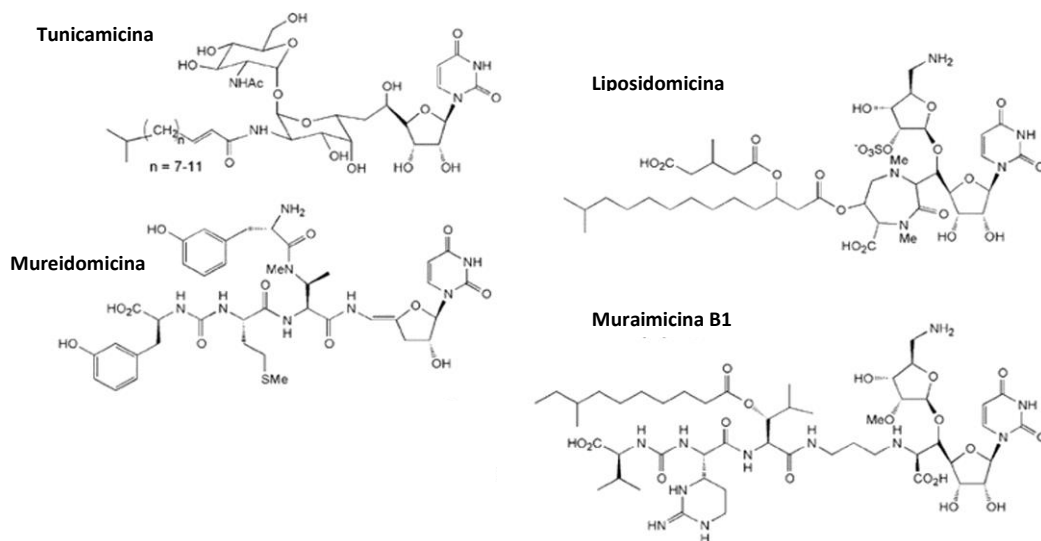


Figura 14. Inhibidores naturales de la segunda etapa de la biosíntesis del peptidoglicano: tunicamicina, liposidomicina B y mureidomicinas A y B1 (Bouhss *et al.*, 2008).

En cambio, las **mureidomicinas** y las **liposidomicinas** (Figura 14), sí que inhiben específicamente la enzima bacteriana MraY con cinéticas de unión distintas a las de la tunicamicina (Brandish *et al.*, 1996). Las **mureidomicinas** forman una familia de seis compuestos de carácter peptidil nucleósido, que fueron aisladas por primera vez en 1989 de una cepa de *Streptomyces flavidovirens*. Además de un metilo y dos residuos de tirosina, contienen el ácido 2-amino-3-N-metilaminobutírico (AMBA) así como

uracilo o dihidrouracilo respectivamente. Estos antibióticos presentan una alta y específica actividad frente a cepas de *Pseudomonas* (CMI = 0.1-3.13 µg/mL) aunque no existen derivados en uso clínico. Por su parte, las **liposidomicinas** muestran una actividad muy buena frente a *Mycobacteria*, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes, y debido a que su nivel de toxicidad es muy bajo pueden administrarse mediante inyección intravenosa en dosis de hasta 500 mg/Kg. Constituyen una familia de antibióticos del tipo uracil nucleósido originalmente aislados en 1985 en Japón a partir de *Streptomyces griseosporus* (Isono *et al.*, 1985).

Otros inhibidores naturales de la enzima *MraY*, menos estudiados o que se han descrito más recientemente, son la **capuramicina** (Yamaguchi *et al.*, 1986), la **napsamicina** (Chatterjee *et al.*, 1994), la **pacidamicina** (Fronko *et al.*, 2000), la **muraimicina** (McDonald *et al.*, 2002), el compuesto **FR900493** (Hirano *et al.*, 2007) y la **caprazamicina** (Hirano *et al.*, 2007). Muchos de estos inhibidores de origen natural han inspirado la síntesis y semisíntesis de varios otros (Kimura y Bugg, 2003). Así, se han sintetizado varios derivados de muraimicinas (Lin *et al.*, 2002) y capuramicinas (Bogatcheva *et al.*, 2011) presentando, en algunos casos, mejores actividades *in vitro*.

Al contrario que para la enzima *MraY*, se han descrito muy pocos inhibidores de la enzima *MurG*. Además, el estudio tanto de esta enzima como de su sustrato se ha visto obstaculizado por el hecho de que está presente en la célula en cantidades muy pequeñas. Recientemente han sido aislados algunos cristales puros, por lo que su estructura ha podido ser finalmente elucidada (Hu *et al.*, 2003a). Se han llevado a cabo varios proyectos para identificar inhibidores sintéticos frente a la enzima *MurG* de *E.coli* en los que se ha tenido un éxito relativo (Trunkfield *et al.*, 2010).

2.2.3.3 Antibióticos que inhiben la tercera etapa de la biosíntesis del PG

La tercera y última etapa de la biosíntesis del peptidoglicano la componen principalmente dos reacciones, una transglicosilación y una transpeptidación que permiten la formación de los enlaces glicosídicos y peptídicos en el PG (polimerización y entrecruzamiento de las cadenas de glicano respectivamente). Es considerada enzimáticamente la etapa más compleja debido a que ambas reacciones están catalizadas por un gran grupo de diferentes enzimas conocidas como proteínas fijadoras de penicilina (penicillin binding proteins, PBPs). En este contexto es

interesante destacar que, por ejemplo, *E. coli* puede producir 12 diferentes PBPs (O'Daniel *et al.*, 2010).

En esta etapa el lípido II, precursor resultante de la fase anterior, es transferido al exterior de la membrana citoplasmática de manera que el disacárido pentapéptido que se libera del bactoprenol, se incorpora al PG ya formado de la pared celular existente mediante la polimerización de varias unidades disacáridas. Esta es la reacción de transglicosilación que consiste en la unión glicosídica (unión β 1-4) entre el NAM (N-acetil-murámico) del disacárido pentapéptido que se incorpora y la NAG (N-acetil-glucosamina) de un disacárido pentapéptido previamente integrado en la pared celular. Durante esta reacción se libera pirofosforilundecaprenol, que será desfosforilado para obtener de nuevo bactoprenol, que será útil para la siguiente translocación. El bactoprenol permite el transporte y ensamblaje de sustancias que, como los azúcares, son hidrofílicas, y no podrían pasar por sí mismas la barrera hidrofóbica de la membrana. Estas reacciones están catalizadas por enzimas *transglicosilasas*, que son miembros de la familia de proteínas tipo PBPs.

Así, el último paso de esta biosíntesis es la unión entrecruzada de dos cadenas paralelas de polisacáridos a través de la acción de enzimas *transpeptidasas*. En la reacción de transpeptidación, que se da extracelularmente en ausencia de donadores tipo ATP, primero se rompe el enlace del dipéptido terminal D-ala-D-ala. De esta hidrólisis proviene la energía para la reacción, y después la D-ala en la posición 4 se une con el aminoácido L-lisina de la posición 3 de una cadena contigua, formándose un enlace peptídico entre ellos. Esta disposición estructural otorga al PG la firmeza necesaria para asegurar la estabilidad de la célula y la resistencia a la alta presión osmótica.

Las enzimas involucradas en esta última etapa de la biosíntesis del peptidoglicano constituyen una atractiva diana para muchos antibióticos. No solo por el hecho de ser esenciales y específicas de bacterias sino también porque, al estar localizadas en la fase extracelular de la ruta en bacterias Gram-positivas y en el periplasma en bacterias Gram-negativas, están muy accesibles incluso para compuestos que no pueden penetrar en la pared celular (Lovering *et al.*, 2012). Inicialmente, las PBPs fueron agrupadas según su afinidad por la penicilina, pero después fueron clasificadas según su peso molecular en dos grandes grupos: PBPs de bajo peso molecular (<50 kDa) o

PBPs de alto peso molecular (≥ 50 kDa). Ambos grupos de proteínas PBPs, de bajo y alto peso molecular, están anclados a la membrana (O'Daniel *et al.*, 2010). Mientras que muchas de las enzimas que pertenecen al grupo de las PBPs de alto peso molecular contienen dominios de transglicosilasa y transpeptidasa (Lovering *et al.*, 2007), el otro grupo de enzimas parece ser que sólo catalizan una de las dos reacciones (Kahne *et al.*, 2005). Las PBPs de alto peso molecular son las principales responsables de la polimerización del peptidoglicano aunque también se cree que desempeñan un papel muy importante en la morfogénesis de la célula e interactúan con proteínas del ciclo celular (Sauvage *et al.*, 2008). Por su parte las PBPs de bajo peso molecular están involucradas en la maduración y reciclado del peptidoglicano (Sauvage *et al.*, 2008).

A pesar de la gran variedad en número de diferentes PBPs, la mayoría de ellas son inhibidas por los mismos antibióticos, lo que es debido al alto grado de conservación de los dominios activos que hay entre las mismas. Existe un número bastante considerable de compuestos de origen natural que inhiben esta última etapa de la síntesis del peptidoglicano y podríamos clasificarlos en tres categorías diferentes: a) los inhibidores de las transpeptidasas; b) los inhibidores de las transglicosilasas; y c) aquellos que se unen al sustrato de reacción transpeptidación/transglicosilación (Kahne *et al.*, 2005). Los **antibióticos β -lactámicos** pertenecen a la primera categoría, y los miembros más representativos de la segunda y tercera categoría son la **moenomicina** y la **vancomicina** respectivamente (Figura 15).

Los **antibióticos β -lactámicos** poseen un anillo lactámico en su estructura, con un nitrógeno en posición β con respecto al grupo carbonilo con el que forma el enlace lactama (Suárez y Gudiol, 2009). En función de los radicales que se unen a este anillo se distinguen varios subgrupos de los que los más importantes son: **penicilinas**, **cefalosporinas**, **monobactamas** y **carbapenemas** (Asbel y Levison, 2000). Los β -lactámicos bloquean las PBPs porque el anillo β -lactámico tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas del peptidoglicano, que es el sustrato natural de estas enzimas transpeptidasas y se unen a su sitio activo (Waxman y Strominger, 1983). Estos antibióticos son producidos tanto por hongos filamentosos como por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Brakhage *et al.*, 2005) y son de acción bactericida lenta, con actividades dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Su espectro incluye bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como espiroquetas, y no muestran actividad

sobre los micoplasmas, debido a que carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como las clamidias o las rickettsias, debido a su escasa capacidad de penetración dentro de las células. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica, con lo que la aparición de cepas resistentes a los mismos está muy extendida.

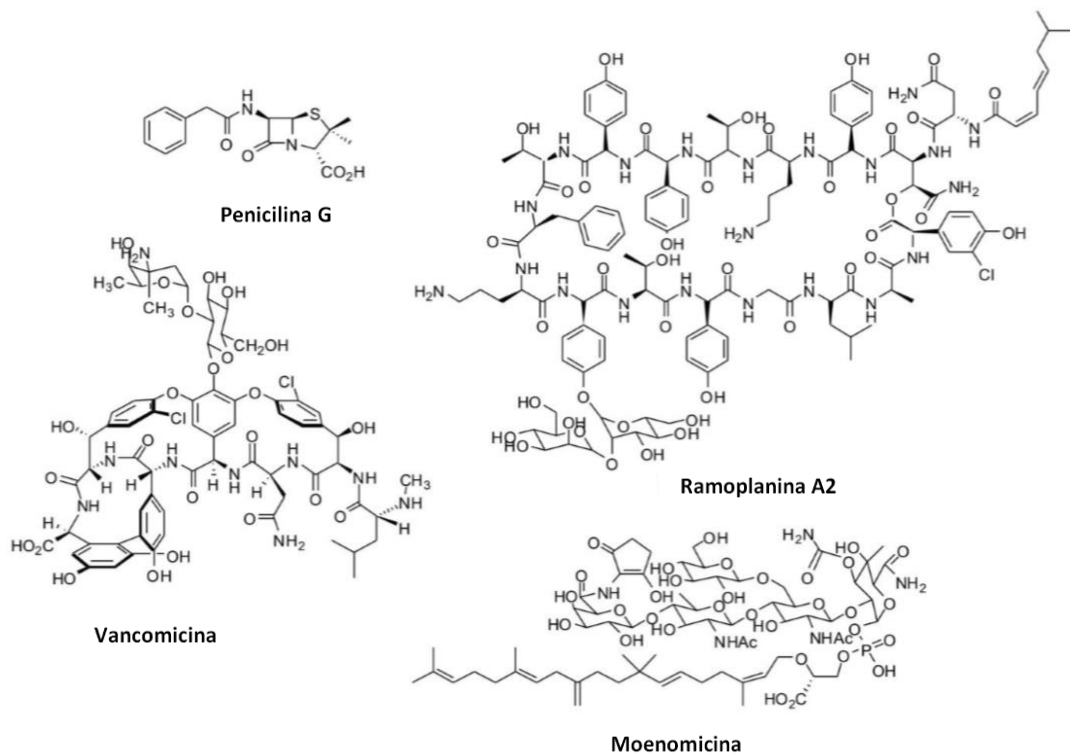


Figura 15. Inhibidores naturales de la tercera etapa de la biosíntesis del peptidoglicano: penicilina, ramoplanina A2, vancomicina y moenomicina.

Básicamente, las bacterias pueden desarrollar resistencia a estos antibióticos mediante 3 mecanismos diferentes: a) Por la producción de β -lactamasas, enzimas que hidrolizando el enlace amida del anillo β -lactámico inactivan dichos antibióticos antes de que se unan a las PBPs. Hay muchos tipos, en función del antibiótico β -lactámico que hidrolizan, y su producción puede estar mediada por plásmidos o bien puede estar cromosómicamente codificada; b) Por la modificación de la diana en las PBPs: diferentes alteraciones en estas proteínas (mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad) pueden dificultar su unión con el antibiótico y así disminuye su actividad; y c) Por alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión.

A pesar de esta diversidad de mecanismos, el más común es la presencia de β -lactamasas. El uso de inhibidores de β -lactamasas en combinación con antibióticos β -lactámicos facilita la inactivación de determinadas β -lactamasas producidas por bacterias tanto Gram-positivas, Gram-negativas, como anaerobias, y también por micobacterias. Actualmente existen tres inhibidores de β -lactamasas: **ácido clavulánico**, **sulbactam** y **tazobactam** (Barcelona *et al.*, 2008). Ejemplos de estas combinaciones son: amoxicilina-clavulánico (comercializada por GlaxoSmithKline™ como *Augmentine*®), amoxicilina-sulbactam, ampicilina-sulbactam (conocida como *sultamicilina*, comercializada por Pfizer™ como *UNASYN*®), cefoperazona-sulbactam (conocida como *Sulperazon*®, comercializada con el mismo nombre por Pfizer™), piperacilina-tazobactam (comercializada como *Tazocin*® por Wyeth™) y ticarcilina-clavulánico (comercializada por GlaxoSmithKline™ como *Timentin*®). Sin embargo, las resistencias a estas asociaciones de antibióticos han ido aumentando paulatinamente durante los últimos años (Drawz y Bonomo, 2010; Toussaint y Gallagher, 2015).

Las **moenomicinas** (Figura 15) son una familia de antibióticos glicolípidicos producida como un complejo de varios compuestos por *Streptomyces ghananensis* y cuyo mayor representante es la moenomicina A (Galley *et al.*, 2014). Es el único grupo de antibióticos que directamente inhiben las glicosiltransferasas involucradas en la etapa de transglicosilación de la síntesis del péptidoglicano (Adachi *et al.*, 2006). Ciertas bacterias Gram-negativas incluyendo *Neisseria*, *Helicobacter*, *Brucella*, *Pasteurella* y *Pseudomonas*, son relativamente sensibles a las moenomicinas (Torikata *et al.*, 1977), pero sin embargo son altamente eficaces frente a diversas bacterias Gram-positivas, incluyendo algunas con resistencia a meticilina y vancomicina, ya que presentan valores de CMI que oscilan entre 1-100 ng/mL. A pesar de su gran actividad no han sido desarrolladas como fármacos ya que sus propiedades farmacocinéticas son poco adecuadas; aunque sí han sido comercializadas como promotores del crecimiento animal con los nombres de Flavomicina® y Flavofosfolipol® (Ostash y Walker, 2010). No se conocen resistencias adquiridas a las moenomicinas, si bien la resistencia natural de algunos *Enterococcus faecium* ha sido reportada (Butaye *et al.*, 2003).

La **vancomicina** (Figura 15) es el antibiótico más representativo de la familia de los glicopéptidos. Fue aislada por primera vez en 1956 a partir de *Streptomyces orientalis* (conocido actualmente como *Amycolatopsis orientalis*) y en 1958 fue aprobada su comercialización como tratamiento frente a infecciones producidas por bacterias

Gram-positivas (Levine, 2006). Este grupo de antibióticos, que actúan en un paso previo al grupo de los β -lactámicos, lo forman compuestos de alto peso molecular, complejos y anfóteros, como son la **teicoplanina** comercializado en Europa y la **avoparicina** promotora del crecimiento de animales (Williams y Bardsley, 1999).

La **vancomicina** inhibe la biosíntesis de la pared celular uniéndose fuertemente, mediante cinco enlaces de hidrógeno, al extremo D-Ala-D-Ala de la cadena del disacárido pentapeptídico, evitando así la acción de las glucosiltransferasas y transpeptidasas, y en consecuencia evitando la elongación del peptidoglicano (Allen y Nicas, 2003). Sin embargo, los integrantes de esta familia de moléculas solamente resultan eficaces frente a microorganismos Gram-positivos (incluyendo con gran frecuencia cepas multi-resistentes) debido a su gran tamaño, que les impide su paso a través de la pared de las bacterias Gram-negativas (Kahne *et al.*, 2005). Por otro lado, aunque son bactericidas frente a *Staphylococcus* spp., solo tienen actividad bacteriostática frente a *Enterococcus* spp. (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). En un principio y a causa de los efectos secundarios que provoca la vancomicina se limitó su uso a los casos de pacientes con alergia a los β -lactámicos. Sin embargo, la aparición en los años 80 de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos Gram-positivos, favoreció de nuevo el uso de este antibiótico. Actualmente, los casos de resistencias reportadas en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. han ido en aumento en frecuencia llegando a representar un problema hospitalario para algunos países en Europa y Estados Unidos. De hecho, hay una necesidad urgente de encontrar nuevos antibióticos que actúen frente a estas bacterias resistentes.

La **ramoplanina A2** (Figura15) fue descubierta a partir de una cepa de *Actinoplanes* sp. en 1984. Actúa inhibiendo la transglicosilación secuestrando el intermediario lipídico II y presenta buena actividad frente a varios microorganismos resistentes a vancomicina. Su mecanismo de acción y propiedades se detallan más adelante en apartados posteriores a lo largo de esta tesis.

Además se consideran también inhibidores de esta etapa otros antibióticos (Figura 16) como la **bacitracina** que interfiere con la desfosforilación del *C₅₅ undecaprenil fosfato* (Stone y Strominger, 1971); los lantibióticos, como la **nisina** que interactúa con el lípido II e induce la formación de poros en la membrana plasmática (Lubelski *et al.*, 2008); la

manopeptimicina que inhibe la transglucosilación uniéndose al lípido II posiblemente en diferente lugar que la vancomicina y las ramoplaninas (Ruzin *et al.*, 2004); y las **katanosinas** activas frente a ERV (*Enterococcus* Resistentes a la Vancomicina) y SARM (*Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina) cuyo modo de acción no se ha estudiado con suficiente detalle pero se cree que es parecido al de la manopeptimicina (Maki *et al.*, 2001).

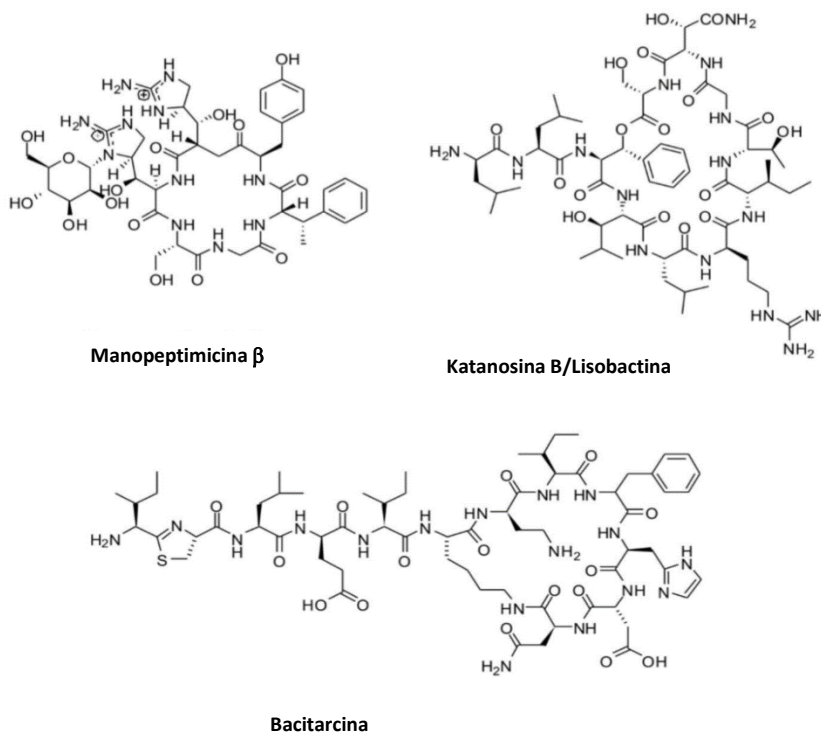


Figura 16. Otros Inhibidores naturales de la tercera etapa de la biosíntesis del PG: manopeptimicina, katanosina y bacitracina.

2.2.4 RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema multifactorial, con implicaciones tanto microbiológicas como terapéuticas, epidemiológicas y de salud pública. Es un hecho que implica el incremento de los costes médicos, estancias hospitalarias prolongadas y un indudable aumento de la mortalidad. Hoy en día es una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo.

Las resistencias se describieron al poco tiempo de que estos fármacos comenzaran a emplearse clínicamente, ya desde el inicio mismo del uso de la penicilina.

Posteriormente, en los años sesenta surgió la resistencia a la meticilina y seguidamente aparecieron diversos mecanismos de resistencia a los β -lactámicos y a la vancomicina, así como a las quinolonas.

Las causas que motivan la resistencia son múltiples. Desde el punto de vista bioquímico los mecanismos de resistencia incluyen: a) alteraciones de la permeabilidad (debido a la sustitución de las porinas al modificar su calibre o polaridad interna); b) la modificación del antibiótico (mediante la adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis); c) la modificación, protección o hiperproducción de la diana; d) la expresión de bombas de expulsión activa; y e) la modificación de ciertas vías metabólicas (Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

Desde el punto de vista genético, los dos procesos claves por los que un microorganismo se hace resistente son la aparición de mutaciones o la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal, principalmente por conjugación y en menor medida por transformación o transducción (Figura 17).

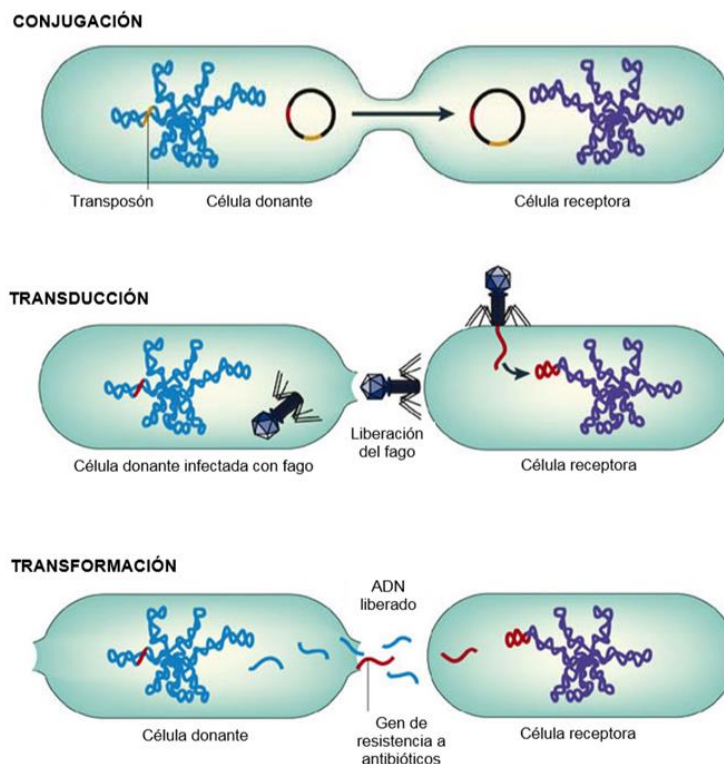


Figura 17. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (Furuya y Lowy, 2006).

Habitualmente, la resistencia de trascendencia clínica se evalúa mediante diferentes técnicas capaces de establecer de forma cuantitativa la actividad *in vitro* de los antimicrobianos. Estos ensayos permiten definir la concentración mínima inhibitoria CMI (expresada en mg/L o en $\mu\text{g/mL}$) como la cantidad mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de 10^5 bacterias/mL en condiciones estandarizadas.

Existen varios comités como el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) en Estados Unidos y el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europa que teniendo en cuenta diferentes aspectos farmacológicos y clínicos, han definido puntos de corte para establecer categorías clínicas (sensible, intermedio y resistente), que predicen la probabilidad de éxito o de fracaso terapéutico al emplear un determinado antimicrobiano.

Otra técnica utilizada, es la que mide la CMB definida como la “concentración mínima bactericida” de antibiótico (expresada en mg/L o en $\mu\text{g/mL}$) que produce la muerte *in vitro* en condiciones estandarizadas de 10^5 bacterias/mL. Los antimicrobianos definidos como bactericidas tendrán una CMB igual o solo algo superior a la CMI, mientras que los bacteriostáticos tendrán una CMB varias veces superior. Si para un compuesto habitualmente bactericida la CMB frente a un microorganismo es ≥ 32 veces el valor de su CMI, se considera que dicho microorganismo es tolerante (Dhar y McKinney, 2007). Por otro lado, existen diversos métodos bioquímicos o genéticos que permiten demostrar la existencia de un mecanismo de resistencia o del gen o genes que lo codifican, de manera que un resultado positivo permite categorizar directamente al correspondiente microorganismo como resistente (Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

Algunos de los factores de riesgo que se asocian a la aparición de resistencias son entre otros: a) el uso indiscriminado de antibióticos tanto en humanos, veterinaria y/o horticultura; b) el uso de sustancias antisépticas; c) la hospitalización prolongada de los pacientes; y d) el uso de dispositivos invasivos como los catéteres.

Sin embargo, la resistencia a los antibióticos podría ser un hecho poco reciente. Estudios metagenómicos de diferentes muestras de suelo, sedimentos oceánicos y ambientes anteriores a la era pre-antibiótica, han demostrado la presencia de genes similares a los conocidos actualmente por otorgar fenotipo de resistencia a antibióticos (D’Costa *et al.*, 2011). Se ha postulado que los genes de resistencia

podrían cumplir funciones diferentes a la propia de crear resistencia y ser desplazados desde reservorios genéticos ambientales difundiéndose entre bacterias taxonómicamente diferentes (Martínez *et al.*, 2007). De modo que para abordar el estudio del resistoma, definido como el conjunto de genes de resistencia y sus precursores, y los problemas que implica en la práctica clínica es necesaria una aproximación que integre tanto las condiciones ambientales como el enclave genético y al mismo tiempo las particularidades clínicas (Chakradhar, 2016).

La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas IDSA (Infectious Diseases Society of America) ha definido un grupo de microorganismos patógenos como *ESCAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacteriaceae*), debido a que presentan resistencia a varios antibióticos y a que “escapan” de la acción de la mayoría de las opciones terapéuticas disponibles (Arias y Murray, 2009).

Asimismo, a principios de 2017 la OMS hizo pública su primera lista de *patógenos prioritarios* resistentes a los antibióticos, con el fin de guiar y promover la investigación y el desarrollo (I+D) de nuevos antimicrobianos y garantizar una eficaz respuesta a esta urgente necesidad sanitaria. Dicha lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, elevada o media, y en ella se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana (Figura 18) (Tacconelli *et al.*, 2018).

La resistencia a los antibióticos plantea un gran reto en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a estos compuestos ya ha llegado a niveles alarmantes en muchas partes del mundo, y se han detectado niveles muy altos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias asociadas a un gran número de infecciones comunes (infecciones del tracto urinario, neumonía, tuberculosis y gonorrea).

Para abordar este problema, se han desarrollado diferentes iniciativas a nivel mundial, y entre ellas se encuentran la Declaración Política de las Naciones Unidas de 2016 sobre la resistencia a los antimicrobianos y el Plan de Acción Mundial de la OMS de 2015, a las que se sumaron posteriormente la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Tal es la envergadura del problema que incluso el tema ha sido tratado en foros como el G7 y el G20.

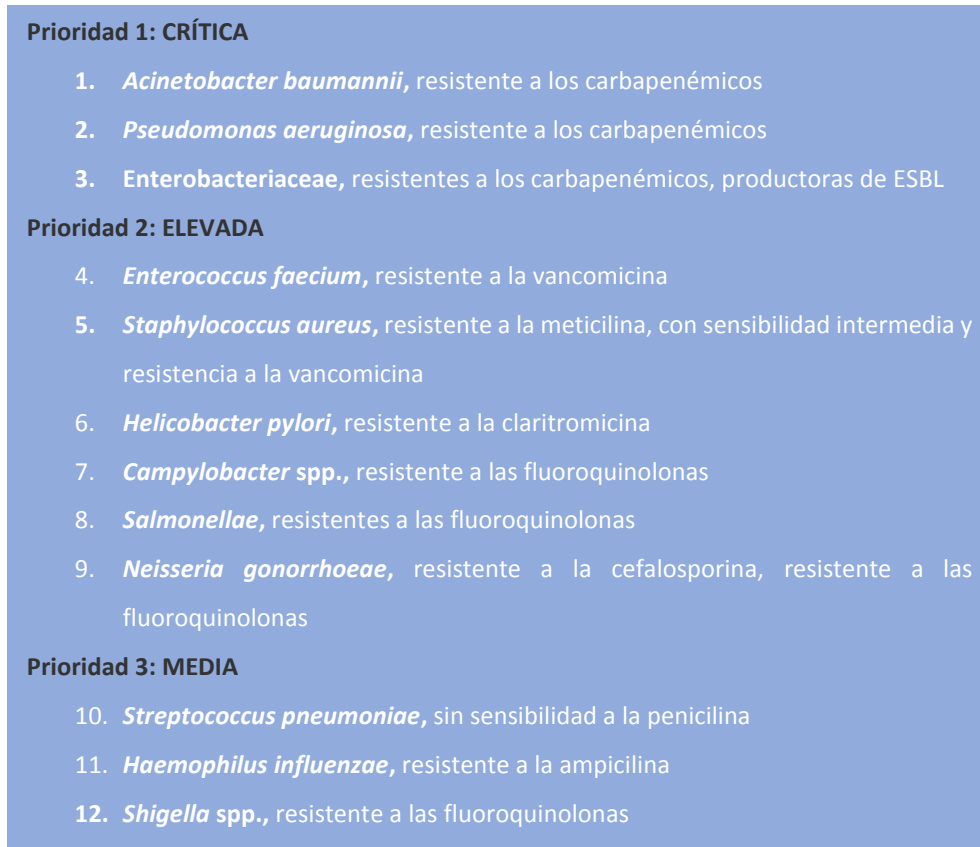


Figura 18. Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018)

A nivel europeo ya desde 1999, se viene invirtiendo económicamente en la investigación de la resistencia a los antimicrobianos, hecho que hace de Europa un líder en este ámbito. Entre las iniciativas puestas en marcha por la UE destacan: el programa *New Drugs for Bad Bugs* (ND4BB), que asocia a nivel mundial el sector público y el privado, y que a su vez forma parte de la Iniciativa sobre Medicamentos Innovadores (IMI). Además, la UE ha creado la Iniciativa de Programación Conjunta sobre la resistencia a los antimicrobianos (JPIAMR), para coordinar mejor a escala mundial las actividades de investigación en materia de resistencia a los antibióticos.

2.3 NUEVAS DIANAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE ANTIBIÓTICOS

2.3.1 EL LÍPIDO II COMO DIANA DE ANTIBIÓTICOS

El lípido II (Figura 19) es un precursor esencial para la biosíntesis de la pared celular bacteriana. La estructura básica de este precursor está formada por el transportador bactoprenol C₅₅-P enlazado mediante un puente pirofosfato a la unidad disacárida N-acetil-muramyl-pentapéptido-N-acetil-glucosamina (GlcNAc-MurNAc-pp). El poliisoprenoide consta de ocho unidades en conformación *cis*, seguidas de otras dos unidades en conformación *trans* que a su vez están unidas a una unidad de isopreno terminal. El grupo hidrofílico lo forman las unidades N-acetil-murámico (M) y N-acetil-glucosamina (G) y un pentapéptido formado normalmente por la secuencia L-alanina-D-glutamato-L-lisina (o ácido meso-diaminopimélico)- D-alanina-D-alanina (en la Figura 19 los símbolos A-E-K-A-A) (Breukink y de Kruijff, 2006).

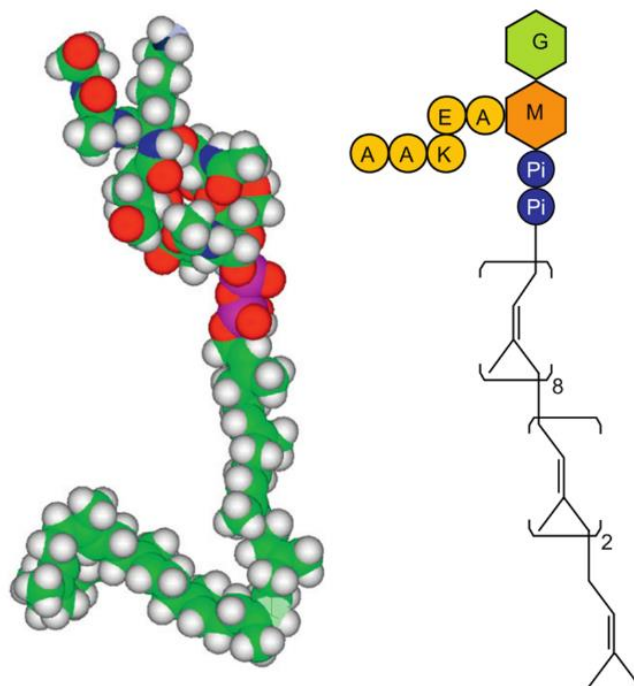


Figura 19. Representación espacial (space-filling model) y estructura química del lípido II con las configuraciones de las unidades isoprenoideas (Breukink y de Kruijff, 2006).

El lípido II es un componente minoritario de la membrana citoplasmática, sin embargo, es el principal responsable del rápido crecimiento de la pared celular bacteriana. Se ha estimado que el ciclo completo del lípido II tiene lugar en menos de 1 segundo (de Kruijff *et al.*, 2008). Brevemente, este ciclo se inicia en el lado citoplasmático de la

membrana, donde comienza la formación de las subunidades que forman la pared celular y donde el UDP-MurNAc-pentapéptido se acopla al bactoprenil-fosfato, catalizado por la enzima MraY, para dar lugar al lípido I. A continuación, se une la GlcNAC, por acción de la enzima MurG dando lugar así al lípido II, que contiene por tanto la subunidad de peptidoglicano completa, unida vía enlace pirofosfato al bactoprenol anclado a la membrana. Después, el lípido II es trasladado al exterior de la membrana plasmática mediante la actividad de una flipasa FtsW (Mohammadi *et al.*, 2011) e incorporado al creciente ensamblado de peptidoglicano mediante las reacciones de transglicosilación y transpeptidación. Finalmente, el C₅₅-PP es liberado, y tras una defosforilación vuelve a entrar en un nuevo ciclo (Münch y Sahl, 2015).

Es importante destacar que investigaciones recientes han mostrado que la función celular en la fisiología bacteriana del lípido II, va más allá de ser un mero componente pasivo en la formación del PG. Parece ser que además tiene un papel importante en la modulación de la disposición de los fosfolípidos de membrana y en la organización de las diferentes reacciones enzimáticas. A su vez, se ha demostrado que sirve como molécula de señal para la PknB Ser/Thr quinasa, que participa en la coordinación de la formación entrecruzada de peptidoglicano en la pared, en la autólisis y en la división celular (Muller *et al.*, 2017).

A pesar del pequeño tamaño de esta molécula, el lípido II posee varios lugares de unión para los antibióticos como se puede observar en la Figura 20. Dicha unión generalmente acaba causando el bloqueo de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación.

Cuatro clases diferentes de antibióticos (Figura 20) tienen como diana el lípido II: a) los glicopéptidos (incluyendo vancomicina y teicoplanina); b) los depsipéptidos (incluyendo ramoplanina y enduracidina), c) los lantibióticos (incluyendo nisina y mersacidina); y d) los ciclopéptidos (incluyendo manopeptimicina, plusbacina y katanosina B (Fletcher *et al.*, 2015). También algunas defensas, péptidos antimicrobianos de origen eucariótico, como plectasina se unen al lípido II (Schneider *et al.*, 2010). Así por ejemplo, la vancomicina se une mediante cinco enlaces de hidrógeno fuertemente al extremo D-Ala-D-Ala de la cadena del disacárido pentapeptídico, mientras que el sitio de unión para otros antibióticos lo componen la unidad de azúcar pirofosfato (Figura 20).

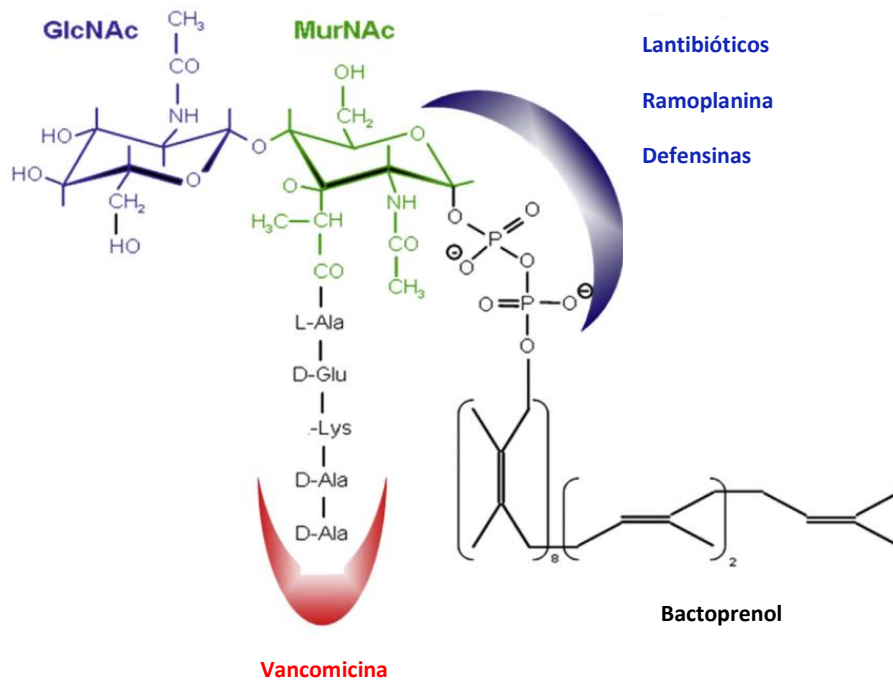


Figura 20. Sitios de unión del lípido II con diferentes grupos de antibióticos (Münch y Sahl, 2015).

A continuación, se describen brevemente algunos de los antibióticos (y sus familias) que tienen como diana el lípido II.

Los glicopéptidos son un grupo diverso de antibióticos de origen natural, cuyos miembros representan fármacos de último recurso para el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos Gram-positivos resistentes, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y enterococos. Los glicopéptidos son producidos por actinomicetos y son antibióticos de síntesis no ribosomal (NRPS). Estructuralmente tienen en común un heptapéptido que bien puede formar un *core* tri o tetracíclico. La complejidad química dentro de este grupo surge de la unión al péptido central de azúcares, con sustituyentes hidrófobos y la adición de átomos de cloro. Estas modificaciones pueden variar en número, posición y estructura y pueden afectar variando las propiedades químicas y biológicas de los diferentes compuestos. La vancomicina y la teicoplanina representan los antibióticos glicopéptidos en la práctica clínica y constituyen los dos principales subgrupos estructurales. Entre ellas se diferencian en los aminoácidos situados en posiciones 1 y 3 y en algunos de los

sustituyentes laterales de los residuos aromáticos, lo que hace que la teicoplanina por su carácter más lipófilo tenga una buena penetración tisular y una vida media más larga que la vancomicina. Por otro lado, derivados semisintéticos pertenecientes a esta familia de antibióticos son la telavancina, oritavancina y dalbavancina con un espectro de actividad similar, pero más activos que la vancomicina.

Como se ha descrito anteriormente, la vancomicina y otros antibióticos glicopéptidos interfieren con la biosíntesis de la pared celular uniéndose al lípido II mediante la formación de cinco enlaces de hidrógeno distintos entre el núcleo de glicopéptido y el extremo acilo-D-Ala-D-Ala del lípido II, dando lugar a un complejo considerablemente estable y rígido que interfiere estéricamente en la prolongación de la cadena de peptidoglicano inhibiendo así su transglicosilación y transpeptidación.

La vancomicina fue el primer antibiótico que se descubrió que tenía como diana el lípido II, y ha sido durante mucho tiempo el tratamiento de primera línea en las infecciones graves causadas por bacterias resistentes a otros antibióticos. No obstante, la resistencia a vancomicina se ha hecho muy común tanto en número de bacterias como en países, llegando a representar un gran problema hospitalario en muchos de ellos, sobre todo en los de Europa y Estados Unidos (Martínez Rivera *et al.*, 2006). Por esta razón, encontrar tratamientos alternativos a la vancomicina es una urgente necesidad, y los grupos de antibióticos descritos anteriormente que actúan sobre la misma diana pero de diferente forma, pueden ser una atractiva posibilidad, con la que además se eviten resistencias cruzadas. Además, una ventaja añadida es que el lípido II está restringido a bacterias, lo que hace disminuir la posibilidad de que estos compuestos presenten elevada citotoxicidad en humanos.

En el grupo de los ciclopéptidos destacan las manopeptimicinas, una mezcla de antibióticos glicopéptidos cíclicos producidos por una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, también las plusbacinas lipopéptidos cíclicos que contienen guanidina producidos por *Lysobacter* spp. y que se caracterizan por la presencia de una arginina y dos residuos de ácido hidroxiaspártico en el core peptídico, y por último la katanosina B conocida además como lisobactina también producida por diferentes *Lysobacter* spp. y otras bacterias relacionadas con el género *Cytophaga*, formada por 11 aminoácidos principalmente no proteogénicos (Figura 21) y que presenta una amplia actividad frente a patógenos Gram-positivos incluyendo cepas multirresistentes y

micobacterias. De este último antibiótico se ha demostrado recientemente mediante ensayos de inhibición enzimática la formación de complejos 1:1 con el lípido II (Lee *et al.*, 2016).

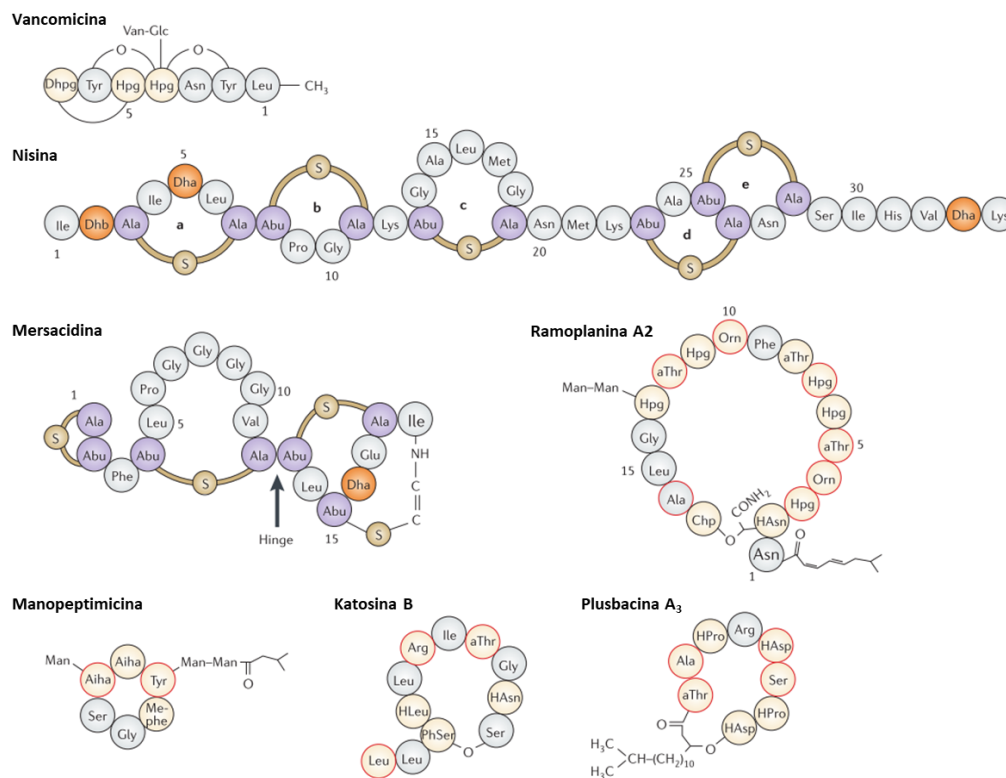


Figura 21. Estructura de algunos antibióticos que tienen como diana el lípido II. Los D-aminoácidos están coloreados en rojo. En la estructura de la nisina, los cinco anillos de lantionina están nombrados desde la a hasta la e (Breukink y de Kruijff, 2006).

Los depsipéptidos y los lipo-depsi-péptidos consisten en un oligopéptido corto (de 2 a 25 aminoácidos) que está N-terminalmente acilado con un resto de ácido graso. La parte peptídica de la molécula puede ciclarse entre dos aminoácidos y formar un anillo macrolactámico, o bien entre un aminoácido y un grupo β -hidroxilo de la cadena del ácido graso lateral y formar un anillo macro lactónico. En los depsipéptidos al menos un enlace amida se reemplaza por un enlace éster. La presencia de aminoácidos proteogénicos modificados configurados de forma inusual y de aminoácidos no proteogénicos, así como la presencia de ácidos grasos de diferentes longitudes, diferentes patrones de hidroxilación y grado de saturación confieren una gran diversidad estructural a este grupo de antibióticos. Compuestos que pertenecen a la

familia de los depsipéptidos son las ramoplaninas, las enduracidinas (que se utilizan como aditivo alimentario para el ganado) y la teixobactina.

Los lantibióticos son una gran familia de antibióticos peptídicos policíclicos cuyos precursores se biosintetizan ribosómicamente, y cuyos aminoácidos no usuales, tales como dihidrolanina, β -metil-lantionina y lantionina y residuos de serina deshidratados, presentes en sus estructuras son el resultado de modificaciones postraduccionales. En muchas ocasiones estos precursores sufren una condensación con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula dando lugar a puentes alanina-S-alanina (lantionina) o ácido aminobutírico-S-alanina (β -metil-lantionina) (McAuliffe *et al.*, 2001). Pueden encontrarse en forma lineal de estructura terciaria tipo sacacorchos (tipo A), como por ejemplo la nisina y la gallidermina, o en forma globular (tipo B) como en el caso de la mersacidina (Figura 21). Son producidos principalmente por bacterias Gram-positivas y hasta la fecha se han descrito más de 100 lantibióticos.

La nisina fue el primer lantibiótico conocido, es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y además de presentar actividad frente a un amplio grupo de patógenos Gram-positivos se usa habitualmente como conservante en la industria alimentaria. Se une al lípido II mediante dos de sus anillos aminoterminales de lantionina, produciéndose un reordenamiento estructural de orientación transmembrana estable y posterior formación de poros, consistiendo el complejo de poro final en ocho moléculas de nisina y cuatro de lípido II (Muller *et al.*, 2017).

2.3.2 EL SISTEMA LiaRS

2.3.2.1 Los sistemas de dos componentes en bacterias

La determinación de la secuencia del genoma de numerosas bacterias ha permitido predecir por homología la función de muchos productos génicos bacterianos. Esta información, unida al conocimiento de los diversos procesos biológicos, se utiliza actualmente para elegir las potenciales dianas de interés en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. Uno de estos tipos de dianas son los sistemas de dos componentes.

Para sobrevivir, las bacterias, como todos los seres vivos, deben poder enfrentarse a cambios inesperados en sus condiciones de vida. Las posibilidades de supervivencia dependerán de su capacidad para responder y adaptarse de la forma más rápida y

precisa, y la generación de estas respuestas está ligada a la correcta percepción y transmisión de estímulos. Existen unos circuitos moleculares que detectan y amplifican las señales y que facilitan la generación de respuestas específicas. En el caso de las células eucariotas abundan las cascadas de señalización que implican la fosforilación consecutiva de proteínas normalmente en residuos de treonina, tirosina y serina, que se conocen como cascadas de MAP quinasa. En las bacterias, existe una extensa red de sensores (que detectan los cambios químicos o físicos) y reguladores (que inducen la respuesta a dichos cambios), llamados sistemas de dos componentes que transmiten señales mediante la fosforilación consecutiva de dos proteínas (la sensora y la reguladora) en residuos conservados de histidina y aspartato respectivamente (Barba-Ostria, 2014).

Las proteínas sensoras denominadas histidina quinasa (HK) son normalmente proteínas de membrana homodiméricas. Cada uno de los monómeros está formado por dos regiones: la región amino terminal que es donde se encuentra el dominio sensor, y la región carboxilo terminal que es donde se localiza la actividad quinasa de la proteína (Figura 22).

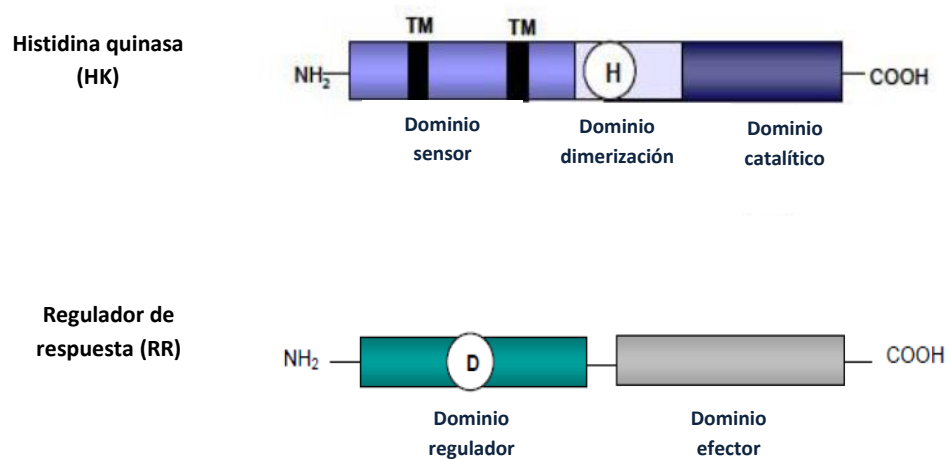


Figura 22. Representación esquemática de una histidina quinasa (HK) y de su regulador de respuesta (RR).

La región amino terminal es variable, lo que muestra la amplia variedad de estímulos ambientales a los que pueden responder las diferentes HKs (Mascher, 2006). El dominio sensor que se encuentra en esta región suele ser extracelular, y su función es el reconocimiento de la señal. La región carboxilo terminal está formada a su vez de

dos dominios: un dominio catalítico que es el responsable de la unión a ATP, y un dominio de dimerización y fosfotransferencia que es donde se sitúa el residuo conservado de histidina necesario para su activación (Gao y Stock, 2009).

En cuanto a los reguladores de respuesta (RR) están formados por dos dominios: un dominio regulador en la región amino terminal, y un dominio efector en la región carboxilo terminal (Figura 22). El dominio regulador está compuesto por una serie de aminoácidos conservados, que incluye el aspartato, imprescindibles para la fosforilación. Y el dominio efector, se encarga de mediar la respuesta adecuada frente al estímulo específico de ese sistema. La mayor parte de estos dominios efectores tienen capacidad para unirse al ADN, aunque algunos también para unirse a ARN o a proteínas (Galperin y Nikolskaya, 2007). La ruta de señalización de dos componentes comienza cuando el dominio sensor de una HK situado en la membrana detecta un estímulo extracelular, y como consecuencia, la HK se fosforila en un residuo conservado de *His* a partir de una molécula de ATP (Figura 23).

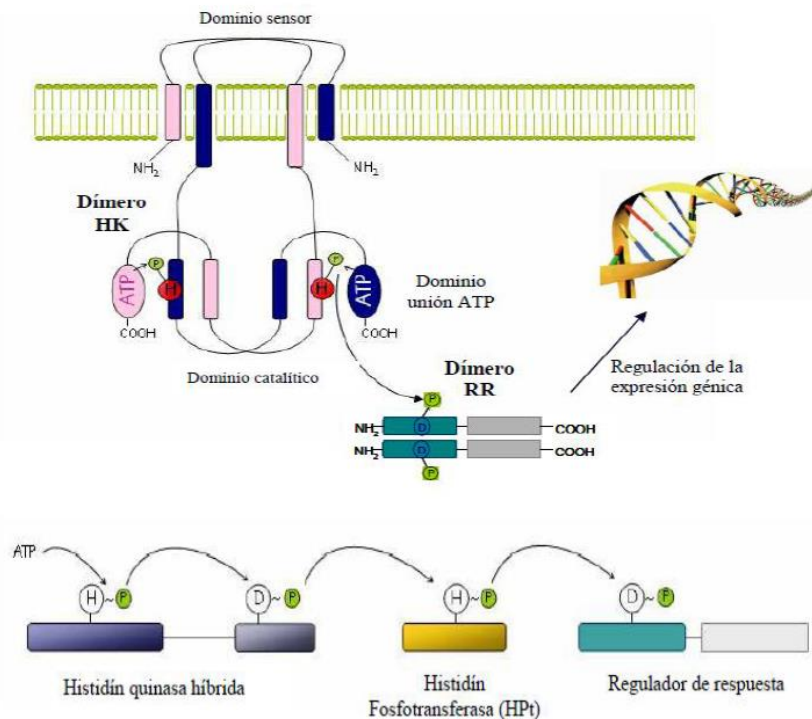


Figura 23. Esquema descriptivo del mecanismo de una ruta de señalización de dos componentes.

En un segundo evento, el grupo fosforil de la *His* fosforilada se transfiere al residuo *Asp* del dominio receptor del RR, esta es la denominada reacción de fosfotransferencia y está catalizada por el propio RR. Este hecho induce un cambio conformacional que hace que el dominio efector del RR sea activo, regulando por lo general la expresión génica. El tiempo de vida de los RR fosforilados varía de segundos a horas, y está relacionado con el tipo de respuesta que producen.

Aunque estas rutas de fosfotransferencia son las más abundantes en procariontes, también existen otras más complejas en las que intervienen más proteínas y se dan múltiples etapas de fosfotransferencia (Zhang y Shi, 2005). En estas rutas las HKs son quinasas híbridas que poseen además del residuo de *His* un residuo de *Asp* (West y Stock, 2001). En los sistemas de dos componentes la especificidad entre la HK y el RR de una determinada pareja es muy elevada, ya que cada HK tan solo transmite la señal vía un RR. Esta especificidad HK-RR se ve reflejada en la localización genómica de las secuencias codificantes para estas proteínas que, aunque se encuentran repartidas por todo el genoma, en la mayoría de los casos las fases de lectura abierta (ORF, del inglés Open Reading Frame) de la HK y del RR que forman pareja, se encuentra en la misma unidad transcripcional u operón.

En los microorganismos patógenos, los sistemas de dos componentes regulan la quimiotaxis, la formación de biopelículas, la resistencia al estrés medioambiental (pH, temperatura, salinidad, osmolaridad, antibióticos, etc.), el estrés biótico (microbios competidores) y por lo tanto son fundamentales para su supervivencia (Beier y Gross, 2006). Por esta razón, compuestos que tengan como diana estos sistemas son una atractiva opción en la búsqueda de nuevos fármacos que frenen la virulencia y persistencia de dichos microorganismos patógenos (Gotoh *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Sistema LiaRS de dos componentes

El sistema de dos componentes LiaRS (Figura 24) se encuentra en la mayoría de bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C y regula múltiples dianas que determinan la virulencia, la tolerancia al estrés y la persistencia de este tipo de bacterias (Mascher *et al.*, 2004). Este sistema ha sido principalmente estudiado en *B. subtilis*, y es uno de los cuatro sistemas de dos componentes de respuesta al estrés de la pared celular en este microorganismo. Su nombre viene del inglés “Lipid II cycle interfering antibiotic response Regulator and Sensor” ya que se ha confirmado que

este sistema responde a diversos antibióticos que interfieren con el lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, tales como bacitracina, vancomicina, ramoplanina, así como a detergentes, solventes orgánicos (etanol, fenol, etc.) (Mascher *et al.*, 2004) y también frente a condiciones menos específicas como choques alcalinos (Hyrylainen *et al.*, 2005).

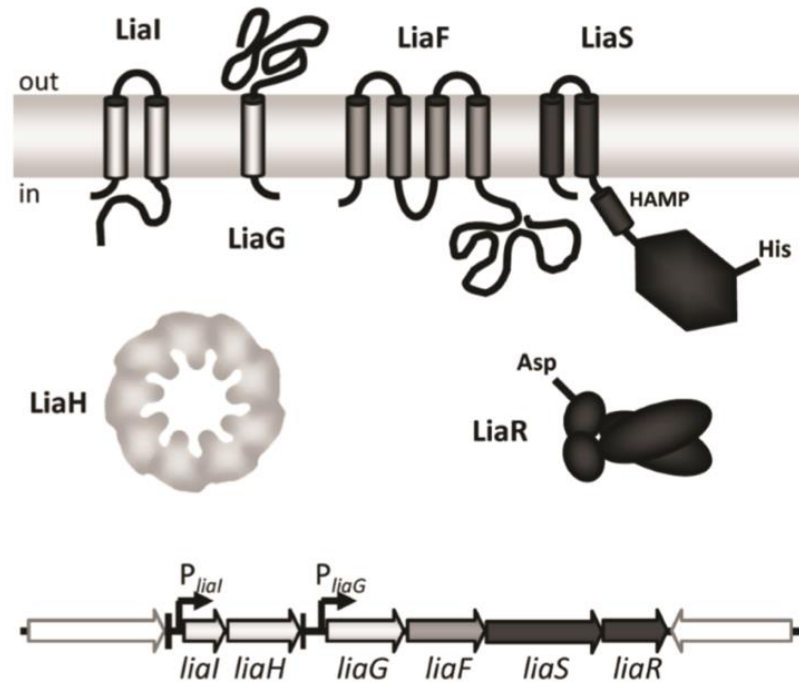


Figura 24. Representación esquemática de los genes y proteínas que constituyen el sistema LiaRS en *B. subtilis* (Schrecke *et al.*, 2013)

El sistema LiaRS está formado por un regulador de respuesta (LiaR), una histidina quinasa sensora (LiaS) y una tercera proteína de membrana que actúa de regulador negativo (LiaF), a la que las dos anteriores están genética y funcionalmente unidas aunque hasta el momento, se desconoce realmente cómo interfiere con ellas (Jordan *et al.*, 2006).

En *B. subtilis* este sistema se codifica como una parte del operón *liaIHGFSR* para el que en diversas investigaciones han demostrado que la delección de varios genes aumenta la sensibilidad a antibióticos que actúan en la pared celular (Mascher *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2006).

En el locus *liaH-liaGFSR*, los últimos genes *liaGFSR* se expresan basalmente y se codifican junto con una proteína anclada a la membrana denominada LiaG, la cual está asegurada por un promotor constitutivo débil corriente arriba de *liaG* (P_{liaG}). Por el contrario, la expresión del operón de *liaH* es estrictamente dependiente de LiaR (Jordan *et al.*, 2006). La activación de LiaR resulta en la inducción del promotor *liaI* (P_{liaI}) que da como resultado no solo una fuerte regulación del operón *liaIH*, sino del locus *lia* completo (Wolf *et al.*, 2010). Aún se desconoce la función exacta de *LiaI* y *LiaH*, pero se sabe que estas dos proteínas están involucradas en los procesos de detección y reparación del daño en la membrana (Kesel *et al.*, 2013).

Del análisis de la regulación y la expresión en detalle del operon *liaIHGFSR* llevado a cabo por John D. Helmann y colaboradores en la Universidad de Cornell (EEUU), se determinó que el promotor P_{liaI} podía usarse para construir fusiones cuantificables con genes reporteros como el *lacZ* o el *lux* (luciferasa). Demostrando que este sistema reportero tenía un gran potencial como herramienta de cribado en la búsqueda de nuevos antibióticos que interfirieran con el transportador lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, esencial para el desarrollo de la pared celular (Mascher *et al.*, 2003; Mascher *et al.*, 2004).

2.4 LAS RAMOPLANINAS

2.4.1 INTRODUCCIÓN

Las ramoplaninas (Figura 25) son una familia de antibióticos de tipo lipoglicodepsipéptido, de síntesis no ribosomal (NRPS), que inhiben con gran potencia la ruta de biosíntesis del peptidoglicano mediante un mecanismo de acción novedoso y diferente al de los glicopéptidos.

Estructuralmente están relacionadas con los lipodepsipéptidos janiemicina, enduracidina y daptomicina, y funcionalmente con la vancomicina y teicoplanina (glicopéptidos) así como con los lantibióticos mersacidina, actagardina, nisina y epidermina (McCafferty *et al.*, 2002). La ramoplanina A2 fue descubierta a partir de una fermentación de *Actinoplanes* ATCC33076 y presenta actividad frente a bacterias Gram-positivas aerobias y anaerobias resistentes a antibióticos como glicopéptidos, macrólidos y penicilinas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus epidermidis*, estreptococos, enterococos resistentes a

vancomicina (ERV), *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, y *Clostridium difficile* (Collins *et al.*, 1993; Montecalvo, 2003; Peláez *et al.*, 2005; Farver *et al.*, 2005).

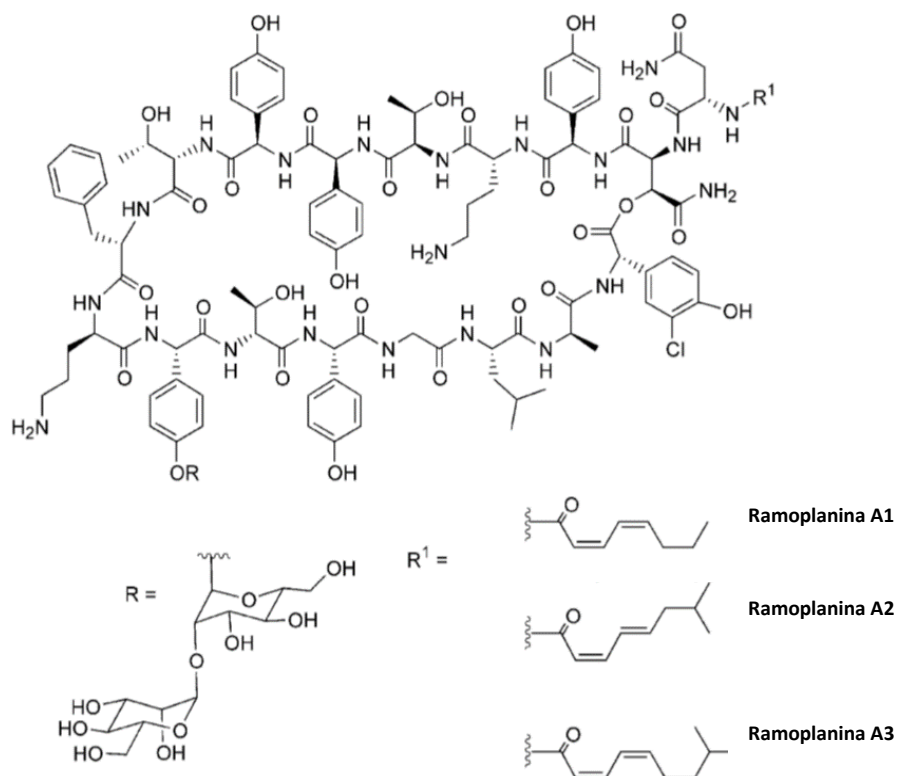


Figura 25. Las ramoplaninas A1, A2 y A3 estructuralmente solo se diferencian en la cadena lipídica que se encuentra en el residuo de Asn¹ N-terminal.

La rápida acción bactericida de la ramoplanina A2, a concentraciones muy cercanas a la CMI (Cheng *et al.*, 2014), en contraste con la vancomicina que es bacteriostática a concentraciones próximas a su CMI, hace que este compuesto sea un prometedor candidato para el tratamiento de infecciones graves causadas por los microorganismos mencionados anteriormente.

Sin embargo, no se absorbe vía oral ni puede administrarse por vía parental dada su inestabilidad en sangre. Como consecuencia de ello, la ramoplanina A2 está siendo clínicamente evaluada para uso tópico, así como para su uso oral en la prevención de infecciones por enterococos y para el tratamiento de diarreas asociadas a *C. difficile*.

2.4.2 DESCUBRIMIENTO

La ramoplanina, originalmente nombrada como A-16686, fue identificada en 1984 durante un cribado de alto rendimiento que buscaba inhibidores de la síntesis del PG, llevado a cabo por un grupo de investigadores del Gruppo LePetit™ (Biosearch™ Italia, Gerenzano, Italia) (Cavalleri *et al.*, 1984). Se obtuvo a partir de la fermentación de la cepa *Actinoplanes* ATCC33076, aislada de una muestra de suelo recogida en la India, como una mezcla de 3 compuestos (A1, A2 y A3) que estructuralmente solo se diferencian en la cadena lipídica que se encuentra en el residuo de Asn¹ N-terminal (Figura 26). Los tres componentes presentan actividades antimicrobianas virtualmente indistinguibles, pero es la ramoplanina A2 la que se produce en mayor cantidad y esta es la razón por la que es el compuesto validado durante los ensayos clínicos (Walker *et al.*, 2005).

2.4.3 ESTRUCTURA

Como se muestra en la Figura 26, la ramoplanina es un lipoglicodepsipéptido, que forma un macrociclo de 49 miembros, que contiene 17 aminoácidos, nueve de los cuales son L-aminoácidos, siete D-aminoácidos y uno es glicina.

Varios de los aminoácidos que forman parte de su estructura son aminoácidos no proteínogénicos, que incluyen hidroxifenilglicina (Hpg), β-hidroxiasparagina (β-OH-Asn, HAsn), D-ornitina (Orn) y clorohidroxifenilglicina (Chp). Por otro lado, el fenol del aminoácido 11 (Hpg¹¹) está unido a un resto disacárido (un grupo α-1,2-dimanosil). El macrociclo está enlazado vía lactona por unión entre el grupo carboxilo del aminoácido 17 (L-Chp¹⁷) y el grupo β-hidroxilo presente en el aminoácido 2 (HAsn²). A su vez este residuo está conectado al aminoácido 1 (Asn¹), que está acilado en su grupo amino con un ácido carboxílico insaturado que según su longitud y estructura diferencia las ramoplaninas A1, A2 y A3 entre sí. La estereoquímica de esta cadena lipídica fue inicialmente asignada como (2Z, 4Z), sin embargo posteriormente esta asignación fue reexaminada y corregida a (2Z, 4E) (Kurz y Guba, 1996; Shin *et al.*, 2004).

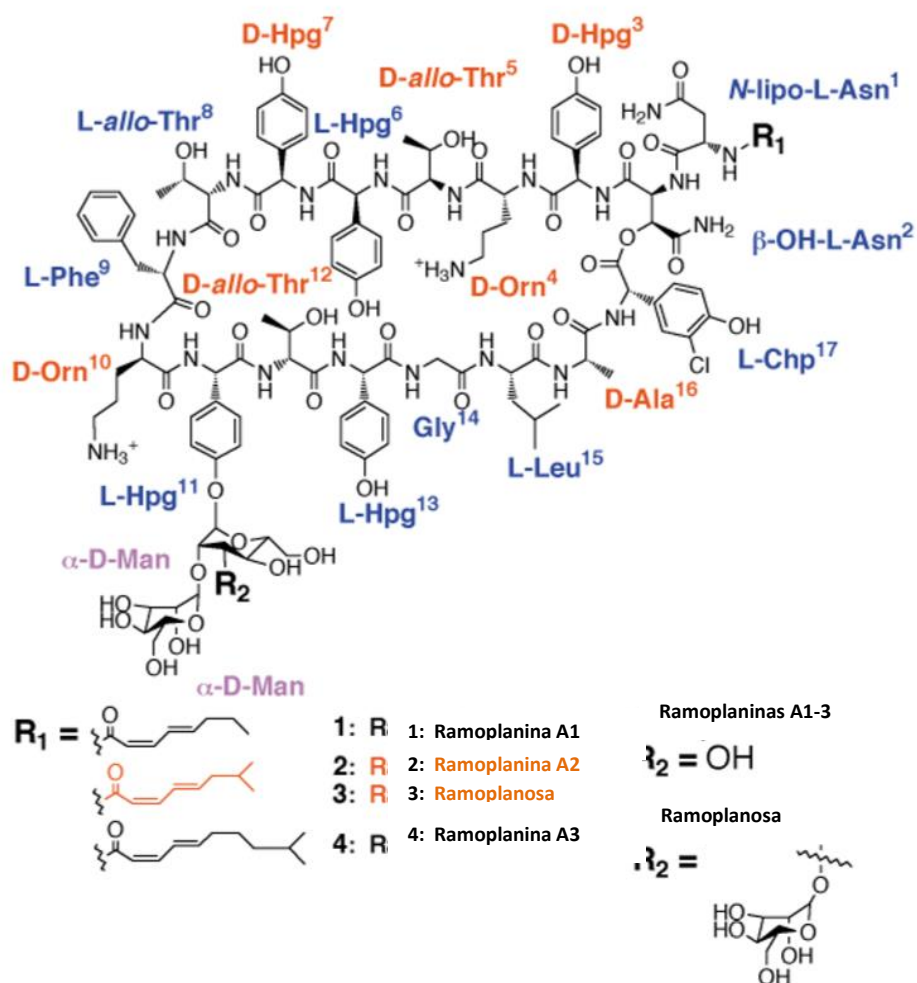


Figura 26. Estructura de las ramoplaninas donde se indican en color naranja los siete D-aminoácidos, en color azul los nueve L-aminoácidos y en color púrpura el grupo D-manosa (McCafferty *et al.*, 2002).

Experimentos de RMN multidimensional en solución acuosa permitieron la elucidación de la estructura tridimensional (3D) de la ramoplanina A2 (Kurz y Guba, 1996). La estructura posee dos láminas antiparalelas unidas por seis puentes de hidrógeno intramoleculares entre los residuos 2 a 7 y 10 a 14, y un giro β formada por Thr8 y Phe9 conectada a uno de los dos extremos de las láminas β , y el otro extremo de las dos láminas está conectado por un bucle formado por los residuos 15 a 17 y la cadena lateral de Asn² (Figura 27). Las cadenas laterales de los 3 residuos hidrofóbicos Hpg³, Phe⁹ y Chp¹⁷ se doblan hacia el medio de las dos láminas y esto da a la molécula una particular forma de “U”. Curiosamente, se demostró que la ramoplanina A2 en metanol está presente como una mezcla de monómero y dímero (Lo *et al.*, 2001).

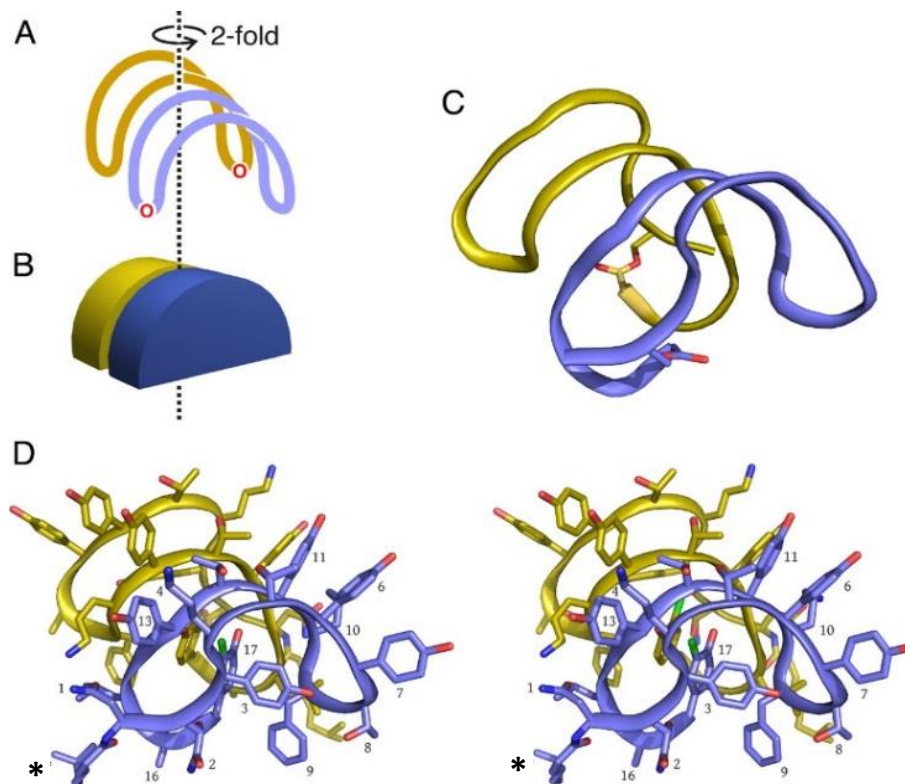


Figura 27. (A) Vista esquemática del dímero de ramoplanina A2. Uno de los monómeros está coloreado en azul y el otro en amarillo. (B) Ilustración de la forma en “U” de los semidiscos que forman cada monómero. (C) Representación del esqueleto peptídico. (D) Vista completa del dímero, con las cadenas laterales numeradas en el monómero de color azul y un asterisco que marca la cadena lipídica (Hamburger *et al.*, 2009).

Posteriormente, en 2009, se reportó por primera vez su estructura de rayos-X (Figura 28) demostrándose que este compuesto existe en el cristal en forma de dímero anfipático con simetría C2.

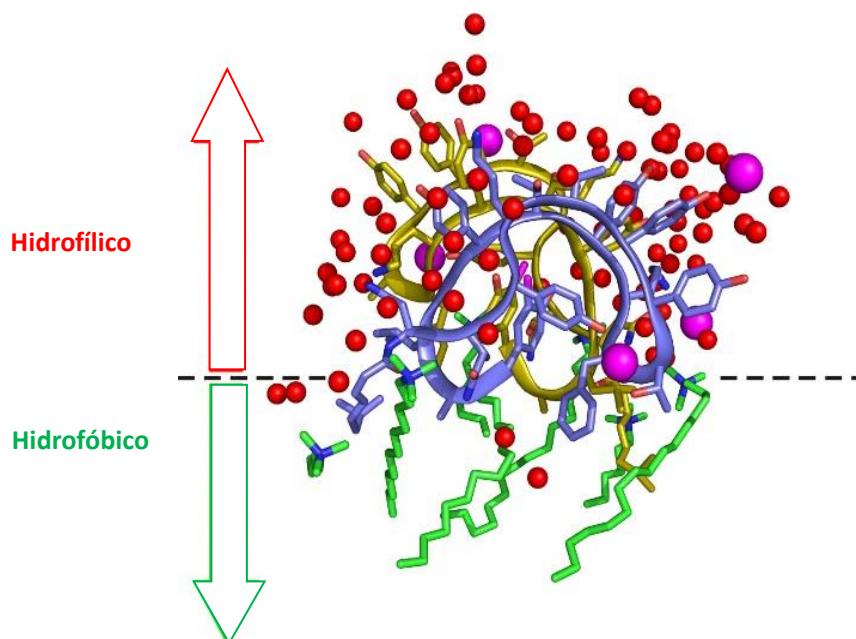


Figura 28. El dímero de ramoplanina es anfipático. Los dímeros están coloreados como en la figura anterior (Figura 27). La distribución de las moléculas de los distintos solventes (agua en rojo, iones cloruro en magenta y las moléculas de detergentes en verde) ilustra que una de las caras del dímero es hidrofílico mientras que la cara opuesta es hidrofóbica. La línea de puntos muestra el límite entre ambas caras (Hamburger *et al.*, 2009).

La orientación de los monómeros permite la interacción de los residuos de los aminoácidos 9 a 15 y la formación de seis enlaces de hidrógeno intermoleculares resultando en una lámina β antiparalela de cuatro hebras. La capacidad de este compuesto para formar dímeros en un disolvente hidrófobo que imita el medio ambiente en la superficie celular bacteriana y en el cristal, apoya firmemente la forma en que este antibiótico interactúa con su diana bacteriana en el Lípido II (Hamburger *et al.*, 2009).

2.4.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las ramoplaninas son activas frente a un amplio número de bacterias Gram-positivas (Tabla 2) incluyendo muchas especies diferentes de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* y *C. difficile* (McCafferty *et al.*, 2002). También lo son frente a cepas resistentes a distintos antibióticos, tales como enterococos resistentes a vancomicina (ERV) (Collins *et al.*, 1993), *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) e incluso frente a cepas de *C. difficile* con sensibilidad reducida frente a vancomicina o

resistencia a metronidazol (Peláez *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2013). Además, ha sido reportado su rápido efecto bactericida frente a biopelículas de *S. aureus* así como a cepas clínicas de *S. aureus* resistentes a vancomicina que contienen el gen *vanA* (Schmidt, 2010).

Organismo	Nº de aislados	Ramoplanina CMI ₉₀ (mg/L)
<i>E. faecium</i>		
sensible a vancomicina	12	0.5
resistente a vancomicina	31	0.5
<i>E. faecalis</i>		
sensible a vancomicina	15	0.5
resistente a vancomicina	12	0.5
<i>Leuconostoc</i> spp.	14	0.125
<i>Lactobacillus</i>	23	0.25
<i>S. aureus</i>		
sensible a oxacilina	140	0.5
resistente a oxacilina	100	0.25
<i>Streptococcus</i> , β-hemolítico	60	0.06
<i>Streptococcus bovis</i>	10	0.12
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20	≤0.03
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0.06
<i>Bacillus</i> spp.	10	0.25
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	10	1
Bacteria Gram-negativas	39	>16
<i>C. difficile</i>	18	0.25
<i>Actinomyces</i> spp.	22	0.25
<i>Bifidobacterium</i> spp.	13	0.06
<i>Clostridium bifermentans</i> - grupo <i>sordellii</i>	10	0.125
<i>Clostridium cadaveris</i>	10	0.125
<i>Clostridium clostridioforme</i>	10	16
<i>Clostridium innocuum</i>	19	0.125
<i>Clostridium paraputrificum</i> - grupo <i>tertium</i>	10	0.125
<i>Clostridium perfringens</i>	11	0.06
<i>Clostridium ramosum</i>	15	0.06
<i>Eubacterium lentum</i>	17	0.25
<i>Eubacterium</i> spp.	31	0.125
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	10	0.25
<i>Peptostreptococcus magnus</i> - grupo <i>micros</i>	14	0.125
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	13	0.125
<i>Propionibacterium</i> spp.	15	0.25
<i>Bacteroides fragilis</i>	17	>256
<i>Fusobacterium</i> - <i>Veillonella</i> spp.	15	>256
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	10	4
<i>Prevotella</i> spp.	12	128

Tabla 2. Actividad *in vitro* de la ramoplanina original (A2) frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Montecalvo, 2003).

Las ramoplaninas no muestran ninguna actividad frente a bacterias Gram-negativas (al igual que la vancomicina), previsiblemente porque son incapaces de penetrar la membrana externa (Walker *et al.*, 2005).

En general, este antibiótico presenta unas CMIs por debajo de 1 µg/mL frente a la mayoría de los patógenos citados anteriormente, aunque estos valores pueden variar

en base al método utilizado para su determinación. Dos estudios independientes (Barry *et al.*, 1993; Kenny y Brackman, 1994), reportaron que la adición de albúmina de suero bovino, BSA (del inglés Bovine Serum Albumin), a una solución stock de antibiótico o a una placa multipocillos que contiene la bacteria frente a la que queremos medir su actividad, daba lugar a CMI's con valores 30 veces más bajos (es decir más activos) que sin BSA. Esto es consistente con el hecho de que la ramoplanina tiende a adherirse a las superficies no polares, como el plástico del que están fabricadas las placas de multipocillos que normalmente se usan para estas pruebas de susceptibilidad. De este modo, podemos afirmar que el BSA reduce la unión inespecífica al plástico y aumenta la cantidad de compuesto en la solución de ensayo.

Se han hecho numerosos estudios *in vitro* comparando la ramoplanina con la vancomicina y sistemáticamente se ha demostrado que el primero es un antibiótico más potente que el segundo, independientemente de la técnica usada para la determinación de la actividad (Jones y Barry, 1989; Biavasco *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1993; Rolston *et al.*, 1996; Finegold *et al.*, 2004). La rápida acción bactericida de la ramoplanina A2, a concentraciones muy cercanas a la CMI (Johnson *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 2014), en contraste con la vancomicina que es bacteriostática a concentraciones próximas a su CMI, hace que este compuesto sea un prometedor candidato para el tratamiento de infecciones graves causadas por microorganismos Gram-positivos.

También se han llevado a cabo varias investigaciones comparando la actividad de las ramoplaninas con otros antibióticos tales como la teicoplanina, linezolid y quinupristina/dalfopristina (Tabla 3).

Bacteria	Concentración Mínima Inhibitoria de 90% (µg/mL)				
	Ramoplanina	Vancomicina	Teicoplanina	Linezolid	Quinupristina/Dalfopristina
<i>Actinomyces</i> spp.	0.25	NA	0.5	0.5	NA
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0.06	NA	0.5	NA	NA
<i>Clostridium bifermentans-sordellii</i>	0.125	NA	0.125	NA	NA
<i>Clostridium cadaveris</i>	0.125	2	0.25	4	NA
<i>Clostridium clostridioforme</i>	16	NA	8	4	NA
<i>Clostridium difficile</i>	0.25	2	0.5	16	4
<i>Clostridium innocuum</i>	0.125	16	NA	4	NA
<i>Clostridium paraputrificum-tercium</i>	0.125	2	0.25	4	NA
<i>Clostridium perfringens</i>	0.06	0.5	0.125	2	NA
<i>Clostridium ramosum</i>	0.06	8	NA	8	NA
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	NA	0.06	0.06	NA	NA
<i>Enterococcus faecalis</i>					
resistente a vancomicina	0.5	512	NA	4	6-8
sensible a vancomicina	0.5	1-2	0.5	2-4	6-8
<i>Enterococcus faecium</i>					
resistente a vancomicina	0.5	>512	128	4	NA
sensible a vancomicina	0.5	2	NA	2	NA
<i>Eubacterium</i> spp.	0.125	2	0.125	8	NA
<i>Eubacterium lentum</i>	0.25	2	0.5	2	NA
<i>Lactobacillus</i> spp.	0.25	>32	>64	8	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.06	0.5	0.25	NA	NA
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	0.25	0.25	0.25	NA	NA
<i>Peptostreptococcus grupo magnus-micros</i>	0.125	NA	0.25	2	NA
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0.125	NA	0.25	2	NA
<i>Propionibacterium</i> spp.	0.25	0.5	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>					
resistente a metilina	0.25	2	NA	4	0.5-1
sensible a metilina	0.5	NA	NA	1-4	0.5-1
<i>Staphylococcus epidermis</i>					
resistente a metilina	0.25	2	8	2	0.5
sensible a metilina	0.12	2	2	0.5-2	0.25-0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>					
resistente a penicilina	0.12	0.25-0.5	0.12	2	0.5
sensible a penicilina	≤0.03	0.25-0.5	0.12	2	0.5

NA: Datos no disponibles

Tabla 3. Actividad *in vitro* de la ramoplanina original (A2), vancomicina, teicoplanina, linezolid y quinupristina/dalfopristina frente a diferentes bacterias Gram-positivas (Farver *et al.*, 2005).

Se ha determinado que la ramoplanina presenta iguales o mejores actividades que la teicoplanina y la vancomicina frente a *Streptococcus* spp. y *S. aureus*, mientras que frente a *Enterococcus* spp. la ramoplanina muestra ligeramente menor o igual actividad que la teicoplanina y mejor que la vancomicina (O'Hare *et al.*, 1988; O'Hare *et al.*, 1990; Shonekan *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993; Lawrence *et al.*, 1993).

Recientemente, también se ha reportado la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de la ramoplanina frente a esporas de *C. difficile* (Jabes *et al.*, 2014; Kraus *et al.*, 2015).

2.4.5 RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (REA)

Debido a la intrínseca complejidad estructural de la ramoplanina y a su gran potencial como nuevo agente antimicrobiano, se han realizado estudios centrados en la elucidación del mínimo farmacóforo bioactivo de este antibiótico para después

intentar generar nuevos derivados sintéticos. Estos estudios han dado lugar a interesantes hallazgos claves para entender la relación entre la estructura y la actividad de las ramoplaninas.

Modificaciones semisintéticas de la molécula indicaron que la cadena lipídica es imprescindible para su actividad: mientras que los análogos totalmente desprovistos de la cadena acilo mantienen una afinidad por el lípido II similar a la ramoplanina, sus actividades antibacterianas disminuyen al menos 10 veces (Fang *et al.*, 2009), sugiriendo que la cadena lipídica juega un papel muy importante en el aumento de la potencia de la ramoplanina dirigiéndolo a la membrana bacteriana. A su vez, la cadena lipídica también parece ser la responsable de la actividad hemolítica de la ramoplanina, su reemplazo con una variedad de ácidos carboxílicos dio lugar a diferentes análogos con perfiles de tolerabilidad mejorados y con actividad antibacteriana equivalente al compuesto original (Ciabatti *et al.*, 2007). Experimentos realizados por McCafferty y colaboradores establecieron que la glicosilación de la ramoplanina A2 tenía una contribución muy pequeña en su unión con los compuestos intermediarios de la biosíntesis del peptidoglicano (Cudic *et al.*, 2002). Este mismo grupo de científicos también prepararon análogos con los residuos de Orn modificados por guanidilación, aminación reductora y acetilación. Sus resultados probaron que el aumento de las constantes de disociación de los derivados que se unen a los compuestos intermediarios de la biosíntesis del PG era paralelo al incremento de los valores de CMI (Cudic *et al.*, 2002). También en este mismo trabajo se hizo hincapié sobre la importancia de la carga de la molécula de ramoplanina A2 para la conservación de su actividad antimicrobiana. Se indicó que los grupos cargados sujetan o anclan a los ligandos del peptidoglicano en la orientación apropiada para la unión electrostática o de enlaces de hidrógeno. A su vez, modificaciones por alanización de la molécula, mostraron los mismos requerimientos para el residuo Orn¹⁰ y la conservación de la actividad (Fang *et al.*, 2009).

Otro elemento crítico en la actividad antimicrobiana de la ramoplanina es el macrociclo. La ramoplanina A2 linealizada es menos soluble y del orden de 2000 veces menos activa que la molécula original. Además, esta forma linealizada no se une a los intermediarios de la síntesis del PG ni a análogos de estos, lo que implica que esa unión requiere de una conformación tridimensional muy específica (Cudic *et al.*, 2002).

Igualmente, experimentos de síntesis total realizados por Boger y colaboradores demostraron el requerimiento específico del macrociclo de 49 miembros (Nam et al. 2007). Este grupo de investigadores además describió la síntesis total de análogos de la ramoplanina A2 en los que el lábil enlace lactona fue sustituido por uno amida más estable. Asimismo, determinaron que la presencia de los residuos Orn¹⁰, Hpg³, Hpg⁷ y Orn⁴ (nombrados de mayor a menor importancia) es necesaria para la actividad (Nam et al., 2007).

Recientemente se ha demostrado también que la supresión del disacárido α -1,2-dimanosil y de la cloración en el Chp¹⁷ no tienen ningún efecto sobre la bioactividad frente a SARM ni EVR, lo que sugiere que ninguno de estos dos componentes de la ramoplanina A2 sean esenciales para su actividad antimicrobiana (Han et al., 2016).

2.4.6 MECANISMO DE ACCIÓN

La determinación del modo de acción de la ramoplanina ha sido algo controvertido. Las primeras investigaciones sobre el mismo propusieron que este antibiótico bloquea la biosíntesis de la pared celular en la etapa catalizada por la enzima MurG, una glicosiltransferasa asociada a la membrana. Esto implica la unión de la ramoplanina A2 al sustrato de dicha enzima, el lípido I, y como consecuencia se inhibe la síntesis del lípido II, intermediario fundamental en la construcción peptidoglicano (Somner y Reynolds, 1990; Reynolds y Somner 1990).

No obstante, posteriormente, se propuso que la ramoplanina A2, al igual que algunos lantibióticos, interactúa directamente con el lípido II (Brotz et al., 1998). Este mecanismo de acción alternativo, fue confirmado por estudios realizados por Walker y colaboradores (Walker et al., 2005), que corroboraron que la ramoplanina A2 muestra mayor afinidad por el lípido II que por el lípido I, siempre y cuando este contenga un pirofosfato. La observación que hicieron de que incluso el farnesilpirofosfato estaba unido por la ramoplanina A2 recalca el papel central de la pirofosfatasa en la interfaz de unión (Breukink y de Kruijff, 2006). Los experimentos de cinética de inhibición que se realizaron, demostraron que la ramoplanina A2 se une al lípido II en una relación de 2:1, a concentraciones consistentes con los valores de CMI reportados (Fang et al., 2006), y que además lo hace en la forma de dímero (Hu et al., 2003b).

Este mismo grupo de investigadores determinó que la ramoplanina A2 también interactúa directamente con la enzima MurG y no con el lípido I (Helm *et al.*, 2002). Además se concluyó que, dado que tanto el lípido I como la enzima MurG son intracelulares y no están accesibles para la ramoplanina A2 (Lo *et al.*, 2000), y considerando que este antibiótico tiene mayor afinidad por el lípido II, no está claro que la inhibición de dicha enzima MurG por parte de la ramoplanina tenga relevancia fisiológica (Bionda *et al.*, 2013). De este modo, se ha consensuado finalmente que la diana principal de la ramoplanina es el lípido II. Un estudio reciente ha confirmado de nuevo que la estereoquímica del complejo formado es de 2:1 y también ha demostrado que la ramoplanina puede además unirse a precursores del ácido teicoico de la pared (Lee *et al.*, 2016).

2.4.7 BIOSÍNTESIS

El análisis de la secuencia del *cluster* de genes biosintéticos (88.5 kb) del microorganismo productor de las ramoplaninas, *Actinoplanes* ATCC33076, reveló características inusuales en la arquitectura del ácido graso y de los genes biosintéticos de las sintetetas de péptidos no-ribosomales (NRPSs). El *cluster* biosintético de las ramoplaninas contiene 33 fases de lectura abierta (ORFs) cada uno de los cuales codifica numerosas funciones (Figura 29) (McCafferty *et al.*, 2002; Hoertz *et al.*, 2012).

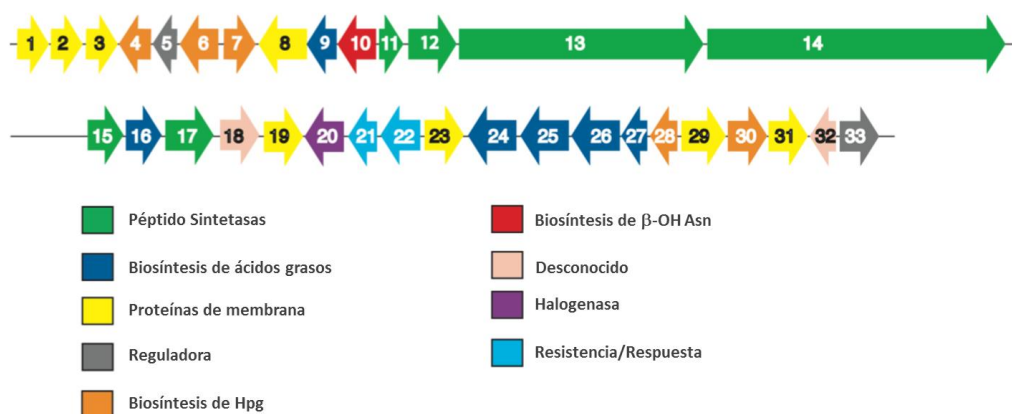


Figura 29. *Cluster* biosintético de la ramoplanina. Las enzimas están coloreadas según su función (McCafferty *et al.*, 2002). Cabe destacar las enzimas coloreadas en verde responsables del esqueleto peptídico, y las coloreadas en azul oscuro responsables de la producción de la cadena del ácido graso n-acetilado.

La primera característica inusual de este *cluster* surgió al analizar las NRPS sintetetasas Ramo 12, 13, 14 y 17. Las NRPS sintetetasas tienen en común módulos que se repiten y que definen dominios que catalizan reacciones específicas de la síntesis de péptidos. El orden en el que se encuentra dichos dominios entre las enzimas determina la secuencia y la estructura de los péptidos producidos. Por cada aminoácido en la secuencia del péptido, las NRPS contienen un único módulo de triple función: condensación (C), adenilación (A) y tiolación (T). Los sitios activos de estos tres dominios A, T y C, están muy bien organizados de manera que un aminoácido específico es reconocido e incorporado a la secuencia del péptido.

En conjunto, hay 16 dominios A individuales que codifican por los 16 aminoácidos de los 17 que tiene la ramoplanina. Sin embargo, la Ramo 12 contiene un único dominio A, que se cree que es específico para asparagina con lo cual se piensa que cataliza la incorporación de Asn¹ y β -OH-Asn² en la cadena peptídica (Hoertz *et al.*, 2012). Un segundo aspecto interesante de este *cluster* biosintético es el Módulo 8 localizado en la Ramo 13 que posee dominios T y C, pero no A y se ha postulado que activa el *allo*-Thr⁸. Por último, un tercer hecho especial de este *cluster* se basa en que las enzimas NRPS normalmente contienen un dominio A en el sitio de inicio. No obstante, la Ramo 12 contiene un dominio C en su extremo N-terminal anterior al módulo que codifica por la activación e incorporación del Asn¹. Todos estos hechos sugieren que la iniciación de la síntesis del péptido se forma por condensación de un ácido graso en lugar de la de un aminoácido (Figura 30) (Hoertz *et al.*, 2012).

Todavía queda bastante por resolver al respecto de la biosíntesis de la ramoplanina, pero los esfuerzos dirigidos a desvelar las incógnitas de este proceso incrementarán la probabilidad de poder obtener nuevos análogos mediante ingeniería microbiana con mejores propiedades farmacológicas y fisicoquímicas.

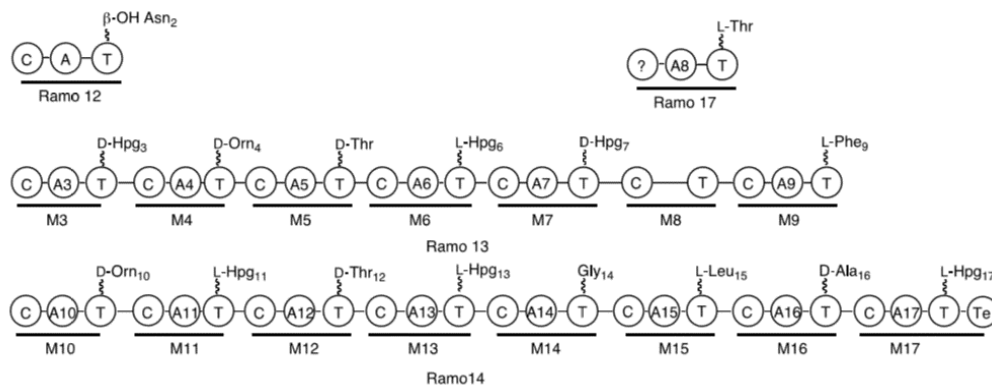


Figura 30. Organización y especificidad de los aminoácidos de la condensación, adenilación y tiolación de las cuatro enzimas péptido sintetetas no ribosomales del *cluster* biosintético de la ramoplanina (Hoertz *et al.*, 2012).

2.4.8 ENSAYOS CLÍNICOS

La ramoplanina por sus buenas propiedades frente a bacterias multirresistentes Gram-positivas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, y su rápida actividad bactericida es un prometedor candidato a fármaco para el tratamiento de infecciones graves producidas por dichos patógenos. Sin embargo, su uso se ha visto obstaculizado por la actividad hemolítica que presenta cuando se administra por vía intravenosa. Como consecuencia de esta limitación, la ramoplanina ha estado bajo investigación clínica para aplicaciones tópicas, incluyendo un antibiótico oral, no absorbible para la prevención de infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y para el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (Jabes *et al.*, 2014).

Con la ramoplanina A2 se han desarrollado 12 estudios de Fase I, dos estudios de Fase II (uno para *C. difficile* y otro para ERV), así como un estudio en Fase III (para infecciones por *C. difficile*: ICD) que aún no está completado.

Tanto en modelos *in vitro* como en animales se ha demostrado la alta eficacia de la ramoplanina frente a las ICD, así como su capacidad para matar células vegetativas y unirse a las esporas de *C. difficile* demostrando su superioridad sobre la vancomicina (Freeman *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2015). Posteriormente en un estudio en Fase II en el que se administró de manera aleatoria a pacientes con ICD ramoplanina o vancomicina, los resultados obtenidos para ambos tratamientos fueron similares, y los datos sugirieron una incidencia similar en los casos de efectos secundarios adversos como vómitos, náuseas y diarreas. De modo que un estudio de no inferioridad de Fase

III fue aprobado por la FDA para dilucidar el papel de la ramoplanina en el tratamiento de las ICD (Basseres *et al.*, 2017).

Además, en la página web de la compañía NanoTherapeutics Inc. (NanoTherapeutics Inc.; <http://www.nanotherapeutics.com>) visitada en marzo de 2017, se explica que se está llevando a cabo una nueva Fase IIb que investiga las propiedades antiesporas de la ramoplanina para desarrollar una profilaxis dirigida a pacientes que recientemente hayan sido tratados por una infección por *C. difficile* y que presenten alto riesgo de recaída ya que tras el tratamiento se observan aproximadamente un 20%-30 % de recaídas, con tasas elevadas en grupos de mayor edad, que en buena parte se piensa son debidas a las esporas residuales en el intestino de los pacientes clínicamente curados (Chilton *et al.*, 2017).

Cabe destacar que a partir de octubre de 2017 la empresa NanoTherapeutics pasó a llamarse Ology Bioservices, Inc. Se ha visitado la web de esta nueva compañía en septiembre de 2018 ninguna información relativa a la ramoplanina puede encontrarse al respecto. En una búsqueda bibliográfica más reciente, se ha podido encontrar un informe de la Organización Mundial de la Salud donde la ramoplanina aparece clasificada como uno de los antibióticos cuyo desarrollo ha sido cesado porque ya no está incluida en las líneas de investigación y desarrollo en el sitio web de la compañía (Geneva: World Health Organization; WHO/EMP/IAU/2018.06 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 ANTECEDENTES

Se considera un verdadero desafío encontrar nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones por patógenos Gram-positivos multirresistentes debido a las reducidas opciones terapéuticas y al rápido ritmo de aparición de nuevas resistencias. La ramoplanina presenta una excelente actividad frente a bacterias Gram-positivas incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y *Clostridium difficile* con resistencia intermedia a vancomicina, y además inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose al transportador lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano de manera diferente a la vancomicina con lo que no muestra resistencia cruzada con ella. Sin embargo, aunque por sus características es un antibiótico muy prometedor, presenta baja tolerabilidad local cuando se inyecta por vía intravenosa. Como consecuencia de esta limitación, el descubrimiento de nuevos análogos de ramoplanina se hace interesante y, dado que la síntesis química total de dicho antibiótico es compleja, se pretende aprovechar el potencial de los microorganismos de la colección de la Fundación MEDINA para obtener nuevas moléculas similares a la ramoplanina pero con propiedades mejoradas.

3.1.2 OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal del presente trabajo consiste en el descubrimiento de compuestos relacionados en actividad biológica o estructura química con las ramoplaninas, una familia de glicodepsipéptidos con actividad antibiótica, aislados por primera vez de cultivos de la cepa ATCC 33076 de *Actinoplanes*. Dicho trabajo se realizará a partir de un cribado de alto rendimiento de una colección de extractos de productos naturales de origen microbiano.

3.1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Realizar un ensayo de cribado de alto rendimiento con un grupo de extractos de la colección de productos naturales de origen microbiano de la Fundación MEDINA, cuya diana específica sea el ciclo del transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano, diana de ramoplanina.
- 2 Seleccionar y caracterizar de manera preliminar los extractos que presenten una respuesta biológica positiva a este ensayo de cribado.

- 3 Determinación de la diversidad y la posición taxonómica de las cepas seleccionadas con actividad biológica mediante secuenciación del gen ribosomal 16S ADNr.
- 4 Establecimiento de la diversidad genotípica de las cepas seleccionadas con actividad biológica mediante diversas técnicas de *fingerprinting*: BOX-PCR y REP-PCR.
- 5 Analizar la presencia y la distribución de los sistemas de rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios: PKS-I, PKS-II y NRPS de las cepas seleccionadas con actividad biológica, y relacionarlo con el perfil químico de los extractos con actividad.
- 6 Realizar nuevas fermentaciones y extracciones a pequeña escala de las cepas seleccionadas, con el fin de confirmar la actividad biológica detectada en el proceso de cribado de alto rendimiento.
- 7 Evaluar la actividad antimicrobiana de los nuevos extractos obtenidos de las nuevas fermentaciones, frente a un panel secundario de bacterias (incluyendo cepas resistentes), hongos y levaduras, así como su actividad citotóxica.
- 8 Estudiar el perfil químico de los extractos mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS según sus siglas en inglés) para confirmar/descartar la presencia de compuestos relacionados con la ramoplanina.
- 9 Realizar nuevas fermentaciones y extracciones a media escala de las cepas con mayor interés, con el fin de identificar químicamente los compuestos detectados como activos mediante fraccionamiento semipreparativo bio/químico-guiado
- 10 Realizar fermentaciones a gran escala de las cepas productoras de posibles nuevas ramoplaninas.
- 11 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de posibles nuevas ramoplaninas.
- 12 Caracterización de la actividad antimicrobiana, estudio del perfil metabólico, y citotoxicidad de las nuevas ramoplaninas identificadas en comparación con el compuesto conocido ramoplanina A2.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 COLECCIÓN DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES

4.1.1 COLECCIÓN DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES

La Fundación MEDINA posee una de las mayores Colecciones de Cultivos del mundo formada por más de 190.000 cepas procedentes de hongos, actinomicetos y otras bacterias (Figura 31). Además, cuenta con varias Librerías de Productos Naturales que incluyen más de 200.000 extractos y fracciones semi-purificadas, que representan un amplio espacio químico y derivan de una gran diversidad de fuentes microbianas obtenidas de muestras de un extenso rango de orígenes geográficos.

Las cepas de bacterias y hongos correspondientes al grupo de extractos de la colección de la Fundación MEDINA que formaron parte del proceso de cribado se crecieron en 3 medios líquidos complejos que contenían diferentes cantidades de fuentes de nutrientes: fuentes de carbono (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos), fuentes de carbono complejas (por ejemplo, harina de trigo, almidón soluble), fuentes de nitrógeno y fuentes de sales minerales (Tormo *et al.*, 2003).



Figura 31. Actualmente la Colección de Cultivos de la Fundación MEDINA es una de las mayores y más diversas del mundo.

Los metabolitos secundarios de los caldos de cultivo fueron extraídos con acetona (1:1) y agitados durante una hora. Posteriormente se centrifugaron a 1500 x g durante 15 minutos. Seguidamente se añadieron 1,5 mL de DMSO a diferentes alícuotas de 15 mL y la mezcla resultante se evaporó en un equipo Turbovap hasta que quedó la mitad del volumen, aproximadamente 7,5 mL, donde los productos naturales se encontraban a una concentración equivalente a la presente durante la fermentación (1x equivalentes de fermentación) y 20% de DMSO. Los extractos de la colección estaban distribuidos

en placas robóticas de 96 pocillos (Referencia ThermoFisher™ ABgene-0765) conteniendo 80 extractos/placa, almacenados a -20°C hasta su utilización.

Dado que la colección está en continuo crecimiento, este grupo de extractos provino de los microorganismos aislados de muestras de suelo recibidas durante el periodo que duró el programa de cribado, sin preseleccionarse en función de ningún otro criterio.

4.2 BIOENSAYOS

4.2.1 ENSAYO DE CRIBADO LiaRS EN AGAR

La finalidad del ensayo de cribado LiaRS era detectar entre los extractos de productos naturales de origen microbiano de la colección de la Fundación MEDINA aquellos en los que hubiera compuestos que interfirieran específicamente con el ciclo del transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano.

El nombre del ensayo procede del sistema de dos componentes LiaRS (del inglés “Lipid II cycle Interfering Antibiotic Sensor and response Regulator”) que es un sistema de dos componentes que coordina la respuesta genética a la acción de antibióticos que interfieren con el lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, tales como la bacitracina, vancomicina y ramoplanina (Mascher *et al.*, 2004), y en el que la proteína reguladora de la respuesta es LiaR, mientras que LiaS es la histidina quinasa sensora. Este sistema se codifica como una parte del operón *lialH-liaGFSR*, y la activación de LiaR resulta en la inducción del promotor *lial* (*P lial*) que da como resultado no solo una fuerte regulación del operón *lialH*, sino del locus *lia* completo. Además, la expresión del operón *lialH* es estrictamente dependiente de LiaR (Jordan *et al.*, 2006).

El ensayo LiaRS, se realizó frente a dos cepas de *Bacillus subtilis* (HB0950 y HB0953) que tienen el gen *lacZ* unido al promotor *lial* (*P lial*), de manera que la inducción específica de dicho promotor da como resultado la producción de β -galactosidasa. Adicionalmente, una de las cepas (HB0953) es un mutante *knock-out* del gen *liaR*, debido a una inserción de resistencia con kanamicina, con lo que dicho gen queda inactivado (Figura 32).

Ambas cepas, se crecieron hasta fase logarítmica en Luria-Bertani (LB) (1% NaCl) a una temperatura de 37°C y a 220 rpm. Después se ajustó el cultivo a una densidad óptica de 0,25 a 600 nm. Se inoculó con 1 mL de bacterias 100 mL de medio LB-agar (1% NaCl)

que contenían 250 µg/mL of X-gal, y se dispensó esta mezcla en placas NUNC™ (245 x 245 mm). Una vez solidificado el agar, las placas se secaron en una campana de flujo laminar durante 15 minutos. Pasado este tiempo se distribuyeron, mediante el uso de una estación de pipeteo robotizada (TECAN™ Genesis®) 20 µL de cada extracto sobre la superficie del agar y se incubaron las placas a 37°C durante 18 horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición en unidades milimétricas (mediante un Analizador de imágenes de desarrollo propio) y la hidrólisis del X-gal (mediante la observación de precipitado de color azul). Como controles positivo y negativo del ensayo se utilizaron bacitracina (50 mg/mL) y vancomicina (0,5 mg/mL), respectivamente.

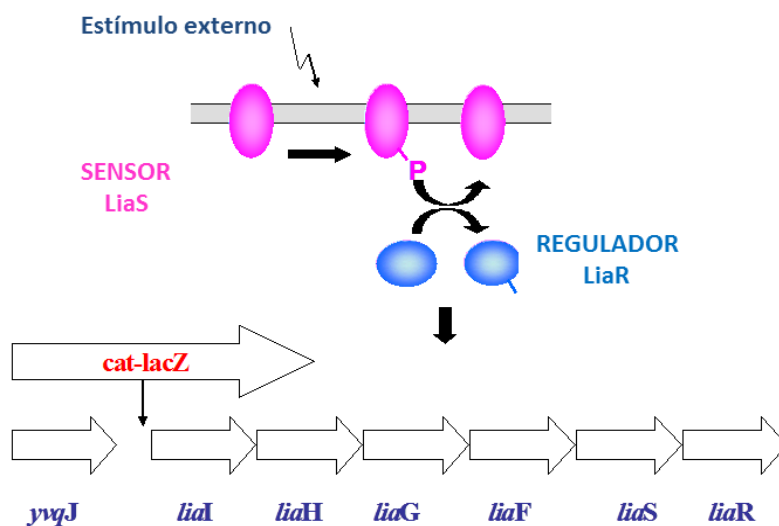


Figura 32. La activación de LiaR da lugar a la inducción del promotor *liaI* (P *liaI*) resultando no solo en la regulación del operón *liaI*H, sino del locus *lia* completo. Por la fusión del gen *lacZ* a dicho promotor su inducción específica da como resultado la producción de β-galactosidasa.

4.2.1.1 Esquema general del proceso de cribado de alto rendimiento

El programa de cribado de extractos de productos naturales de origen microbiano para detectar compuestos que interfirieran específicamente con el ciclo del transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano constó de varias etapas (Figura 33).

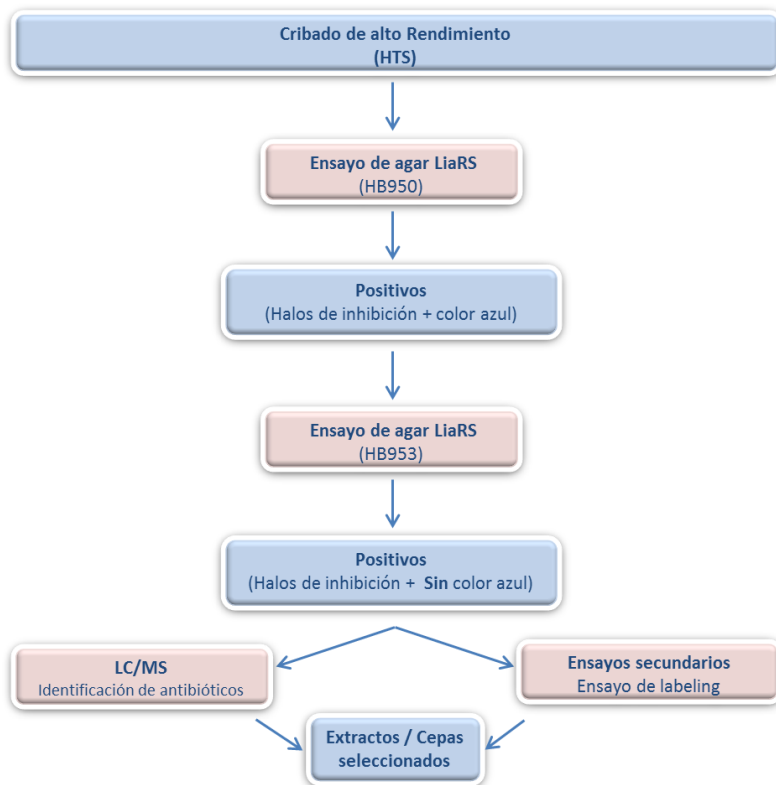


Figura 33. Esquema general de la estrategia del proceso de cribado de alto rendimiento.

Tras el ensayo inicial de los extractos frente a la cepa de *B. subtilis* HB0950 se seleccionaron aquellos que inhibían el crecimiento de este microorganismo y que además presentaron anillo de color azul (hidrólisis de X-gal por la presencia de β -galactosidasa) ya que esto indicaba que eran inductores del promotor *lial* (*P_{lial}*). A continuación, estos extractos se ensayaron frente a la cepa de *B. subtilis* HB0953, descartándose aquellos que también presentaban anillo de color azul, ya que esto indicaba que eran falsos inductores del operón. Todas las muestras que cumplieron ambos criterios de actividad fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS) al mismo tiempo que se confirmaba el modo de acción mediante el ensayo secundario de marcaje de macromoléculas (*labeling*).

4.2.2 ENSAYO DE MARCAJE DE MACROMOLÉCULAS

El ensayo de marcaje de macromoléculas (Onishi *et al.*, 1996) se utilizó como ensayo secundario para confirmar la inhibición específica de la biosíntesis del peptidoglicano por parte de los extractos que presentaron actividad positiva en el ensayo de cribado de alto rendimiento. Con este ensayo se midió la incorporación relativa de los

precursores marcados radiactivamente que son acumulados por las células bacterianas e incorporados en macromoléculas específicas. Como los precursores libres son solubles en ácido tricloroacético (TCA), y las macromoléculas producidas por las células no lo son, las macromoléculas radiomarcadas pueden precipitarse selectivamente y separarse de los precursores libres no incorporados mediante filtración y luego cuantificarse por conteo de centelleo. En nuestro caso, la reacción de marcaje se llevó a cabo mezclando 0,05 mL de un cultivo en fase logarítmica de la cepa de *Bacillus subtilis* HB0950 crecido en un medio de nutrientes que contenía 1% NaCl con 0,025 mL del medio de nutrientes doble concentrado (2% NaCl) que a su vez estaba compuesto por 7,5 mCi/L de ácido aspártico-L-[2,3-³H], 5 mCi/L de timidina-[2-¹⁴C], 100 mg/L de cloranfenicol, 0,8 mg/L de rifampicina y 0,025 mL de inhibidor. Las muestras fueron incubadas a una temperatura de 37°C en un agitador de placas de micropocillos durante 30 minutos. Tras ese tiempo se añadió 0,025 mL de TCA al 25%, para parar la incorporación del radioactivo. El material de TCA-insoluble se recogió en un microfiltro de fibra de vidrio con un Skatron Cell Harvester®. Dicho microfiltro se lavó con agua destilada y se secó bajo una fuente de calor seco. La radioactividad se midió en un contador Betaplate® de centelleo.

4.2.3 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

Para conocer el perfil antimicrobiano de los extractos seleccionados como activos en el cribado, éstos se ensayaron frente a varias cepas de bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, así como frente a una cepa de hongo y una de levadura. Los datos obtenidos de estas pruebas fueron analizados utilizando el programa de cálculo *Screeener* (Genedata™). Además, todos los extractos y compuestos evaluados fueron dispensados sobre la superficie de agar o sobre las placas de ensayo de 96 pocillos con una estación robotizada de pipeteo (Tecan™ Aquarius®). Los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado en días distintos. Se consideró que un extracto presentaba actividad antimicrobiana cuando su porcentaje de inhibición era mayor al 60%.

Los microorganismos patógenos elegidos para evaluar los extractos fueron: 2 cepas distintas de *SASM* (*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina), 1 cepa de *SARM* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), 1 cepa *Enterococcus faecalis*, 1 cepa de *Haemophilus influenzae*, 1 cepa de *Escherichia coli*, 1 cepa *Acinetobacter baumannii*, 1 cepa de *Pseudomonas aeruginosa*; 1 cepa de *Aspergillus fumigatus* y 1

cepa de *Candida albicans*. A continuación, se detallan los protocolos para cada uno de los ensayos.

4.2.3.1 Actividad frente a bacterias Gram-negativas

4.2.3.1.1 *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

A partir de un cultivo congelado de *Acinetobacter baumannii* MB5973, de *Escherichia coli* MB2884 o de *Pseudomonas aeruginosa* PAO-01 preservado en criotubos con glicerol al 10% (v/v), se sembró una estría en placas de agar Luria-Bertani (LBA, 40 g/L) que se incubó a 37°C durante 18 horas para obtener colonias aisladas. Tres o cuatro de esas colonias aisladas se inocularon en 10 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) y se mantuvieron a 37 °C con agitación a 220 rpm durante 18-20 horas hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente, se llevó a cabo la dilución correspondiente para obtener un inóculo de ensayo a una concentración de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

El ensayo en líquido se realizó en placas de microdilución de 96 pocillos Costar® 3370 (Corning™) y para ello se dispensaron 10 µL/pocillo de cada extracto y 90 µL/pocillo del inóculo de ensayo. Además, en cada placa se añadieron como controles positivos una curva con diluciones ½ de rifampicina o de ciprofloxacina mientras que como control negativo se añadió una curva de anfotericina B.

También en cada placa de ensayo se añadieron en cuatro pocillos 10 µL de DMSO 20% y 90 µL medio sin inocular (blancos del ensayo) y en otros cuatro pocillos 10 µL de DMSO 20% y 90 µL del inóculo de ensayo (totales del ensayo), que sirvieron como controles de esterilidad y de crecimiento total del microorganismo. Con un espectrofotómetro Tecan™ UltraEvolution® la absorbancia a tiempo cero (T0) a una densidad óptica de 612 nm e inmediatamente después las placas se incubaron de forma estática a 37°C durante 18-20 horas. Después de la incubación, las placas se agitaron usando un agitador DPC™ Micromix-5® (3 minutos) y seguidamente se volvió a medir la absorbancia a tiempo final (Tf) a la misma densidad óptica. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó según la siguiente normalización (Audoin *et al.*, 2013):

Porcentaje de Inhibición (%):

$$100 \times \{1 - [(T_{\text{muestra}} - T_{0\text{muestra}}) - (T_{\text{blancos}} - T_{0\text{blancos}})] / [(T_{\text{totales}} - T_{0\text{totales}}) - (T_{\text{blancos}} - T_{0\text{blancos}})]\}$$

siendo:

$T_{0\text{muestra}}$ = absorbancia del microorganismo crecido con el extracto a tiempo cero.

T_{muestra} = absorbancia del microorganismo crecido con extracto a tiempo final.

$T_{0\text{totales}}$ = absorbancia del microorganismo crecido en ausencia del extracto a tiempo cero.

T_{totales} = absorbancia del microorganismo crecido en ausencia del extracto a tiempo final.

$T_{0\text{blancos}}$ = absorbancia del medio (LB) sin inocular a tiempo cero.

T_{blancos} = absorbancia del medio (LB) sin inocular a tiempo final.

4.2.3.2 Actividad frente a bacterias Gram-positivas**4.2.3.2.1 *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis***

Cultivos congelados en criotubos con glicerol al 10% (v/v) de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis* se utilizaron para sembrar placas de agar con medio BHI (Brain Heart Infusión, Difco™). Estas placas se incubaron estáticamente a 37°C durante 18-20 horas. Posteriormente, se seleccionaron colonias aisladas para inocular con ellas 10 mL de medio BHI líquido en matraces de 250 mL que se incubaron en agitación a 220 rpm y a 37 °C durante 20 horas. Pasado este tiempo, se preparó un inóculo de ensayo a una concentración de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Como controles positivos se incluyeron en cada placa curvas de kanamicina y vancomicina, y como control negativo anfotericina B. El procedimiento del ensayo en líquido y la normalización para el cálculo de los porcentajes de inhibición fueron los descritos anteriormente (Audoin *et al.*, 2013).

4.2.3.3 Actividad frente a levadura**4.2.3.3.1 *Candida albicans***

A partir de un criovial con una suspensión del inóculo stock de *Candida albicans* congelado se sembró una estría en placas con medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA, 65g/L). Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C. Cuatro o cinco colonias aisladas se recogieron de las placas de SDA y se resuspendieron en medio RPMI-1640 modificado, para preparar un inóculo ajustado a 0,25 de densidad óptica medida a 660 nm. El medio RPMI-1640 modificado fue preparado del siguiente modo: 20,8 g de RPMI

(Sigma-Aldrich™) se añadieron a un matraz de 2 L, junto con 13,4 g de YNB, 1,8 L de agua milliQ™, 80 mL de Hepes 1 M y 72 mL de glucosa 50 %. El volumen se ajustó a 2 L y se filtró. Por otro lado, la suspensión ajustada a 0,25 de densidad óptica se diluyó 1:10 y se mantuvo en hielo hasta que se usó para inocular las placas de 96 pocillos. En cada una de las placas se incluyeron curvas a diferentes concentraciones de anfotericina B y penicilina G como control positivo y negativo, respectivamente. El procedimiento del ensayo en líquido y la normalización para el cálculo de los porcentajes de inhibición fueron los descritos anteriormente (Audoin *et al.*, 2013).

4.2.3.4 Actividad frente a hongo filamentoso

4.2.3.4.1 *Aspergillus fumigatus*

Una suspensión del stock *Aspergillus fumigatus* fue ajustada por conteo cuantitativo de colonias mediante cámara de Neubauer a $3,5 \times 10^9$ UFC/mL. Esta suspensión de conidios fue diluida en 'Yeast Nitrogen Base broth' (YNB, 6,75 g/L yeast nitrogen base) hasta el 65% de transmitancia a 660 nm; 10 mL de este nuevo inóculo fueron añadidos a 1 L de Yeast Nitrogen Base-Dextrosa y 20 mL de esta mezcla fueron distribuidos en placas Omnitray® Nunc™. Una vez solidificado el agar, las placas se secaron en una campana de flujo laminar durante unos 15 minutos. Pasado este tiempo se distribuyeron 10 µL de cada extracto sobre la superficie del agar y se incubaron las placas a 28°C durante 18 horas (Vicente *et al.*, 2001). Como control positivo del ensayo se utilizó anfotericina B (0,25 mg/mL). Finalmente se midieron los halos de inhibición mediante un analizador de imágenes (desarrollado internamente) (Skwish *et al.*, 2004).

4.2.3.5 Test de concentraciones mínimas inhibitorias

Las CMIs de los distintos antibióticos de referencia y moléculas purificadas frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* fueron determinadas por la técnica de la microdilución de acuerdo con las directrices de la NCLCS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS, 2007). Se añadió BSA (0.02% w/v) al medio para prevenir la adhesión de los compuestos al poliestireno de las placas de ensayo (Scotti *et al.* 1993). El inóculo para realizar el test fue preparado utilizando como medio MHII (Muller Hinton Cation adjusted) ajustando la turbidez al estándar 0,5 de McFarland. La suspensión fue posteriormente diluida hasta una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Las placas de ensayo fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 18-20 horas.

El ensayo frente a *Clostridium difficile* se realizó siguiendo las pautas de la CLSI (Clinical & Laboratory Institute) (M11-A8, CLSI 2012), ajustando el inóculo de ensayo a una concentración de $1,5 \times 10^8$ cfu/ mL en medio Wilkins Chalgren broth (Oxoid, S.A) suplementado con 5 µg/ mL de hemina y 1 µg /mL de vitamina K1 y 5% de sangre lisada de caballo. Se incubaron las placas de ensayo en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Se definió la CMI como la concentración más baja de compuesto capaz de inhibir el 90 % del crecimiento de cada uno de los patógenos.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU ACTIVIDAD EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

4.3.1 ORIGEN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Las cepas de la colección de la Fundación MEDINA se conservan congeladas a -80°C en glicerol al 10% (v/v). Tras su utilización para la realización de la presente tesis, cada cepa se volvió a conservar de la misma manera para usos posteriores.

Tras el cribado de alto rendimiento y para continuar con la caracterización de posibles análogos de ramoplaninas, se seleccionó un grupo de cepas de actinomicetos que habían sido aisladas a partir de muestras de diferentes tipos de suelos, tales como suelos agrícolas, de cauces de ríos, de lagos, charcas, manglares, de dunas, de bosques tropicales y sempervirentes, de suelo de sabana y también de rizosfera, y que a su vez habían sido recogidas en Costa Rica, Guyana Francesa, México, Nueva Caledonia, Sudáfrica, España y Sri Lanka.

4.3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS SELECCIONADAS

Las cepas de actinomicetos seleccionadas a partir del HTS, fueron identificadas a nivel de género o familia por observación directa de la morfología microscópica (400x y 1000x) de su micelio aéreo y vegetativo desarrollado después de su crecimiento en agua-agar (Hunter-Cervera *et al.*, 1986) a una temperatura de 28°C durante 21 días. A nivel macroscópico se observó la morfología de las cepas crecidas en medio YME agar (en inglés *Yeast Malt Extract*) (4g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de glucosa, 20 g/L de agar).

4.3.3 TÉCNICAS GENOTÍPICAS BASADAS EN LOS PERFILES PCR-*fingerprinting*

4.3.3.1 Extracción de ADN

El ADN fue recuperado y purificado según adaptación de un método para cultivos de actinomicetos crecidos en medio líquido de ATCC-2 (0,5% extracto de levadura, 0,3% extracto de carne de vaca, 0,5% peptona, 0,1% dextrosa, 0,2% almidón de patata, 0,1% CaCO₃ y 0,5% NZamine EKC) descrito anteriormente por Innis *et al.* (Innis *et al.*, 1990).

De los cultivos axénicos crecidos en el medio ATCC-2 se recogieron 1,2 mL de suspensión de micelio en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Estos se centrifugaron a 13000 rpm (Biofuge-fresco, Heraeus), 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, conservando el micelio sedimentado a -20°C para la posterior extracción de ADN. El material celular recogido se resuspendió en 800 µL de tampón de extracción (50 mM EDTA pH 8,5; 0,2% SDS) y se incubó a 70°C durante 30 minutos en un termobloque (Multi-Block, Lab-Line™). Después se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL (Eppendorf™) con 60 µL de acetato potásico (CH₃CO₂K) 3 M, pH 5,2 y se incubó a -20°C durante 20 min. A continuación, se centrifugó en las condiciones anteriores y se pasaron 500 µL de sobrenadante a un nuevo tubo con 1 mL de etanol al 96%. Se incubó a -20°C de 2-5 horas; se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se lavó de nuevo con etanol al 70%, se centrifugó y se dejó evaporar el etanol en el termobloque a 37°C. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 50-100 µL de agua Milli-Q estéril según la cantidad visual de ADN.

4.3.3.2 PCR- *fingerprinting*: REP-PCR y BOX-PCR

Estas dos técnicas consisten en la amplificación por PCR de fragmentos palindrómicos repetitivos extragénicos. Los protocolos de amplificación mediante PCR con los cebadores REP y BOX se denominan REP-PCR y BOX-PCR respectivamente (Versalovic *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1994). Al elemento REP le corresponden las siguientes secuencias de los cebadores: REP1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3') y REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'); y al elemento BOX la secuencia del cebador que le corresponde es: BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').

En la Tabla 5 se presenta el contenido de la mezcla de reacción para cada muestra y técnica.

REP-PCR		REP-PCR	
REACCION DE PCR			
5X tampón Gitschier	5	7min - 95°C	
DMSO puro 10%	2,5	1min - 94°C	30 ciclos
BSA 20mg/ml	0,2	1min - 40°C	
dNTPs (10mM)	10,3	8min - 65°C	
Oligo 1 (100µM)	1	16min - 65°C	
Oligo 2 (100µM)	1		
Taq DNA Pol	0,4		
Vol. Master mix	20		
ADN 1/100	5		

BOX-PCR		BOX-PCR	
REACCION DE PCR			
5X tampón Gitschier	5	7min - 95°C	
DMSO puro 10%	2,5	1min - 94°C	30 ciclos
BSA 20mg/ml	0,2	1min - 53°C	
dNTPs (10mM)	11,3	8min - 65°C	
Oligo (100µM)	1	16min - 65°C	
Taq DNA Pol	0,4		
Vol. Master mix	20		
ADN 1/100	5		

Tabla 5. Volúmenes (expresados en µL) y parámetros de amplificación empleados para los análisis REP-PCR y BOX-PCR.

Así, la mezcla de reacción de 20 µL para cada una de las muestras contiene 5 µL del tampón 5X Gitschier (Louws *et al.*, 1995; Rademaker y De Bruijn, 1997), 0,2 µL de BSA (20 mg/mL), 2,5 µL de DMSO 100% (v/v), 1,25 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche™), 1 µM de cada oligonucleótido (1 µL de cada uno de los cebadores REP1RI y REP2-I o 1 µL del cebador BOXA1R, a una concentración cada uno de 0,3 µg/µL), 2 unidades de Taq polimerasa (0,4 µL de una concentración de 5 U/µL) (MP-1000U 5 U/µL Cat EPTQA100). A cada mezcla de reacción se le añaden 5 µL de una dilución 1/100 del extracto de ADN genómico de cada muestra.

Para la amplificación se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización de 7 min a 95°C, seguido de 30 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94°C, seguido de la fase de apareamiento de 1 minuto a 40°C para la pareja de cebadores REP y 53°C para el cebador BOX, seguido de la fase de extensión de 8 minutos a 65°C, y de una última etapa al final de los 30 ciclos, de 16 minutos a 65°C, para pasar posteriormente a 4°C (Tabla 5).

4.3.3.3 Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS

Para determinar la presencia de clústeres biosintéticos policétido sintetas (PKS-I y PKS-II) y péptido sintetasas no ribosomales (NRPS), se utilizaron los ADN purificados como molde para la reacción de amplificación de la Taq polimerasa y 3 parejas distintas de oligonucleótidos: K1F/M6R dirigidos a secuencias PKS-I (Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005); KS α F/KS β R dirigidos a secuencias PKS-II (Ayuso-Sacido y Genilloud 2005); y A3F/A7R específicos para secuencias NRPS (Ayuso-Sacido y Genilloud 2005) (Tabla 6).

	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (5' → 3')	TAMAÑO DE BANDA (pb)
PKS-I	K1F: 5'-TSA AGT CSA CAT CGG BCA-3'	1250-1400
	M6R: 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3	
PKS-II	KSαF: 5'-TSG RCT ACR TCA ACG CSC ACG G-3'	800-900
	KSβR: 5'-TAC SAG TCS WTC GCC TGG TTC-3'	
NRPS	A3F: 5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3'	700
	A7R: 5'-SAS GTC VCC SGT SCG GTA S-3	

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.

Como en el caso de los análisis de PCR-fingerprinting, todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo MJ Research PT-200, equipado con tapa caliente. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 50 μ L que contenía 0,4 μ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTPs (Roche™), 5 μ L de cada extracto de ADN, 1 U de Taq polimerasa (MP-1000U 5 U/ μ L Cat EPTQA100) en tampón de reacción recomendado por el fabricante y 10% de DMSO (Tabla 7).

PKS-I / PKS-II / NRPS		PKS-I		NRPS	
REACCION DE PCR					
10x tampón estándar	5	5min - 95°C	35 ciclos	5min - 95°C	35 ciclos
DMSO puro 10%	5	30s - 95°C		30s - 95°C	
dNTPs (10mM)	4	2min - 55°C		2min - 61°C	
Oligo directo (100 μ M)	0,25	4min - 72°C		4min - 72°C	
Oligo reverso (100 μ M)	0,25	10min - 72°C		10min - 72°C	
Taq DNA Pol	0,2				
H ₂ O	30,3	PKS-II			
Vol. Master mix	45	5min - 95°C	35 ciclos		
ADN 1/100	5	30s - 95°C			
		2min - 58°C			
		4min - 72°C			
		10min - 72°C			

Tabla 7. Volúmenes (expresados en μ L) y parámetros de amplificación empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 2 minutos a 55°C para la pareja K1F/M6R, 58°C para la pareja KS α /KS β y 61°C para la pareja A3F/A7R y 4 minutos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C al final de los 35 ciclos, para pasar finalmente a 4°C (Tabla7).

4.3.3.4 Digestión con Hin F1 de productos de amplificación del sistema NRPS

Los productos de amplificación se purificaron con el GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit[®] (27-9602-01; Amersham Pharmacia Biotech[™]) para su posterior digestión con la enzima HinF1 (Cat#E1061V, 1000 unidades; Amersham Pharmacia Biotech[™]). Las condiciones de digestión fueron las siguientes: en un tubo Eppendorf se añadieron 16 μ L de agua milli-Q[™] estéril, 2 μ L de 10X Buffer, 2 μ L de DNA y 0,2 μ L de HinF1, esta mezcla se incubó 3 horas a 37°C, y posteriormente se cargaron 1 μ L en un *DNA chip* (DNA 7500) Bioanalyzer[®] 2100 de Agilent Technologies[™].

4.3.4 ANÁLISIS DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS

4.3.4.1 Geles de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos específicos para la detección de las distintas rutas biosintéticas se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % (Invitrogen 48 pocillos Ref. GP-G8008-02) que contenían previamente bromuro de etidio.

4.3.4.2 DNA chips

Los patrones de amplificación, así como los de digestión obtenidos se visualizaron mediante electroforesis capilar usando el equipo Bioanalyzer[®] 2100 de Agilent Technologies[™] y los DNA chip (DNA 7500) que permiten la separación de fragmentos de ADN de doble cadena de un tamaño entre 100pb y 7500pb, siguiendo exactamente el protocolo indicado por el fabricante (<https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250>).

4.3.5 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S ARNr Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El ADN genómico de las cepas seleccionadas se utilizó como molde para la amplificación casi completa del gen 16S ARNr, mediante el empleo de los oligonucleótidos fD1 (Weisburg *et al.*, 1991) y rP2 (Lane, 1991). Los parámetros que se siguieron para llevar a cabo las reacciones de PCR fueron los siguientes: primero un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 2 minutos a 53°C y 4 minutos a 72°C, posteriormente seguido de 10 minutos a 72°C al final de los ciclos, para pasar por último a 4°C.

Los productos de amplificación fueron enviados a Secugen SL para su secuenciación. Los fragmentos de ADN se secuenciaron usando el ABI PRISMDYE Terminator Cycle sequencing Kit® y los fragmentos se resolvieron usando un ABI3130 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems™). Para cada producto de amplificación se secuenciaron las dos hebras usando los mismos oligonucleótidos usados para la amplificación inicial.

Las secuencias casi completas, de unos 1400 nt, se ensamblaron y editaron con la aplicación Assembler, incluido en el programa Bionumerics® de Appied Maths™ (versión 6.6) para su posterior análisis y alineamiento. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el programa ClustalX® (Thompson *et al.*, 1997), integrado en el software libre MEGA® versión 6.06. (Tamura *et al.*, 2013) donde se aplicaron los parámetros por defecto empleados en ClustalX®.

Posteriormente, los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se corrigieron manualmente para identificar posiciones con un alineamiento dudoso, principalmente en los extremos de las secuencias, y así poder corregirlas u omitirlas (Tindall *et al.*, 2010). Una vez alineadas, las secuencias se recortaron en sus extremos dejando unos 1300 nt que incluían alrededor de la posición 100 hasta la 1400. El posterior análisis filogenético se realizó usando también el programa MEGA®. La matriz de distancias entre cepas se calculó usando el algoritmo de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor, 1969) la cual se usó para construir un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Finalmente, para todos los árboles se obtuvieron los valores del método no paramétrico de remuestreo (*bootstrap*) implementando 1.000 pseudo-réplicas.

Además del árbol filogenético, las secuencias 16S ADN se utilizaron para realizar una identificación filogenética de la especie más cercana, proceso que se llevó a cabo inicialmente mediante el análisis de BLAST® (Altschul *et al.*, 1990) (Altschul *et al.*, 1997) y megaBLAST® (Zhang *et al.*, 2000) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), frente a la base de datos de cepas tipo con nombres procarióticos validados publicados (Chun *et al.*, 2007) (Kim *et al.*, 2012). Después, se seleccionaron las 30 secuencias con valores más altos para el cálculo de la similitud de secuencia por parejas (pairwise) usando un algoritmo de alineamiento global que fue implementado con el servidor de EzTaxon® server (Chun *et al.*, 2007) (Kim *et al.*, 2012) (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

4.3.6 ANÁLISIS DE CLUSTERS SEGÚN LOS PATRONES DE AMPLIFICACIÓN O DE DIGESTIÓN (PCR-fingerprinting)

Para el análisis numérico de los perfiles de amplificación obtenidos con cada técnica, se utilizó el programa informático Bionumerics® de Applied Maths™ (versión 6.6) (Louws *et al.*, 1995; Vanechoutte *et al.*, 1999; Rademaker y De Bruijn, 1997; Versalovic *et al.*, 1998). Para cada uno de los casos se calculó la similitud entre los patrones de bandas en base a las curvas densitométricas de cada una de las carreras, a partir de los valores comprendidos entre 0 y 255 dentro de la escala de grises (400 puntos de datos/curva densitométrica) mediante el coeficiente de similitud de Pearson o coeficiente de correlación del momento-producto o valor r (Pearson, 1926), aplicado a la totalidad de las curvas densitométricas de los carriles del gel (Hane *et al.*, 1993; Rademaker y De Bruijn, 1997). El análisis de *clusters* de los valores de similitud obtenidos se llevó a cabo mediante el algoritmo UPGMA.

Por otro lado, para el análisis de los patrones de digestión de los productos de amplificación de las rutas biosintéticas detectadas se calculó la similitud entre parejas de los patrones de digestión.

4.3.6.1 Estimación de la diversidad de las cepas seleccionadas

Para poder comparar las distintas técnicas empleadas por medio de la estimación de la diversidad, se requiere en primer lugar definir lo que es una OTU (Unidad taxonómica operacional) en cada tipo de análisis ya que la mayor parte de las aproximaciones que se utilizan requiere datos sobre las frecuencias relativas de las OTUs establecidas. Normalmente, una OTU se define al establecer un punto de corte en el porcentaje de similitud entre las cepas a partir del cual todas aquellas que tengan

un porcentaje mayor del punto de corte pertenecerán a la misma OTU. Siempre y cuando este punto de corte esté bien establecido y permanezca constante, la diversidad estimada será comparable y en consecuencia se podrán comparar los resultados obtenidos con las diversas técnicas (Hughes *et al.*, 2001).

En esta tesis, para estimar la diversidad de las cepas se utilizó dos aproximaciones estadísticas.

Por un lado, el índice de diversidad de Simpson (**D**) (Simpson, 1949) que es la probabilidad de que dos cepas elegidas al azar sean de la misma OTU (y se calcula mediante la fórmula:

$$D = 1 - P$$

$$\text{siendo } P = \sum n(n-1) / N(N-1)$$

donde **N** es el total de organismos presentes y **n** es el número de ejemplares por especie. Cuanto más cercano sea su valor al 100 % mayor diversidad presenta la población estudiada.

Y, por otro lado, el índice de diversidad de Shannon (**H'**) o de Shannon-Weiner que tiene en cuenta la riqueza de las especies y la uniformidad de la distribución del número de individuos de cada especie. Está basado en la abundancia relativa de cada taxón identificado. El valor de **H'** es de 0 si solo hay una especie y alcanza su máximo valor si todas las especies del conjunto estudiado están representadas por un número igual de individuos. En la mayoría de los ecosistemas naturales **H'** varía entre 1 y 5. (Zak y Willig, 2004). La fórmula del índice Shannon-Weiner es:

$$H' = -\sum (n/N) \ln(n/N)$$

donde **N** es el número total de cepas y **n** es el número de cepas en una OTU. Cuanto más cercano sea su valor a 5 mayor diversidad presenta la población estudiada.

El índice de diversidad de Simpson (**D**) y el índice de Shannon-Weiner (**H'**) se calcularon con Bionumerics®.

4.4 FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS: PEQUEÑA, MEDIANA Y GRAN ESCALA

4.4.1 CULTIVO DE LAS CEPAS

De las 49 cepas seleccionadas durante la campaña de cribado, conservadas a -80°C en glicerol al 10%, se sembró un taco de agar de cada una de las cepas en placa Petri (55 mm) con medio YME agar (4 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de glucosa, 20 g/L de agar). Estas placas se incubaron durante aproximadamente 4-5 días a 28°C hasta que se observó que el taco transferido había producido suficiente biomasa, y se extendió el taco con ayuda de una torunda de algodón sobre la superficie de la placa. Las placas se volvieron a incubar a 28°C durante 4-5 días adicionales.

Todas las cepas se preservaron y se volvieron a incorporar a la Colección en forma de 2 viales con 5 tacos de agar obtenidos con ayuda de un tubo de transferencia, que se depositaron en un criotubo de 2 mL que contenía 1,2 mL de glicerol 10%. Dichos criotubos se guardaron a -80°C .

El cultivo de todas las cepas se inició sembrando otros 5 tacos de agar en 10 mL de medio líquido ATCC-2 (5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NZamina EKC, 3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona, 10 g/L de dextrosa, 20 g/L de almidón de patata, 1 g/L de CaCO_3 (añadido después de ajustar el pH a 7) y 1000 mL de agua destilada en tubos de colonia (25x150 mm) con un cubreobjetos de cristal (25 mm) en su interior para disgregar el micelio formado durante el crecimiento de la bacteria y homogeneizar el cultivo (Figura 34).

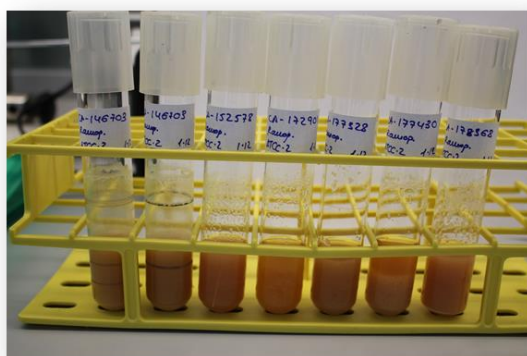


Figura 34. Tubos de colonia preparados a partir de tacos de agar en 10 mL de medio líquido ATCC-2.

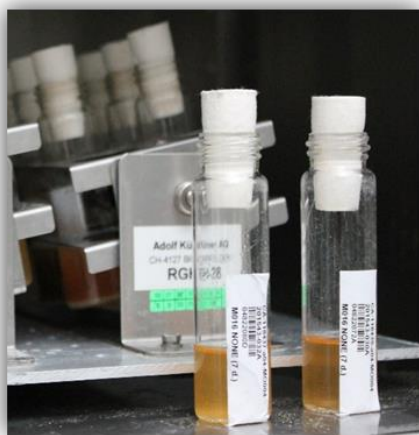
Los tubos se agitaron a 220 rpm, 28°C y 70% de humedad relativa, durante 4 días en un incubador Kühner™ modelo ISF-4-V®.

Después de ese tiempo, y antes de inocular los medios de fermentación, se le hizo una prueba de esterilidad a cada uno de ellos en placas con BHI (Brain Heart Infusión Agar) que se mantuvieron durante dos días en estufa a 30°C. Asimismo, se prepararon cultivos de todas las cepas en matraces de hendidura de 250 mL (50 mL de medio ATCC-2) para obtener más volumen de inóculo necesario para posteriores fermentaciones a mayor escala.

4.4.2 FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS

Las fermentaciones se pueden llevar a cabo en varios tipos de formatos dependiendo del volumen de extracto que queramos generar o que necesitemos para la purificación de compuestos activos. En nuestro caso, se denominaron como “fermentaciones de pequeña escala” a aquellas que se realizaron en viales EPA de 40 mL (10 mL de medio por vial), “fermentaciones de mediana escala” a las que se realizaron en 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL (150 mL por matraz), y “fermentaciones de gran escala” a aquellas que realizamos en 10 o más matraces Erlenmeyer de 500 mL (150 mL de medio por matraz) (Figura 35).

A) Fermentaciones de pequeña escala



B) Fermentaciones de mediana y gran escala



Figura 35. Formatos en los que se han llevado a cabo las fermentaciones de las cepas.

A) Viales EPA para fermentaciones de pequeña escala. **B)** Matraces de 500 mL para las fermentaciones de mediana (2 matraces) y gran escala (+10 matraces).

Los medios y condiciones empleadas para la fermentación de cada cepa se seleccionaron en base a las actividades obtenidas en el cribado de alto rendimiento. Los medios previamente esterilizados en autoclave se dispensaron en los viales EPA o matraces, según el caso, y a continuación se inocularon los cultivos manteniéndose en agitación a 220 rpm, 28°C y 70% de humedad relativa durante 7 o 13 días en un incubador Kühner con temperatura y humedad controladas. La composición de los medios de fermentación utilizados fue la siguiente (Tabla 8):

CLA	g/L	DNPM	g/L
Lactosa	40	Dextrina de maíz Tipo I (SIGMA D2006)	40
Harina de maíz (SIGMA-C6304)	40	N-Z Soy BL (SIGMA P6713)	7.5
Autolisado de levadura (SIGMA-43750)	5	Levadura primaria	5
Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro	MOPS (CALBIOCHEM 475898)	21
		Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro

FR23	g/L	GOT	g/L
Glucosa (PANREAC 131341)	5	Glicerol (PANREAC 141339)	60
Almidón soluble de patata (PANREAC 121096)	30	Harina de avena	15
Melaza de caña	20	Pasta de tomate	5
Harina de semilla de algodón (Traders Protein)	20	CaCO ₃ (MERCK 8605747)	3
Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro	Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro

MPG	g/L	SOTM	g/L
Glucosa (SIGMA G-8270)	10	Sacarosa	45
Harina de mijo	20	MOPS (CALBIOCHEM 475898)	21
Harina de semilla de algodón (Traders Protein)	20	Harina de avena	15
MOPS (FISHER BP-308)	20	Pasta de tomate	5
Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro	CaCO ₃ (MERCK 8605747)	3
		Agua desionizada pH 7.0	hasta 1 litro

Tabla 8. Composición de los medios de fermentación seleccionados en base a las actividades que los extractos de las diferentes cepas presentaron en el cribado de alto rendimiento.

4.5 EXTRACCIÓN DE LAS FERMENTACIONES: PEQUEÑA, MEDIANA Y GRAN ESCALA

4.5.1 EXTRACCIÓN DE LAS FERMENTACIONES

Después de los 7 o 13 días de incubación, se prepararon las muestras para su ensayo mediante la extracción con disolventes orgánicos de los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación. Para ello se siguió un protocolo general de extracción total con acetona para las fermentaciones de pequeña escala y un protocolo más específico con butanol para el caso de las fermentaciones a mayor escala que nos

permitió enriquecer los extractos en los compuestos de nuestro interés (ramoplaninas) para su posterior aislamiento y purificación (Cavalleri *et al.*, 1984).

Durante los procesos de extracción y fermentación, todos los matraces, viales y placas fueron registrados, identificados mediante código de barras y escaneados para su seguimiento, quedando identificada cada cepa, los medios de fermentación, el tipo de extracción realizada y la localización de cada muestra en las placas de la colección en una base de datos interna Oracle (Nautilus® LIMS Thermo™). Todo ello facilitó el seguimiento y posterior análisis de resultados tanto biológicos como químicos.

4.5.2 EXTRACCIÓN CON ACETONA A PEQUEÑA ESCALA

A los viales de fermentación (EPA™) se les añadió la misma cantidad del disolvente orgánico acetona (Merck™) que de volumen de fermentación (10 mL) mediante una bomba peristáltica Masterflex™ L/S (modelo 77800-50®), se taparon herméticamente y se mantuvieron en agitación orbital a 220 rpm en un incubador Kühner™ durante una hora, en la que se hizo un descanso de 10 minutos transcurridos los primeros 30 minutos. Tras la agitación se transfirieron 12 mL de sobrenadante a tubos de vidrio de 16 mm a los que se añadió 0,6 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Merck™) y se pusieron a evaporar durante toda la noche bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 3 mL (80% agua y 20% DMSO).

Se considera que la concentración de todos los compuestos producidos durante la fermentación es 1X equivalentes de fermentación, cuyas unidades denominamos WBE (Whole Broth Equivalent). De esta manera, la concentración final de los compuestos en los extractos resultó ser de 2X WBE.

Por último, se distribuyeron alícuotas de 500 µL en varias placas de almacenamiento de 96 pocillos ABgene® 0765 de ThermoFisher™ con un robot pipeteador de líquidos MultiProbe® II HT EX de Perkin Elmer™. Estas placas se sellaron con un termo-sellador de placas Plateloc® de Agilent Technologies™, una se almacenó a 4°C y se utilizó en los sucesivos ensayos y análisis, y el resto del material se almacenó en las mismas condiciones a -20°C.

4.5.3 EXTRACCIÓN CON BUTANOL A MEDIA ESCALA

A los 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL fermentados para cada condición activa se les añadió la misma cantidad del disolvente orgánico acetona (Merck™) que de volumen

de fermentación (150 mL) mediante una bomba peristáltica Masterflex® L/S (modelo 77800-50), se taparon herméticamente con tapones de silicona y se mantuvieron en agitación orbital a 200 rpm en un incubador Kühner durante 1 hora en la que se hizo un descanso de 10 minutos transcurridos los primeros 30 minutos. Se tomó una alícuota de cada matraz de 20 mL y el resto se almacenó a -20°C. La acetona de cada vial se evaporó bajo corriente de nitrógeno tras lo cual se midió el pH que se ajustó a 3,5 y se añadieron 10 mL de acetato de etilo (Merck™) a cada vial. Los viales se agitaron entonces a 200 rpm en Kühner durante 8 horas. Transcurrido este tiempo el contenido de los viales se centrifugó en centrifugas Hettich™ Rotanta® 460 RS a 3000 rpm durante 5 minutos y se guardó en congelador a -20°C durante 2 horas. Después se decantó y se desechó el sobrenadante (la fase de acetato de etilo, no congelada), y por otro lado se descongeló la fase acuosa. Se midió el pH y se ajustó a 3,5 se le añadió a cada vial un volumen de 10 mL de butanol y se mantuvieron en agitación orbital a 200 rpm durante 8 horas. A continuación, el contenido de los viales se centrifugó en centrifugas Hettich™ Rotanta® 460 RS a 3000 rpm durante 5 minutos y se guardó en congelador a -20°C en reposo para favorecer la aparición de dos fases en un congelador a -20°C durante 8 horas. Después se decantó el sobrenadante de cada uno de ellos (8 mL de fase butanólica) que se evaporó en tubos de 16 mm en corriente de nitrógeno hasta sequedad en Turvovap™. Finalmente, a cada uno de ellos se le añadieron 200 µL de DMSO y 800 µL de agua para hacer una placa de extractos concentrada a 8x WBE.

4.5.4 EXTRACCIÓN CON BUTANOL A GRAN ESCALA

A 10 matraces Erlenmeyer de 500 mL se les añadió la misma cantidad del disolvente orgánico acetona (Merck™) que de volumen de fermentación (150 mL) mediante una bomba peristáltica Masterflex® L/S (modelo 77800-50), se taparon herméticamente con tapones de silicona (Figura 36) y se mantuvieron en agitación orbital a 200 rpm en un incubador Kühner durante 3 horas. Se evaporó la acetona de cada matraz bajo corriente de nitrógeno (Figura 36) tras lo cual se juntaron todos los matraces en un vaso de precipitados y se ajustó el pH a 3,5. Se volvió a repartir el extracto en 10 matraces y se añadieron 150 mL de acetato de etilo (Merck™) a cada uno para realizar una primera partición líquido/líquido. Los matraces tapados se agitaron entonces a 200 rpm en Kühner durante 8 horas. Transcurrido este tiempo el contenido de los matraces se centrifugó en centrifugas Hettich™ Rotanta® 460 RS a 7500 rpm durante 5 minutos

y se guardó en congelador a -20°C durante 2 horas. Después se decantó y se desechó el sobrenadante (la fase de acetato de etilo, no congelada), y por otro lado se descongeló la fase acuosa que se homogeneizó, ajustó a pH 3,5, se repartió en 10 matraces y se le añadió a cada matraz un volumen de 150 mL de butanol y mantuvieron en agitación orbital a 200 rpm durante 8 horas para realizar una segunda partición líquido/líquido. A continuación, el contenido de los matraces se centrifugó en centrifugas Hettich™ Rotanta® 460 RS a 7500 rpm durante 5 minutos y se guardó en reposo para favorecer la aparición de dos fases en un congelador a -20°C durante 8 horas. Después se decantó el sobrenadante de cada uno de ellos (la fase butanólica) que se evaporó en matraces bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad.



Figura 36. Extracción con butanol a gran escala. **A)** Acetona añadida a los matraces Erlenmeyer de 500 mL mediante una bomba peristáltica Masterflex®. **B)** Evaporación de la acetona de los matraces mediante corriente de nitrógeno.

4.6 DESREPLICACIÓN QUÍMICA MEDIANTE HPLC-MS

Los extractos se analizaron en las sucesivas etapas del proceso de descubrimiento de fármacos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada con detección mediante Espectroscopía Ultravioleta y Espectrometría de Masas (en inglés HPLC-UV-MS). Los espectros de UV y masas obtenidos se compararon con los de metabolitos secundarios que se guardan en una base de datos interna. Esta base de datos contiene los datos de HPLC-UV-MS de más de 1.000 productos naturales con actividad antimicrobiana, la mayoría de ellos representantes de una familia diferente de moléculas, entre los cuales se encuentran la ramoplanina A2, la ramoplanosa y las enduracidinas A y B.

Este análisis se llevó a cabo en un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo simple (Agilent™ MSD1100®), mediante una columna Agilent™ Zorbax SB-C8 (2,1 x 30 mm) mantenida a una temperatura constante de 40°C y con un caudal de 300 µL/min. El solvente [A] estaba compuesto por un 10% de acetonitrilo y un 90% de agua con 1,3 mM de ácido trifluoroacético y formiato amónico, y el solvente [B] estaba formado por un 90% de acetonitrilo y un 10% de agua con 1,3 mM de ácido trifluoroacético y formiato amónico. El gradiente comenzó con 10% del solvente [B] y llegó al 100% de este mismo solvente [B] en 6 minutos; la elución con 100% del solvente [B] se mantuvo durante 2 minutos y se volvió al 10% de [B] en los 2 minutos siguientes hasta inicializar el sistema. Se registraron los espectros de UV de 100 a 900 nm en intervalos de 0,25 seg/scan utilizando un detector de diodos (DAD). La ionización del disolvente de elución se obtuvo mediante una fuente de electro spray ESI de Agilent™ MSD1100® ajustado a un flujo de gas secante a 11 L/min a 325 °C y una presión del nebulizador a 40 psig. El voltaje del capilar se estableció a 3500 V. Los espectros de masas se recogieron en escaneado completo desde 150 m/z a 1500 m/z , con un escaneado cada 0,77 segundos en ambos modos: ión positivo (POS) y negativo (NEG).

El estudio de los perfiles obtenidos se hizo mediante una aplicación informática interna donde los valores de UV-DAD, tiempo de retención, y los espectros de masas POS y NEG de las muestras de nuestro interés, se contrastaron con los de metabolitos conocidos ya almacenados en dicha base de datos (Perez-Victoria *et al.*, 2016). Todos los resultados son comparables puesto que las condiciones de cromatografía y detección que se utilizaron fueron los mismos que para la creación de la base de datos.

4.7 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS A MEDIA Y GRAN ESCALA

4.7.1 FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN POR HPLC

Los fraccionamientos a escala semipreparativa o preparativa se realizaron en un equipo HPLC-preparativo Gilson™ GX-281 322H2®, con detección UV-Vis, que disponía de un colector de fracciones y de un sistema automático de inyección de muestra (Figura 37).



Figura 37. Fotografía del equipo HPLC-preparativo Gilson™ GX-281 322H2® con el que se realizaron los fraccionamientos a escala semipreparativa o preparativa.

La columna utilizada en el caso de los fraccionamientos semipreparativos fue una Agilent™ Zorbax® SB-C8 (250 × 9 mm, 5 μm). Se colectaron 80 fracciones, en intervalos de medio minuto, que contenían un volumen total de 1,8 mL cada una en un gradiente de acetonitrilo en agua a 3,6 mL/min de 5% a 0 minutos y 100% acetonitrilo a 38 minutos manteniéndose hasta los 40 minutos. Tanto el agua como el acetonitrilo se utilizaron con modificador ácido TFA 0,1%.

En cuanto a la columna utilizada en los fraccionamientos preparativos fue una Agilent™ Zorbax® SB-C8 (212 x 250 mm, 7 μm). Se colectaron 80 fracciones (una por cada medio minuto) que contenían 10 mL de fase móvil cada una en gradientes variables de acetonitrilo 0,1% TFA en agua 0,1% TFA a 20 mL/min. El evaporado de los disolventes de cromatografía se llevó a cabo en un evaporador centrífugo Genevac™ HT-8®.

4.8 PURIFICACIÓN DE RAMOPLANINAS A PARTIR DE LA CEPA CA-178528

La purificación de las moléculas de interés se basó en el fraccionamiento sucesivo guiado mediante actividad biológica y composición química de las fracciones de interés hasta la obtención de los compuestos puros (>90% por RMN).

4.8.1 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Con una bomba Masterflex® L/S (modelo 77800-50) se añadieron un total de 1,5 L de acetona a un total de 1,5 L de caldo de fermentación de la cepa CA-178528 crecida en medio FR23 durante 13 días, que habían sido preparados en 10 matraces de 150 ml cada uno. Cada matraz se cerró herméticamente con tapones de silicona y se agitaron durante 3 horas a 220 rpm en una cámara Kühner a temperatura ambiente (22 °C). Después, la acetona de los matraces se evaporó bajo una corriente de vapor de nitrógeno, se ajustó el pH a 3,5 y se añadió 150 mL de acetato de etilo (EtOAc) a cada uno de los 10 matraces de 500 ml, haciendo un total de 1,5 L.

Se llevó a cabo una partición líquido/líquido mediante agitación durante la noche (15 h) a 220 rpm en una cámara Kühner a temperatura ambiente (22 °C). Transcurrido este tiempo el contenido de los matraces se centrifugó a 7500 rpm en una centrífuga Hettich™ Rotanta® 460 RS durante 10 minutos y se guardó a -20°C durante la siguiente noche (18 h). Después se descartó la fase orgánica (EtOAc) por decantación y la fase acuosa, una vez descongelada se ajustó a pH 3,5. Finalmente, se añadieron 1,5 L de n-butanol (150 mL por matraz) y se realizó una segunda partición líquido/líquido mediante agitación durante la noche (15 h) a 220 rpm en una cámara Kühner a temperatura ambiente (22°C). El contenido de los matraces se centrifugó de nuevo a 7500 rpm en una centrífuga Hettich™ Rotanta® 460 RS durante 10 min y se almacenaron a -20°C durante la noche. La fase orgánica (fase butanólica, n-BuOH) se recogió por decantación y se evaporó bajo una corriente de vapor de nitrógeno hasta sequedad.

Por último, el residuo seco se disolvió en 8 mL de DMSO 100% obteniéndose una solución transparente que se filtró a través de varios filtros de jeringa de 2 µm.

4.8.2 FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Inicialmente, con una veinteava parte (1/20) del material se realizó una prueba a pequeña escala de la separación de los metabolitos de interés mediante un fraccionamiento en fase reversa en un equipo HPLC- Gilson™ GX-281 322H2®.

Para ello, en una columna Agilent™ Zorbax® SB-C8 (250 × 9 mm, 5 μm) con su correspondiente precolumna, se colectaron 80 fracciones, a intervalos de medio minuto (1,8 mL por fracción) con un gradiente de acetonitrilo en agua a 3,6 mL/min de 5% de 0 a 2 minutos, de 5% a 70% de 2 a 35 minutos, y de 70% a 100% de 37 a 39 minutos, mantenido en 100% hasta los 45 minutos. Tanto el agua como el acetonitrilo se utilizaron con modificador ácido TFA 0,1%. Monitorizando la cromatografía a 210 y 280 nm.

Una vez confirmada mediante el análisis por HRMS la presencia de las nuevas ramoplaninas en las fracciones activas correspondientes, se pasó a realizar un fraccionamiento del resto del extracto butanólico mediante cromatografía de fase reversa de baja resolución (*flash*), en un equipo automatizado CombiFlash Teledyne ISCO Rf400x, empleando resina C-18 Phenomenex (0,040-0,063 mm) como fase estacionaria. Para ello, el extracto de la cepa CA-178528 se disolvió en DMSO (1,2 mL) y se separó (en columna de fase reversa C-18 (72,48 g; 0,040-0,063 mm) empleando una fase móvil CH₃CN (0.1 % TFA): H₂O (0,1% TFA) a un flujo 15 mL/min, y un gradiente del 20% a 60% CH₃CN (0.1% TFA) en 43 min, del 60% CH₃CN hasta 100% en 7 min + 100% CH₃CN en 25 min. La detección UV se monitorizó a 210 y 280 nm.

Una vez colectadas las fracciones, se evaporó el disolvente orgánico de cada una de ellas y el residuo acuoso se sometió a liofilización. Los disolventes empleados en extracciones (grado reactivo) y purificaciones (grado HPLC) fueron adquiridos de Merck, y usados sin posterior purificación. La evaporación de los disolventes se llevó a cabo en un evaporador centrífugo GeneVac EZ2®.

Atendiendo a la actividad de las fracciones, estas se agruparon en 3 bloques que fueron fraccionados por fase reversa mediante un equipo HPLC preparativo Gilson™ GX-281 322H2®.

Así, en una columna Agilent™ Zorbax® SB-C8 (212 x 250 mm, 7 μm) se colectaron 80 fracciones, una por cada medio minuto (1,8 mL por fracción), con un gradiente de

acetonitrilo en agua a 3,6 mL/min de 5% de 0 a 3 minutos, de 5% a 60% de 3 a 36 minutos, de 60% a 100% de 37 a 39 minutos mantenido en 100% hasta los 45 minutos. Tanto el agua como el acetonitrilo se utilizaron con modificador ácido TFA 0,1%. Monitorizando la cromatografía a 210 y 280 nm.

Posteriormente, se formaron dos grupos combinando las diferentes fracciones procedentes de los fraccionamientos, según su absorbancia en UV a 210nm y para ambos grupos se realizó un análisis por HRMS para confirmar la presencia de los compuestos a purificar. Cada uno de los grupos se secaron por corriente de vapor de nitrógeno y se reconstituyeron en la mínima cantidad posible de DMSO y fueron filtrados a través de varios filtros de jeringa de 2 µm. De este modo, se obtuvieron dos muestras de 300 µL enriquecidas en los compuestos de interés para ser re-purificadas.

La re-purificación de ambos grupos, se llevó a cabo mediante un fraccionamiento preparativo isocrático con 28 % de acetonitrilo en agua y 0,1% de TFA. se realizaron inyecciones seriadas (en total 4 inyecciones) de 70 µL en una columna Agilent™ Zorbax® SB-C8 (212 x 250 mm, 7 µm) con su correspondiente precolumna, se colectaron fracciones de 20mL, que se combinaron atendiendo a las longitudes de onda de la cromatografía (210 y 280 nm). Como resultado de todo el proceso descrito se obtuvo una nueva ramoplanina cuya pureza y estructura se determinó mediante espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y espectroscopía de RMN.

4.8.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE NUEVAS RAMOPLANINAS

La elucidación estructural de los nuevos productos naturales se basó en el análisis de los datos obtenidos mediante el empleo de distintas técnicas espectroscópicas, incluyendo de forma significativa la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), mediante la cual se obtuvo información sobre peso y fórmula molecular así como de los fragmentos clave de la molécula, y la espectroscopía de RMN monodimensional (^1H y ^{13}C) así como experimentos bidimensionales de correlación ^1H - ^1H como COSY y NOESY y de correlación ^1H - ^{13}C como HSQC editado y HMBC, mediante los cuales fue posible establecer la estructura plana de los compuestos y la estereoquímica relativa. Los espectros de RMN se adquirieron en un Espectrometro Bruker Avance III de 500MHz, empleando una criosonda de 1,7 mm. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron mediante un analizador Bruker™ maXis® (Martin *et al.*, 2014). La comparación con patrones de ramoplanina A2, hizo posible la

generación de hipótesis estructurales de moléculas desconocidas a partir del análisis de los resultados de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono- y bidimensional y espectrometría de masas, permitiendo la caracterización estructural de las nuevas ramoplaninas obtenidas.

4.9 ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO

4.9.1 ENSAYO DE DETECCIÓN DE INHIBICIÓN DE CITOCROMOS POR LC-MS

El citocromo P450 (CYP450) es una familia de hemoproteínas presentes en gran número de especies, desde bacterias a mamíferos, que son responsables del metabolismo de xenobióticos convirtiendo estos compuestos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. En humanos, se conoce la presencia de estas enzimas en todo el organismo, principalmente en órganos tales como hígado, intestino, corazón y riñón, y esta amplia distribución tisular se justifica debido al gran número de funciones que realizan ya que dichas enzimas también intervienen en la biosíntesis de algunos compuestos endógenos (hormonas y moléculas señalizadoras). No obstante, el hígado es el órgano con mayor expresión del citocromo P450 y se considera el principal órgano de metabolización de xenobióticos.

Muchas interacciones farmacológicas son el resultado de una alteración del metabolismo del CYP450, y la inhibición de la actividad catalítica de sus diferentes isoformas es una de las principales formas de interacción medicamentosa que se conocen (Dresser *et al.*, 2000).

En este contexto, se han realizado ensayos para observar la posible inhibición de la nueva ramoplanina en las isoformas más relevantes de CYP450, utilizando un método basado en microsomas hepáticos y usando como detección la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Este método semi-automatizado (Figura 38) se ha validado con diferentes compuestos comerciales que permiten asegurar la reproducibilidad y la robustez de los datos obtenidos. Se eligieron las isoformas de los citocromos más representativas por expresión hepática y capacidad de biotransformación de fármacos conocidos en el hombre: CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6.

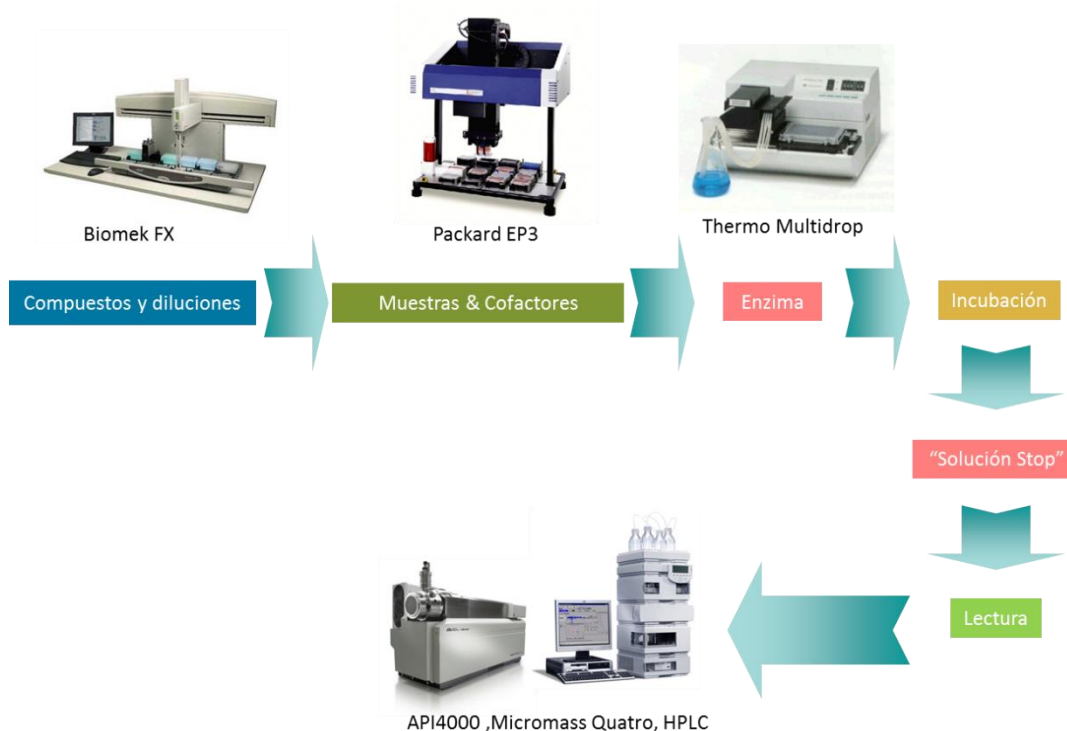


Figura 38. Esquema general del método semi-automatizado del ensayo de inhibición de citocromos basado en el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Se utilizaron microsomas humanos que contienen todo el complemento citocrómico y sustratos selectivos por cada isoforma. Para evaluar la capacidad de inhibir la actividad de CYP450 se calculó la CI_{50} (concentración que inhibe al 50%) mediante la monitorización de la formación de un metabolito específico de cada isoforma en presencia del compuesto de estudio. Para la isoforma CYP3A4 se eligió como referencia de sustrato metabolizado la testosterona que se metaboliza selectivamente a 6β -hidroxitestosterona. Para la puesta a punto de esta metodología se testaron 6 inhibidores de la isoforma. Se compararon los valores de CI_{50} obtenidos para estos inhibidores con los reportados en la literatura (Di Marco *et al.*, 2005; Obach *et al.*, 2006). Para la isoforma CYP2C9 se utilizó como sustrato sonda el diclofenaco que se transforma en 4'-hidroxiclofenaco. Con el fin de poner a punto el proceso se testaron 7 inhibidores de la isoforma y se compararon los valores de CI_{50} obtenidos con los reportados en la literatura (Bell *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2000). Para la isoforma CYP2D6 se usó el dextrometorfano que pasa a dextrofano. Se testaron 7 inhibidores de la isoforma para poner en marcha el ensayo y se compararon los valores de CI_{50} obtenidos con los reportados en la literatura (McGinnity *et al.*, 2008).

Las incubaciones para evaluar la inhibición de CYP450 se realizaron en un formato de placa de 96 pocillos a 37 ° C. La incubación final (200 µL de volumen total) contenía 0,25 mg /mL de proteína en forma de microsomas hepáticos humanos (HLM) en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,4), NADPH 1 mM y el compuesto a 0,078; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 11; 22; 44 y 87,5 µM. La concentración de sustrato para CYP3A4 fue 50 µM de testosterona y el tiempo de incubación 15 minutos. En el caso de CYP2D6, la reacción se realizó con 22 µM de dextrometorfano durante 15 minutos. Para CYP2C9, la incubación se realizó con diclofenaco 10 µM durante 15 minutos. El compuesto en DMSO/AcN (v/v) (2 µL) se mezcló con 98 µL de solución de NADPH, y las reacciones se iniciaron mediante la adición de 100 µL de solución de que contenía el sustrato sonda en cada caso y los HLM. Las reacciones enzimáticas se detuvieron con la adición de una solución de parada (90 µL) de acetonitrilo que contenía patrones internos para el análisis por LC-MS (60 ppb de cortisona, 100 ppb de 4'-hidroxiclofenaco 13C6, 60 ppb de levallorfán) (Pérez *et al.*, 2015).

Los controles como ketoconazol para CYP3A4, quinidina para CYP2D6 o sulfafenazol para CYP2C9, se incluyeron en todas las placas de incubación. El contenido final de DMSO se estableció en 0,35% para todas las isoformas. Los líquidos sobrenadantes de la reacción se obtuvieron mediante 10 minutos de centrifugación a 3717 g (4 ° C), y se analizaron por LC-MS para la cuantificación relativa de los metabolitos (6β-hidroxitolstosterona, 4'-hidroxiclofenaco, o dextrorfano) generado a partir de los sustratos sonda correspondientes.

El análisis cuantitativo de los metabolitos del sustrato de la sonda en el sobrenadante de reacción se realizó usando un cromatógrafo de líquidos Shimadzu AD10 acoplado a un espectrómetro de masas API4000 (triple cuadrupolo) (AB SCIEX). La separación cromatográfica se obtuvo usando una columna Discovery HS C18 (50 mm, 2 mm, 5 µm) (Supelco, Torrance, CA) precedida por una precolumna Discovery HS C18. La temperatura de la columna era de 25 ° C. La fase móvil consistió en 2 soluciones: (A) agua/metanol 90/10 (v/v) en ácido fórmico al 0,1% y (B) acetonitrilo/agua en ácido fórmico al 0,1%. La fase móvil B se mantuvo al 10% durante 0,5 minutos, luego se aumentó al 45% de B durante 1,50 minutos. Esta composición de solventes se mantuvo durante 0,30 minutos, y a continuación se aumentó de nuevo hasta el 95% de B durante 2,30 minutos y se mantuvo así durante 0,50 minutos para finalmente volver al 10% de B durante 0,10 minutos para reequilibrar el sistema durante 0,61 minutos. El

tiempo de ejecución total fue de 3,51 minutos, con un caudal de 1 mL/minuto (Pérez *et al.*, 2015).

En el espectrómetro de masas se utilizó con la sonda de ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo positivo y en modo de fragmentación de monitorización de múltiples reacciones (MRM). La integración de los picos cromatográficos tanto de los metabolitos sonda como de los patrones internos se llevó a cabo mediante la herramienta de software Analyst (ABSciex).

4.9.2 CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Para determinar la citotoxicidad de los extractos y los compuestos aislados de ellos, se utilizaron dos líneas celulares: HepG2 (carcinoma hepatocelular, ATCC® CCL-8065) y THLE-2 (hepatocitos ATCC® CRL-2706TM). Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino FBS (Suero fetal bovino), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales 100 µM. Además, ambas líneas celulares fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

4.9.2.1 Ensayo colorimétrico de reducción de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, también conocido como MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas. En este proceso (Figura 39) el MTT, compuesto hidrofílico de color amarillo, se transforma en formazán, compuesto azul e hidrofóbico, permitiendo determinar de esta manera la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células viables (Verhulst *et al.*, 1998).

Las células HepG2 y THLE-2 fueron sembradas en placas tratadas para cultivo celular de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células/pocillo para el caso del ensayo a 72 horas y 20.000 células/pocillo para el caso del ensayo a 24 horas y se dejaron incubando durante 24 horas. A continuación, se añadieron las muestras (extractos o compuestos) a dos diluciones (1:20 y 1:40) utilizando un dispensador robótico de placas multipocillo BiomekFX® (Beckman™) y se incubaron de nuevo 24 y 72 horas. El porcentaje máximo de DMSO se fijó a 0,5%. Previamente se realizó una curva de DMSO para cada línea celular, observándose qué concentraciones por debajo de 2% de DMSO

no tenían ningún efecto significativo. Como control positivo (100% de muerte celular) se empleó metil-metanosulfonato (MMS) a 4 mM y como control negativo (0% de muerte celular) DMSO 0,5%. Asimismo, se incluyeron curvas de estándares conocidos como son actinomicina D, doxorubicina y rotenona. Transcurridos los 2 diferentes tiempos de ensayo (24 y 72 horas), se añadió MTT (Sigma-Aldrich™), a una concentración final de 0,5 mg/mL, y se incubó durante 3 horas más. Por último, se determinó la concentración de formazán generado mediante espectrofotometría a 570 nm en un lector de placas multipocillo Victor2® (PerkinElmer™).

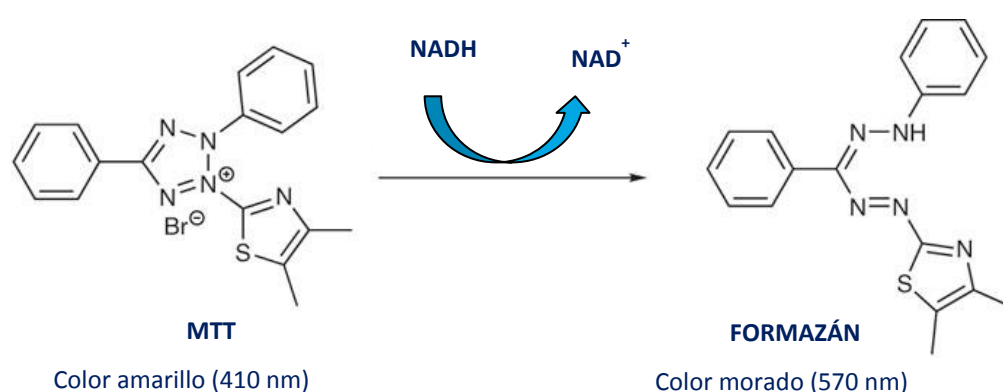


Figura 39. En este proceso el MTT, compuesto hidrofílico de color amarillo, se transforma en formazán, compuesto azul e hidrofóbico, permitiendo determinar de esta manera la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Los datos fueron analizados utilizando el programa de cálculo Screener® (Genedata™), tomando como 100% de muerte celular (control positivo) el tratamiento con MMS 4 mM, y como 0% de muerte celular (control negativo) el 0,5% de DMSO. El porcentaje de muerte celular para cada concentración se calculó aplicando la siguiente fórmula:

% Muerte celular = 100 x (control negativo - compuesto / control negativo - control positivo)

4.9.3 TOLERABILIDAD LOCAL

4.9.3.1 Actividad hemolítica *in vitro*

La hemólisis de los eritrocitos se considera un indicador de la tolerabilidad local de los análogos de ramoplanina (Ciabatti *et al.*, 2007), por lo que se evaluó este parámetro en base a los métodos sugeridos en la bibliografía. El protocolo seguido para llevar a cabo los experimentos se adaptó del reportado para análogos semisintéticos de ramoplanina (Ciabatti *et al.*, 2007) y del reportado para monoésteres de ácidos grasos de dos familias de trisacáridos (Carvalho *et al.*, 2015).

Se emplearon eritrocitos obtenidos de una muestra de sangre fresca de perro (C.T.V., Centro de Transfusión Veterinario, 28703 Madrid) que se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 20°C. El plasma se decantó y se añadió un volumen igual al descartado de solución salina al 0,9% en agua para resuspender los eritrocitos. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. Con los eritrocitos resultantes de este proceso se determinó la capacidad hemolítica de los compuestos objeto de nuestro estudio.

Las correspondientes diluciones de los compuestos a evaluar se prepararon en solución salina, y en tubos Eppendorf de 1,5 mL se añadieron 100 µL de compuesto y 400 µL de la suspensión de eritrocitos y se agitó suavemente durante 3 segundos. Seguidamente, se incubaron las muestras durante 15 minutos en un baño de agua a 37°C. Después de la incubación, se separaron los eritrocitos por centrifugación a 3000 g durante 6 minutos a 5°C. Se retiró el sobrenadante y 250 µL de cada muestra se transfirieron a una placa de ensayo de 96 pocillos donde se analizó el contenido de hemoglobina midiendo la absorbancia a 540 nm mediante un EnVision™ (PerkinElmer). Se preparó una adecuada dilución de la muestra con solución salina para asegurar que la absorbancia obtenida se encontrara dentro del rango dinámico lineal del instrumento. El experimento se realizó por triplicado.

La hemólisis se determinó como un porcentaje comparando la absorbancia de los sobrenadantes con la muestra de control totalmente hemolizada con agua destilada. La muestra de control de hemólisis total se preparó añadiendo 3600 µL de agua destilada a 400 µL de suspensión de eritrocitos agitando suavemente durante 3 segundos e incubando durante 30 minutos de la misma forma que se hizo con las muestras de compuesto. Después de la incubación y centrifugación la lectura de la absorbancia a 540 nm proporcionó el valor que representaba la hemólisis total de

referencia correspondiente al contenido total de hemoglobina en la suspensión de eritrocitos empleada en este ensayo.

El grado de hemólisis debido a la actividad de los compuestos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%H = [(Hb - Hb_0) / Hb_{tot}] \times 100$$

donde:

Hb: absorbancia de cada muestra

Hb₀: absorbancia de la hemólisis basal (control negativo)

Hb_{tot}: absorbancia total de sangre (control positivo)

5 RESULTADOS

ESQUEMA GENERAL DEL FLUJO DE TRABAJO DESARROLLADO EN LA TESIS

En base a los objetivos planteados en esta tesis, en la Figura 40 se presenta un esquema general del flujo de trabajo realizado, indicándose con números la secuencia temporal del mismo: 1) Ensayo de cribado de alto rendimiento frente a diana específica (LiaRS) de un grupo de extractos de la colección de PN de la Fundación MEDINA; 2) análisis de los extractos por LCMS y ensayo de marcaje de macromoléculas (*Labeling*); 3) Confirmación de activos; 4) caracterización de las cepas; 5) caracterización química de los extractos; 6) obtención de nuevas ramoplaninas; 7) caracterización biológica de las nuevas ramoplaninas.

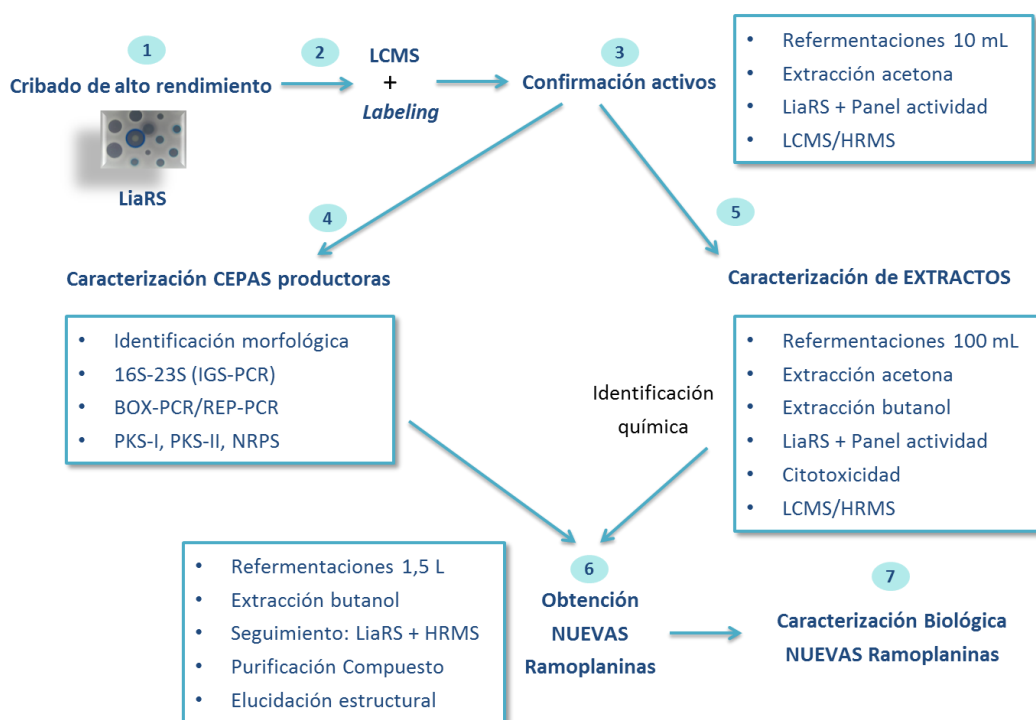


Figura 40. Esquema general de trabajo que se ha desarrollado a lo largo de la tesis, con la secuencia temporal indicada con números consecutivos.

Siguiendo este mismo esquema se desarrollan a continuación los resultados obtenidos.

5.1 PROCESO DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

5.1.1 ENSAYO “LiaRS”

El sistema de dos componentes LiaRS (del inglés “Lipid II cycle Interfering Antibiotic Sensor and response Regulator”) es uno de los diferentes sistemas que coordinan la respuesta genética a la acción de antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular. En concreto, responde específicamente a diversos antibióticos que interfieren con el lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, tales como la bacitracina, vancomicina y ramoplanina (Mascher *et al.*, 2004).

La proteína reguladora de la respuesta es LiaR, mientras que LiaS es la histidina quinasa sensora. Este sistema se codifica como una parte del operón *liaIH-liaGFSR*, y la activación de LiaR da lugar a la inducción del promotor *liaI* (P_{liaI}) que da como resultado no solo una fuerte regulación del operón *liaIH*, sino del locus *lia* completo (Figura 41).

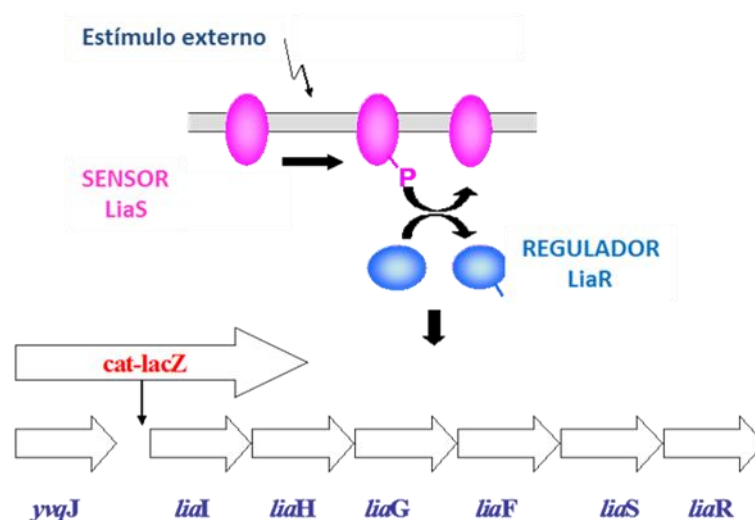


Figura 41. Esquema del sistema de dos componentes LiaRS y fundamento del ensayo en agar LiaRS.

A su vez, la expresión del operón *liaIH* es estrictamente dependiente de LiaR (Jordan *et al.*, 2006). John D. Helmann y colaboradores en la Universidad de Cornell (EEUU), analizaron en detalle la regulación y la expresión del operon *liaIHGFSR*, y determinaron que el promotor P_{liaI} podía usarse para construir fusiones cuantificables con genes reporteros como el *lacZ* (Figura 37) o el *lux* (luciferasa) y usarse como herramienta de cribado en la búsqueda de nuevos antibióticos. Este grupo de científicos publicó la fusión

del gen *lacZ* al promotor *lial* (P_{lial}) en dos cepas de *Bacillus subtilis* (HB0950 y HB0953) y nuestro laboratorio licenció a esta Universidad el uso de estas dos cepas (Cao *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Mascher *et al.*, 2004).

5.1.1.1 Validación del ensayo LiaRS

En la cepa *B. subtilis* HB0950 (MB5826, CU1065 SPb *P-lial74-cat-lacZ*) el gen *lacZ*, que produce la β -galactosidasa, está fusionado al promotor *lial* (P_{lial}) de tal manera que en presencia de un inductor del operón, la producción de β -galactosidasa puede ser detectada cuando se crece esta cepa en un medio que contiene Luria Agar y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). El X-gal es hidrolizado por la β -galactosidasa, a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, y éste último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto de color azul insoluble que se detecta en el medio (Figura 42).

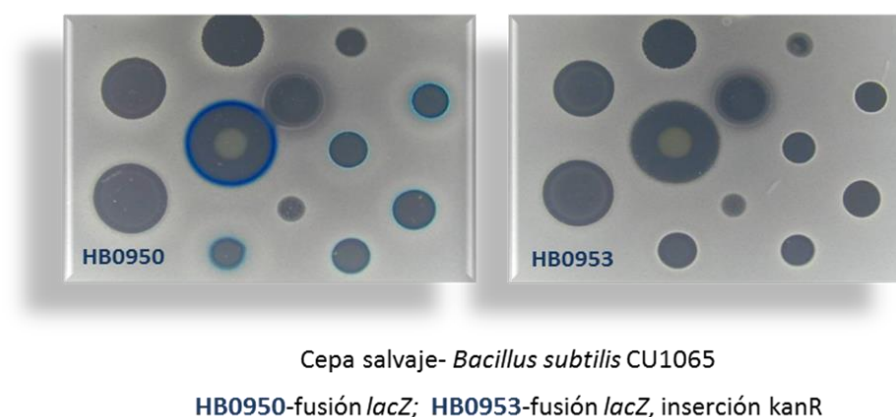


Figura 42. Cepas HB0950 y HB0953 crecidas en Luria agar y X-gal en las que se pueden observar los halos de inhibición y los anillos de color azul. Cepa salvaje: *Bacillus subtilis* CU1065; HB0950: fusión *lacZ*; HB0953: fusión *lacZ*, inserción *kanR*.

La segunda cepa, *B. subtilis* HB0953 (MB5827, CU1065 SPb *P-lial74-cat-lacZ liaR::kan*) además de tener la fusión del gen *lacZ*, es un mutante *knock-out* del gen *liaR* y tiene una inserción de resistencia a kanamicina en dicho gen, de manera que esta cepa también es capaz de sintetizar β -galactosidasa, pero no en respuesta a la inducción del operón *lialHGFSR*. Dado que la inducción del operón *lialH* requiere el funcionamiento del sistema de dos componentes LiaRS, la inserción del gen de resistencia a kanamicina imposibilita la producción de β -galactosidasa en el caso de verdaderos inductores del P_{lial} (Figura 42).

Se validó el ensayo con diferentes antibióticos y otros compuestos (Tabla 9). Se comprobó que la inducción de β -galactosidasa en la cepa HB0950 era mucho más intensa en presencia de bacitracina, ramoplanina y nisina (antibióticos que interfieren específicamente con el ciclo del transportador lipídico de la etapa II de la biosíntesis del peptidoglicano) que en el caso de la vancomicina.

Compuesto	Expresión <i>lial</i>	Respuesta en ensayo de difusión en agar
Kanamicina	no-inductor	negativa
Rifampicina	no-inductor	negativa
Tetraciclina	no-inductor	negativa
Cloramfenicol	no-inductor	negativa
Espectinomomicina	no-inductor	negativa
Estreptomomicina	no-inductor	negativa
SDS	no-inductor	negativa
Triton	no-inductor	negativa
DNP	no-inductor	negativa
Lisozima	no-inductor	negativa
Ampicilina	inductor	negativa
Bacitracina	inductor	positiva
Cefalosporina	inductor	negativa
D-cicloserina	inductor	negativa
Fosfomicina	inductor	positiva
Moenomicina	inductor	negativa
Nisina	inductor	positiva
Penicilina G	inductor	negativa
Polimixina B	inductor	negativa
Ramoplanina	inductor	positiva
Tunicamicina	inductor	positiva
Vancomicina	inductor	positiva

Tabla 9. Compuestos inductores y no inductores de la expresión de *lial* y su respuesta positiva o negativa en el ensayo de difusión de agar con la cepa *B. subtilis* HB0950.

Ni otros antibióticos que interfieren en otras etapas de la síntesis del peptidoglicano (β -lactámicos, moenomomicinas, fosfomicina, D-cicloserina), ni antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (cloranfenicol, kanamicina, espectinomomicina, estreptomomicina, tetraciclina), ni antibióticos que inhiben la síntesis de RNA (rifampicina) indujeron la producción de β -galactosidasa. Tampoco lo hicieron detergentes como SDS o Tritón ni desacopladores de la fosforilación oxidativa tales como DNP (2,4-dinitrofenol) o CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona). Fluoroquinolonas y cefalosporinas presentaron frente a la cepa HB0953 una leve respuesta azul. Sin embargo, bacitracina y ramoplanina mostraron una inequívoca respuesta negativa (no muestran la hidrólisis del X-gal) frente a la cepa HB0953. Este hecho puede utilizarse para diferenciar los verdaderos inductores,

que mostrarán una clara respuesta negativa frente a esta cepa mientras que los falsos inductores mostrarán respuesta azul. Por tanto, la producción de β -galactosidasa es considerada una respuesta específica a los compuestos que se unen o interfieren con el transportador lipídico Lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano (Mascher *et al.*, 2004).

5.1.2 CRIBADO PARA LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DEL LÍPIDO II

El grupo de muestras que formaron parte del cribado de alto rendimiento estaba formado por 37.000 extractos de la colección de la Fundación MEDINA procedentes de la fermentación de 6.353 cepas de actinomicetos y de 5.981 cepas de hongos, crecidas cada una de ellas en 3 medios de fermentación (Figura 43).

En la Figura 43 se puede constatar la diversidad de los orígenes geográficos de los que procedían tanto las cepas de actinomicetos como las de los hongos del grupo de extractos que se testó en el cribado.

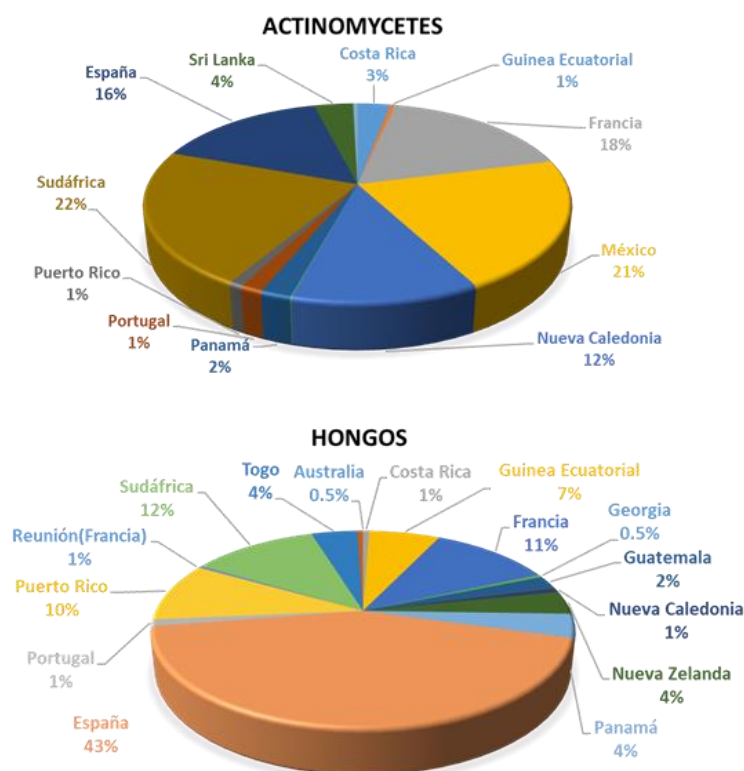


Figura 43. Diversidad de los orígenes geográficos de los que procedían las cepas de actinomicetos y hongos de los extractos ensayados en el cribado de alto rendimiento.

Inicialmente, se decidió ensayar dichos extractos frente a la cepa de *B. subtilis* HB0950 para seleccionar aquellos que inhibían el crecimiento de este microorganismo y que además presentaban anillo de color azul (hidrólisis de X-gal por la presencia de β -galactosidasa) ya que esto indicaba que eran inductores del promotor *lial* (P_{lial}). A continuación, los extractos que presentaron actividad positiva frente a dicha cepa se ensayaron frente a la cepa de *B. subtilis* HB0953, descartándose aquellos que también presentaban anillo de color azul, ya que esto indicaba que eran falsos inductores del operón. En ambos casos, se usaron como controles en cada placa de ensayo de agar tanto la vancomicina como la bacitracina.

De los 37.000 extractos de la colección que se probaron inicialmente frente a la cepa *B. subtilis* HB0950, se seleccionaron 270 extractos activos del grupo de los actinomicetos ya que causaban un halo de inhibición (medido en mm) rodeado por un anillo de color azul (hidrólisis de X-gal por la presencia de β -galactosidasa). Representan un 0,23% de ratio de descubrimiento (*hit rate*). La respuesta de color azul fue calificada del 1 al 3 según su intensidad. Los extractos que presentaron actividad positiva procedentes de las fermentaciones de hongos se tuvieron en cuenta para otro proyecto distinto al nuestro.

Para confirmar la especificidad de la actividad de los 270 extractos seleccionados, se ensayaron al mismo tiempo frente a las cepas *B. subtilis* HB0950 y *B. subtilis* HB0953. Como resultado, 25 de ellos fueron descartados dado que presentaron halo de inhibición rodeado por un anillo de color azul en ambas cepas, es decir eran falsos inductores del operón. De este modo, se consideran activos positivos del programa de cribado 245 extractos, representando un ratio de 0,2%.

5.2 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

Con el objetivo de descubrir nuevos compuestos relacionados en actividad biológica o estructura química con las ramoplaninas ya conocidas, las 245 muestras fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Al mismo tiempo que se confirmó su modo de acción mediante el ensayo secundario de marcaje de macromoléculas (*labeling*).

5.2.1 ENSAYO DE MARCAJE DE MACROMOLÉCULAS (*Labeling*)

Los ensayos de marcaje de macromoléculas monitorizan la inhibición de rutas claves como la replicación del ADN, la síntesis de ARN, la síntesis de proteínas, la síntesis de la pared celular (peptidoglicano) y la biosíntesis de ácidos grasos. En estos ensayos, los precursores marcados radiactivamente se acumulan en las células bacterianas y se incorporan específicamente en las diferentes macromoléculas. Puesto que los precursores libres son solubles en ácido tricloroacético (TCA) y las macromoléculas producidas por las células no lo son, las macromoléculas radiomarcadas pueden precipitarse selectivamente y separarse de los precursores libres no incorporados mediante filtración y luego cuantificarse por contaje de centelleo.

Tradicionalmente, estos ensayos se han usado para evaluar de modo preliminar los modos de acción (MoA) de compuestos seleccionados a partir de cribados de alto rendimiento o también según los casos, para verificar el MoA de compuestos análogos o derivados de algún antibiótico ya conocido. En nuestro caso, el ensayo de marcaje de macromoléculas se utilizó como ensayo secundario para confirmar la inhibición específica de la biosíntesis del peptidoglicano por parte de los extractos que presentaron actividad positiva en el ensayo de cribado de alto rendimiento. La totalidad de los 245 extractos seleccionados mostraron actividad específica inhibiendo por encima del 80% la síntesis del peptidoglicano.

La Figura 44 ilustra un ejemplo del ensayo de marcaje de macromoléculas de uno de los extractos que presentó actividad positiva en el cribado de alto rendimiento. Se representan curvas dosis-respuesta (CDR) de dilución $\frac{1}{2}$ frente a la inhibición de la síntesis de ADN y peptidoglicano en la cepa HB0950. Como se observa en el gráfico, esta muestra (F-178,252-C01-C01) es un inhibidor específico de la biosíntesis del peptidoglicano.

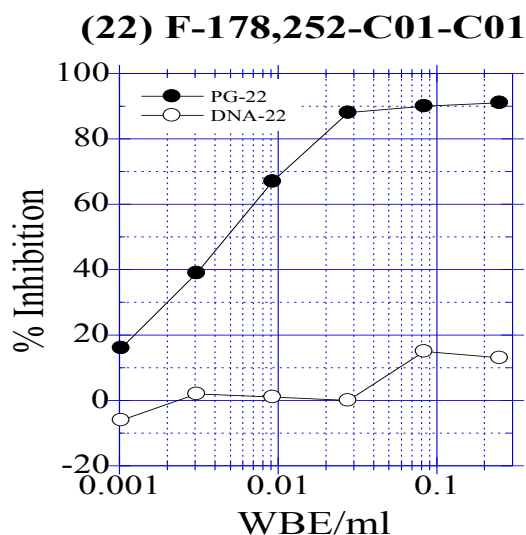


Figura 44. Ejemplo de una representación gráfica de las curvas dosis-respuesta de uno de los extractos seleccionados del cribado y que inhibe por encima del 80 % la biosíntesis del peptidoglicano.

5.2.2 DESREPLICACIÓN MEDIANTE LC-MS

Los extractos se analizaron mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (en inglés LC-MS). Los perfiles de masas obtenidos se compararon con los perfiles de metabolitos secundarios archivados en una base de datos propia de la Fundación MEDINA, denominada *GOLD*, que contiene información de alrededor de 1000 moléculas, y que ha sido generada en las mismas condiciones cromatográficas que los extractos fueron analizados. En concreto, con una aplicación informática (desarrollada en la Fundación MEDINA) se comparan mediante algoritmos los valores de UV, tiempo de retención y espectros de masas POS y NEG de los extractos con los de LC-UV-MS de los metabolitos secundarios conocidos y almacenados en la base de datos de la Fundación.

De los 245 extractos analizados con esta técnica por baja resolución, 71 de ellos presentaron perfiles que sugirieron la presencia de compuestos relacionados con la clase estructural de las ramoplaninas, tales como la ramoplanosa, la ramoplanina A2, y las enduracidinas A y B.

Ya que el objetivo principal del presente trabajo consiste en el descubrimiento de compuestos relacionados en actividad biológica o estructura química con las ramoplaninas, se seleccionaron estos 71 extractos para su posterior estudio ya que

cumplían tanto los criterios de actividad biológica en el ensayo de agar específico LiaRS e inhibición del peptidoglicano en el ensayo de marcaje de macromoléculas, como el criterio de perfil químico relacionado con los compuestos de nuestro interés.

Por otro lado, los 71 extractos seleccionados procedían de la fermentación en diferentes medios de un total de 49 cepas de actinomicetos. Así mismo, se seleccionaron dichas cepas para su caracterización y estudio.

5.3 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

5.3.1 ORIGEN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Las 49 cepas de actinomicetos seleccionadas por la actividad que presentaron durante el cribado de alto rendimiento procedían de muestras recogidas en países de diferentes zonas geográficas: Asia, América Central, América del Sur, Europa, Oceanía y África (Figura 41).

En su totalidad eran muestras de diferentes tipos de suelo, incluyendo suelos agrícolas, de cauces de ríos, de lagos, estanques, manglares, de dunas, de bosques tropicales y sempervirentes, de suelo de sabana y también de rizosfera (Figura 45).



Figura 45. Diversidad de los orígenes geográficos de los que procedían las 49 cepas de actinomicetos seleccionadas por su actividad en el cribado de alto rendimiento.

En concreto, 14 de las cepas (29%) procedían de suelos de dunas, rizosferas y de vegetales asociados recogidos en Sudáfrica. De suelos de México recogidos de estanques, lagos y tierras agrícolas provenían 13 cepas (27%), y otras 12 (24%) de manglares de Sri Lanka. Además, 4 cepas (8%) eran originarias de suelos de sabana y bosque sempervirente de Nueva Caledonia, 3 cepas (6%) de suelos de bosque lluvioso de la Guayana Francesa, 2 cepas (4%) de suelos agrícolas de Costa Rica y 1 de las cepas procedía de la muestra de un suelo recogida del cauce de un río en España (Figura 46).

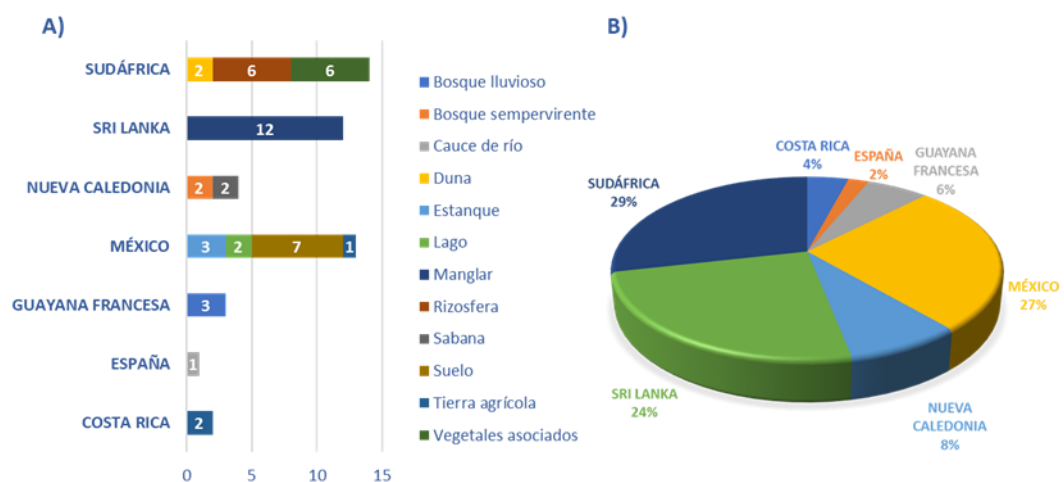


Figura 46. A) Origen por países de los diferentes tipos de suelos de los que se aislaron las cepas seleccionadas. **B)** Porcentajes del número de cepas procedentes de cada país.

5.3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

En una primera aproximación, los cultivos aislados se clasificaron en base a la morfología que presentaban teniendo en cuenta tanto aspectos macroscópicos de forma, tamaño y color de las colonias, como características microscópicas relacionadas con el tipo de esporulación y forma de las cadenas de las esporas.

En base a las características morfológicas, los cultivos aislados se pudieron clasificar de forma preliminar en cinco grupos taxonómicos diferentes más un número de cepas que no pudo asignarse a ningún grupo por no mostrar ningún rasgo morfológico característico, ni macroscópico ni microscópico. Este último grupo de *no identificados* (35 cepas) resultó ser el más abundante entre las cepas seleccionadas (Tabla 10).

Dentro de la familia *Micromonosporaceae* y *Streptomycetaceae* pudieron clasificarse 5 y 4 de los cultivos aislados respectivamente, al igual que 3 cepas de la familia *Nocardiaceae* y otras 2 de la familia *Pseudonocardiaceae*.

TAXONOMÍA INICIAL	PAÍS DE ORIGEN							TOTAL
	Costa Rica	Guayana Francesa	México	Nueva Caledonia	Sudáfrica	España	Sri Lanka	
<i>Micromonosporaceae</i>		1	1	3				5
<i>Nocardiaceae</i>				1	1		1	3
No identificado		2	9		13		11	35
<i>Pseudonocardiaceae</i>	2							2
<i>Streptomycetaceae</i>			3			1		4
TOTAL	2	3	13	4	14	1	12	49

Tabla 10. Distribución de las cepas aisladas procedentes de cada país según la taxonomía inicial establecida en base a la macro y micromorfología de los cultivos.

La mayor parte de las cepas agrupadas como *no identificados* procedían de Sudáfrica (13) y Sri Lanka (11), las 2 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* procedían de Costa Rica y en cuanto a las 3 cepas de la familia *Nocardiaceae* cada una de ellas tenía un origen distinto: Nueva Caledonia, Sudáfrica y Sri Lanka.

Las cepas de la familia *Streptomycetaceae* (4) eran en su mayoría de México, excepto una que procedía de España. Y las de la familia *Micromonosporaceae* (5) procedían en su mayoría de Nueva Caledonia (3), México y Guayana Francesa.

En el Anexo 1 pueden verse las fotografías de las 49 cepas crecidas en placas de Petri con medio YME preparadas para su caracterización morfológica macroscópica.

5.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS

5.4.1 FERMENTACIONES A PEQUEÑA ESCALA

Con el fin de obtener mayor cantidad de material para continuar el estudio de los activos seleccionados, se decidió fermentar a pequeña escala: 10 mL en viales EPA, las 49 cepas de actinomicetos en las condiciones y medios de fermentación correspondientes a los 71 extractos seleccionados con el cribado.

Sin embargo, de los 49 cultivos de actinomicetos crecidos en medio líquido de ATCC pudimos preparar extractos a partir de 38 de ellos (debido a que algunos de los cultivos no crecieron lo suficiente en el medio en que se habían sembrado), generando en realidad un total de 55 extractos.

En la Figura 47 se representan los 7 medios de cultivo (cuya composición fue descrita en el apartado de Materiales y Métodos) que se utilizaron frente al número de cepas que se sembraron por cada uno de ellos.

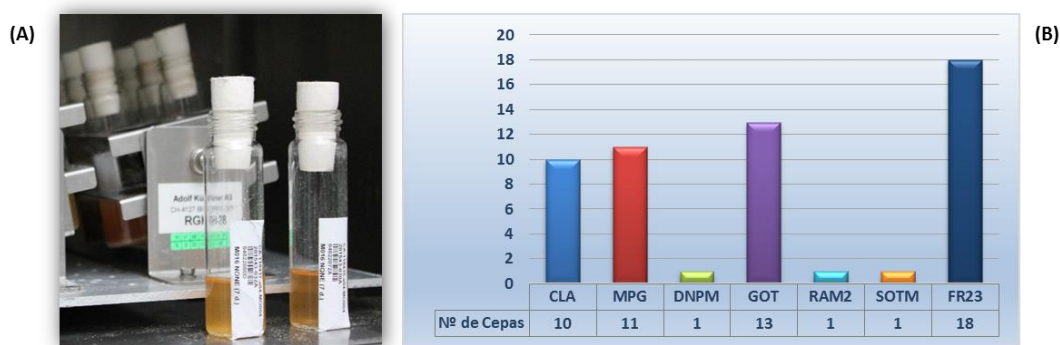


Figura 47. (A) Fotografía de viales EPA en los que se ha realizado la fermentación a pequeña escala. **(B)** Medios de fermentación utilizados por número de cepas que generan un total de 55 extractos de los 71 que habían sido seleccionados en el cribado de alto rendimiento.

Como se puede observar en la gráfica los medios mayoritarios utilizados fueron FR23 en 18 cepas y GOT en 13, seguidos de MPG en 11 cepas y CLA en 10. Cabe destacar que 13 de las cepas fueron fermentadas en dos medios diferentes, otras 2 en tres medios diferentes y el resto de las cepas (23) en un solo medio, lo que genera el número total de 55 extractos. Todas las cepas crecidas en los medios FR23, CLA, RAM2 y SOTM junto con

12 cepas crecidas en GOT y 8 crecidas en MPG se incubaron durante 13 días a 28 °C, mientras que 1 de las cepas crecidas en GOT y 3 de las crecidas en MPG se incubaron durante 7 días a la misma temperatura.

5.4.1.1 Extracción con acetona

Después de los 7 o 13 días de incubación, se prepararon las muestras para su ensayo mediante un protocolo general de extracción total con acetona. Con este disolvente orgánico se pretende enriquecer los extractos con el mayor número posible de metabolitos secundarios producidos durante la fermentación. A cada extracto se le asignó el número "CA" (CA: colección de actinos) correspondiente a la cepa de la que procedía y un número "C" relativo al medio en el que se había crecido el aislado correspondiente. Se prepararon un total de 55 extractos a una concentración final de 2X WBE.

5.4.1.2 Confirmación de la actividad biológica en el ensayo LiaRS

El 76,4 % de las muestras ensayadas confirmaron la actividad en el ensayo LiaRS. Es decir, 42 extractos mostraron un halo de inhibición (medido en mm) rodeado por un anillo de color azul (hidrólisis de X-Gal por la presencia de β -galactosidasa) en la cepa HB0950, y halo de inhibición sin anillo de color azul en la cepa HB0953. La respuesta de color azul fue calificada del 1 al 3 según su intensidad. Sin embargo, 13 de los 55 extractos no repitieron la actividad, porque no mostraron halo de inhibición en ninguna de las cepas o si lo mostraban era un halo muy turbio y además, no exhibían anillo de color azul frente a la cepa HB0950. Los datos de inhibición y de intensidad de respuesta azul para cada uno de los 55 extractos se recogen en la Tabla 11.

CEPA	EXTRACTO	MEDIO	DIAS	TEMP	Ensayo LiARS	
					HB950	HB953
					(mm) Q (#)	(mm) Q (#)
CA-117,410	CA-117,410-C01-C01	CLA	13	28	7 E	7 E(0)
CA-144,426	CA-144,426-C03-C01	GOT	13	28	14 A(3)	14 A(0)
CA-146,703	CA-146,703-C02-C01	GOT	7	28	9 A(3)	11 A(0)
	CA-146,703-C03-C01	MPG	7	28	13 A(3)	15 A(0)
CA-149,663	CA-149,663-C01-C01	CLA	13	28	16 A(3)	17 A(0)
	CA-149,663-C02-C01	GOT	13	28	17 A(3)	17 A(0)
	CA-149,663-C03-C01	MPG	13	28	11 A(3)	11 A(0)
CA-151,217	CA-151,217-C02-C01	GOT	13	28	27 E(0)	26 E(0)
CA-151,222	CA-151,222-C01-C01	FR23	13	28	16 A(3)	18 A(0)
	CA-151,222-C02-C01	GOT	13	28	16 A(3)	15 A(0)
CA-152,578	CA-152,578-C01-C01	DNPM	7	28	0	0
CA-161,197	CA-161,197-C01-C01	GOT	13	28	27 E(0)	0
	CA-161,197-C03-C01	RAM2	13	28	0	0
CA-161,233	CA-161,233-C01-C01	GOT	13	28	14 A(3)	16 A(0)
CA-162,175	CA-162,175-C03-C01	MPG	13	28	15 A(3)	16 A(0)
CA-168,651	CA-168,651-C02-C01	GOT	13	28	16 A(3)	18 A(0)
	CA-168,651-C03-C01	MPG	13	28	15 A(3)	15 A(0)
CA-169,254	CA-169,254-C02-C01	GOT	13	28	16 A(3)	17 A(0)
	CA-169,254-C03-C01	MPG	13	28	11 A(3)	11 A(0)
CA-169,257	CA-169,257-C02-C01	GOT	13	28	12 A(3)	13 A(0)
	CA-169,257-C03-C01	MPG	13	28	13 A(3)	13 A(0)
CA-169,627	CA-169,627-C01-C01	FR23	13	28	14 C(2)	13 C(0)
CA-170,297	CA-170,297-C02-C01	GOT	13	28	12 A(0)	11 A(0)
CA-170,386	CA-170,386-C01-C01	FR23	13	28	13 A(3)	13 A(0)
	CA-170,386-C02-C01	GOT	13	28	17 A(3)	19 A(0)
	CA-170,386-C03-C01	MPG	13	28	14 A(3)	16 A(0)
CA-171,509	CA-171,509-C01-C01	FR23	13	28	12 A(3)	13 A(0)
	CA-171,509-C02-C01	GOT	13	28	11 C(2)	11 C(0)
CA-175,357	CA-175,357-C03-C01	SOTM	13	28	13 A(0)	13 A(0)
CA-175,917	CA-175,917-C02-C01	FR23	13	28	0	0
CA-177,328	CA-177,328-C02-C01	MPG	7	28	17 A(3)	20 A(0)
CA-177,430	CA-177,430-C02-C01	MPG	7	28	19 A(3)	21 A(0)
CA-177,720	CA-177,720-C01-C01	CLA	13	28	12 A(3)	13 A(0)
	CA-177,720-C02-C01	FR23	13	28	14 A(3)	13 A(0)
CA-177,770	CA-177,770-C01-C01	CLA	13	28	14 A(3)	16 A(0)
	CA-177,770-C02-C01	FR23	13	28	14 A(2)	14 A(0)
CA-177,777	CA-177,777-C02-C01	FR23	13	28	14 A(3)	14 A(0)
CA-178,247	CA-178,247-C02-C01	FR23	13	28	6 E(0)	6 E(0)
CA-178,252	CA-178,252-C01-C01	CLA	13	28	12 A(2)	13 A(0)
CA-178,253	CA-178,253-C01-C01	CLA	13	28	14 E(0)	0
CA-178,645	CA-178,645-C01-C01	CLA	13	28	13 A(3)	14 A(0)
	CA-178,645-C02-C01	FR23	13	28	13 A(3)	14 A(0)
CA-178,647	CA-178,647-C01-C01	CLA	13	28	13 A(3)	15 A(0)
	CA-178,647-C02-C01	FR23	13	28	16 A(3)	17 A(0)
CA-179,400	CA-179,400-C01-C01	CLA	13	28	10 A(3)	11 A(0)
CA-179,413	CA-179,413-C01-C01	CLA	13	28	18 A(3)	19 A(0)
	CA-179,413-C02-C01	FR23	13	28	15 A(3)	16 A(0)
CA-179,454	CA-179,454-C02-C01	FR23	13	28	13 A(3)	13 A(0)
CA-182,202	CA-182,202-C03-C01	MPG	13	28	11 A(0)	11 A(0)
CA-182,239	CA-182,239-C01-C01	FR23	13	28	12 A(2)	12 A(0)
CA-182,241	CA-182,241-C01-C01	FR23	13	28	13 A(3)	13 A(0)
	CA-182,241-C03-C01	MPG	13	28	11 A(3)	13 A(0)
CA-188,416	CA-188,416-C01-C01	FR23	13	28	9 C(0)	9 C(0)
CA-188,417	CA-188,417-C01-C01	FR23	13	28	14 A(3)	14 A(0)
CA-188,442	CA-188,442-C01-C01	FR23	13	28	9 C(0)	9 A(0)

(mm): Halo de inhibición en milímetros

Q: calificador del halo (A: claro; C: turbio; E: muy turbio)

#: intensidad de color azul (0: sin color; 1: débil ; 2: intenso; 3: muy intenso)

Tabla 11. Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar LiARS (con ambas cepas HB0950 y HB0953) de los 55 extractos preparados a partir de fermentaciones de pequeña escala.

5.4.1.3 Perfil de actividad antimicrobiano

Para caracterizar el perfil de actividad antimicrobiano de los 55 extractos y seleccionar solo aquellos que fueran similares a la ramoplanina (es decir aquellos que presentaran propiedades inhibitorias principalmente frente a bacterias Gram-positivas) se ensayaron frente a un panel de microorganismos formado por tres bacterias Gram-positivas (*SASM*, *SARM* y *E. faecalis*), tres bacterias Gram-negativas (*H. influenzae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), una levadura (*C. albicans*) y un hongo (*A. fumigatus*). Para ello se prepararon curvas dosis-respuesta de cada una de las 55 muestras con 7 concentraciones de diluciones $\frac{1}{2}$.

En la Tabla 12 se muestran los resultados de CMI obtenidos para cada extracto y para cada patógeno frente a los patógenos testados. Se ha utilizado una escala de color azul para representar los datos, de tal manera que el color azul más oscuro representa el valor de concentración inhibitoria más bajo en la curva (0,001875 WBE/mL) y el color azul claro representa la concentración inhibitoria más alta (0,06 WBE/mL).

Como puede observarse, la mayoría de los extractos presentaron actividad frente al grupo de bacterias Gram-positivas (*S. aureus* tanto sensible como resistente a meticilina y *E. faecalis*), y los valores de sus CMIs variaron en un rango de 0,06 a 0,0075 WBE/mL en la mayor parte de los casos, destacando algunos extractos en los que se detectaron valores inferiores a 0,00375 WBE/mL incluso alguno con valores por debajo de 0,001875 WBE/mL. Contrariamente ningún extracto, a la máxima concentración ensayada, mostró actividad frente a bacterias Gram-negativas (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) ni frente a *C. albicans* ni *A. fumigatus*, de manera que sus valores de CMIs para estos patógenos estaría por encima del primer punto de dilución (>0,06 WBE/mL).

Estos resultados nos confirmaban que la mayor parte de los extractos seleccionados tenían un perfil de actividad antimicrobiana similar al de las ramoplaninas.

CEPA	EXTRACTO	Bacterias gram-positivas			Bacterias gram-negativas			Levadura	Hongo
		MSSA	MRSA	E. faecalis	H. influenzae	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans	A. fumigatus
CA-117,410	CA-117,410-C01-C01								
CA-144,426	CA-144,426-C03-C01								
CA-146,703	CA-146,703-C02-C01								
	CA-146,703-C03-C01								
CA-149,663	CA-149,663-C01-C01								
	CA-149,663-C02-C01								
CA-151,217	CA-151,217-C02-C01								
	CA-151,222-C01-C01								
CA-151,222	CA-151,222-C02-C01								
	CA-152,578-C01-C01								
CA-161,197	CA-161,197-C01-C01								
	CA-161,197-C03-C01								
CA-161,233	CA-161,233-C01-C01								
CA-162,175	CA-162,175-C03-C01								
CA-168,651	CA-168,651-C02-C01								
	CA-168,651-C03-C01								
CA-169,254	CA-169,254-C02-C01								
	CA-169,254-C03-C01								
CA-169,257	CA-169,257-C02-C01								
	CA-169,257-C03-C01								
CA-169,627	CA-169,627-C01-C01								
CA-170,297	CA-170,297-C02-C01								
CA-170,386	CA-170,386-C01-C01								
	CA-170,386-C02-C01								
	CA-170,386-C03-C01								
CA-171,509	CA-171,509-C01-C01								
	CA-171,509-C02-C01								
CA-175,357	CA-175,357-C03-C01								
CA-175,917	CA-175,917-C02-C01								
CA-177,328	CA-177,328-C02-C01								
CA-177,430	CA-177,430-C02-C01								
CA-177,720	CA-177,720-C01-C01								
	CA-177,720-C02-C01								
CA-177,770	CA-177,770-C01-C01								
	CA-177,770-C02-C01								
CA-177,777	CA-177,777-C02-C01								
CA-178,247	CA-178,247-C02-C01								
CA-178,252	CA-178,252-C01-C01								
CA-178,253	CA-178,253-C01-C01								
CA-178,645	CA-178,645-C01-C01								
	CA-178,645-C02-C01								
CA-178,647	CA-178,647-C01-C01								
	CA-178,647-C02-C01								
CA-179,400	CA-179,400-C01-C01								
CA-179,413	CA-179,413-C01-C01								
	CA-179,413-C02-C01								
CA-179,454	CA-179,454-C02-C01								
CA-182,202	CA-182,202-C03-C01								
CA-182,239	CA-182,239-C01-C01								
CA-182,241	CA-182,241-C01-C01								
	CA-182,241-C03-C01								
CA-188,416	CA-188,416-C01-C01								
CA-188,417	CA-188,417-C01-C01								
CA-188,442	CA-188,442-C01-C01								

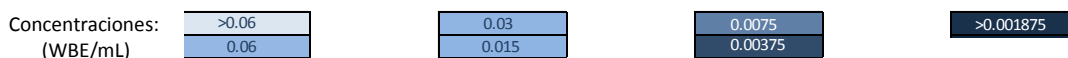


Tabla 12. Perfil de actividad antimicrobiano de los 55 extractos preparados a partir de fermentaciones de pequeña escala. Valores de CMI's representados en escala de color azul. (MRSA: del inglés Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; MSA: del inglés Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*)

5.4.1.4 Perfil químico (LCMS/HRMS)

Los 55 extractos generados a partir de las fermentaciones de pequeña escala volvieron a ser analizados por cromatografía líquida y espectrometría de masas. Sus perfiles de masas se compararon de nuevo con los perfiles de la ramoplanina A2, ramoplanosa y enduracidinas A y B, almacenados en la base de datos *GOLD* contrastando sus valores de DAD, tiempo de retención y espectros de masas POS y NEG de baja resolución.

Adicionalmente, los perfiles de espectrometría de masas de alta resolución de cada extracto se evaluaron y escanearon en busca de iones individuales correspondientes a las especies doblemente cargadas de ramoplanina A1, A2 y A3, observándose en algunos extractos la presencia de dichos compuestos, así como versiones glicosiladas de los mismos. Además, también se identificaron algunos compuestos análogos de ramoplanina que correspondían a versiones reducidas (+4H y +O,4H) y presumiblemente con modificaciones en la cadena lateral hidrofóbica de N-acilo. Hecho que nos hacía intuir la posibilidad de poder aislar nuevas moléculas de la familia de la ramoplanina.

Por otro lado, se pudo confirmar que los 13 extractos que no habían presentado actividad en el ensayo de agar LiaRS, presentaban perfiles con poca cantidad relativa en los compuestos de nuestro interés.

En definitiva, todos los extractos mostraron firmas de espectrometría de masas que confirmaron la presencia de compuestos relacionados con la familia estructural de ramoplanina y dentro de ellos nuevos compuestos análogos.

Un ejemplo se presenta en la Figura 48. El perfil de HPLC medido por detección por absorción UV-visible a 210 nm de uno de los extractos (F-178,252-C01-C01) estudiados se muestra en la Figura 48A₁, donde se indica el tiempo de retención característico de ramoplanosa. Se observa la aparición de un pico con este tiempo de retención, cuyo espectro UV-visible se muestra en la Figura 48B. Dicho espectro es consistente con el estándar de ramoplanina (datos no mostrados). La Figura 48A₂ detalla el perfil cromatográfico del mismo extracto para los iones positivos, a su vez, se observa también el tiempo de retención característico de ramoplanosa.

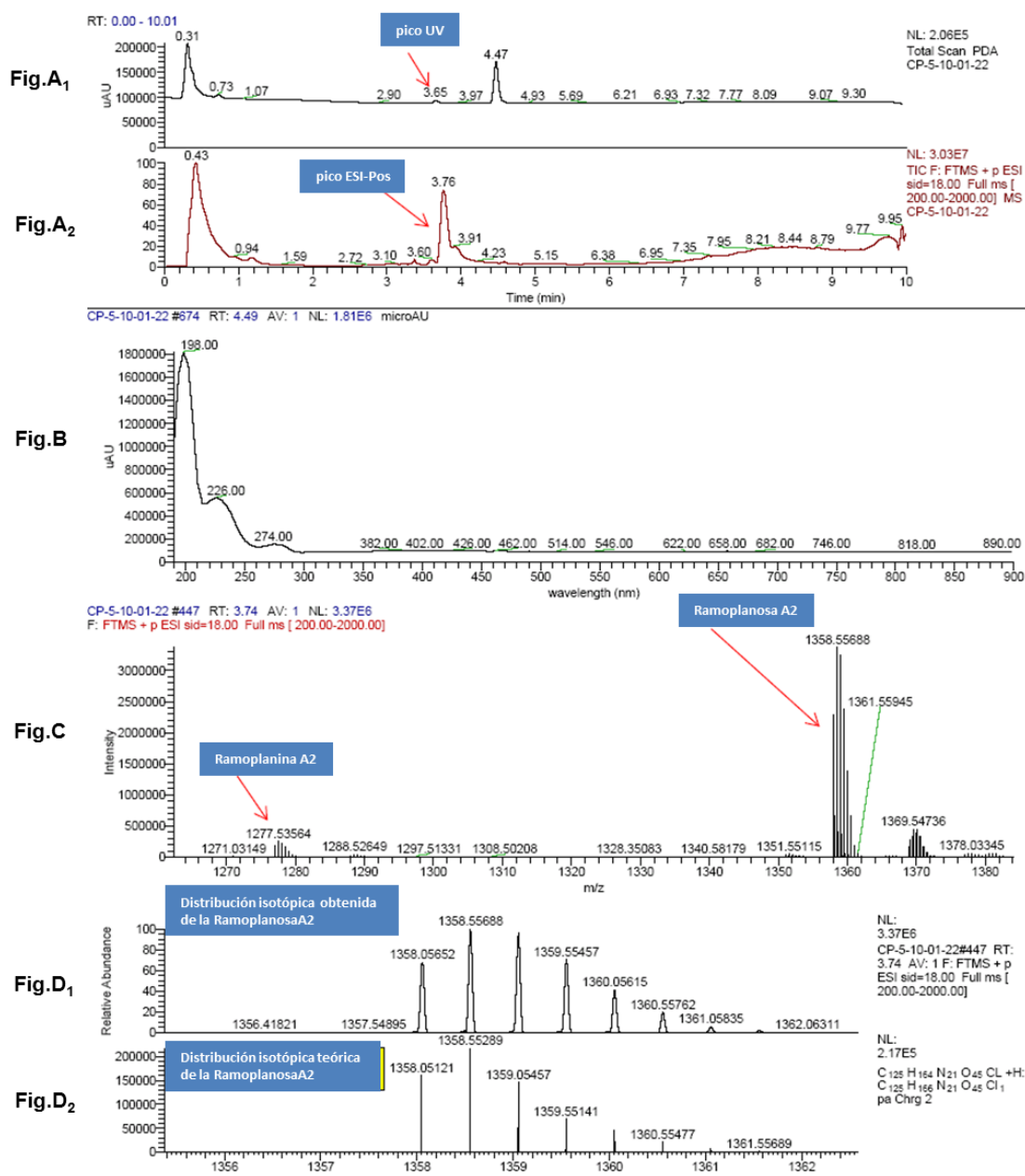


Figura 48. Ejemplo del perfil de LCMS/HRMS de uno de los extractos analizados que se emparejó con Ramoplanina A2 y Ramoplanosa. **Fig.A₁**: traza UV-visible; **Fig.A₂**: TIC (cromatograma de iones totales); **Fig.B**: espectros UV-visible a 4.49 min; **Fig.C**: espectros de masas a 3.74 min. del ion positivo FTMS; **Fig.D₁**: espectros de masas a 3.74 min. **Fig.D₂**: distribución teórica isotópica de Ramoplanosa A2.

El espectro de masas de iones positivos al tiempo de retención correspondiente se muestra en la Figura 48C. La Figura 48D₁ muestra la distribución isotópica obtenida del extracto para la masa de 1358.5568, y la Figura 48D₂ la distribución isotópica teórica de

la ramoplanosa. Comparando la distribución isotópica observada en el extracto con la teórica y en base a las características del espectro de masas, podemos concluir la presencia inequívoca en dicho extracto de ramoplanosa.

Los resultados obtenidos hasta este momento con las muestras procedentes de las fermentaciones de pequeña escala confirmaron que dichos extractos presentaban un perfil de actividad antibacteriano y un perfil químico compatible con compuestos relacionados estructuralmente con las ramoplaninas, aunque no todos ellos repitieran la actividad en el ensayo LiaRS. Este hecho podría deberse a que los compuestos de interés en estas nuevas fermentaciones, realizada en viales EPA, se hubieran generado en menor cantidad que en la original.

5.4.2 REFERMENTACIONES A MEDIA ESCALA

Con el fin de obtener el material suficiente para la identificación química de los compuestos, se realizaron fermentaciones a mayor volumen (100 mL) en matraces de 500 mL con las 38 cepas correspondientes a los 55 extractos confirmados en la etapa anterior. Esta vez además se volvieron a sembrar las 11 cepas que no habían crecido en el formato de pequeña escala. En esta ocasión los 49 cultivos de actinomicetos crecidos en medio líquido de ATCC crecieron sin problemas y pudimos preparar extractos a partir de ellos, generando un total de 71 extractos correspondientes a todas las condiciones inicialmente detectadas como positivas en el cribado de alto rendimiento.

En la Figura 49 se representan los 7 medios de cultivo que se utilizaron frente al número de cepas que se sembraron por cada uno de ellos.

Como se puede observar en la gráfica los medios mayoritarios utilizados fueron FR23 en 24 cepas y GOT en 19, seguidos de CLA en 13 cepas y MPG en 12. Cabe destacar que 15 de las cepas fueron fermentadas en dos medios diferentes, otras 4 en tres medios diferentes y el resto de las cepas (30) en un solo medio, lo que genera el número total de 71 extractos

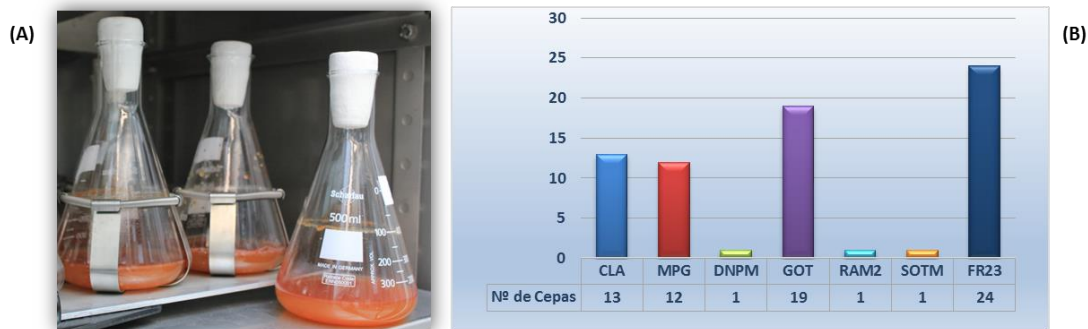


Figura 49. (A) Fotografía de un ejemplo de fermentación a media escala. **(B)** Medios de fermentación utilizados por número de cepas que generan el total de los 71 extractos seleccionados.

Todas las cepas crecidas en los medios FR23, CLA, RAM2 y SOTM junto con las 17 cepas crecidas en GOT y las 8 crecidas en MPG se incubaron durante 13 días a 28 °C, mientras que 2 de las cepas crecidas en GOT y las 4 crecidas en MPG se incubaron durante 7 días a la misma temperatura, 28 °C.

5.4.2.1 Extracción con acetona

Pasados los días de incubación correspondientes, en esta ocasión se decidió no extraer el volumen total de las nuevas fermentaciones (100 mL) con acetona (disolvente habitual utilizado en la generación de la colección de extractos de la Fundación MEDINA), sino hacer una prueba inicial con alícuotas de 10 mL. El resto del volumen se reservó para hacer otro tipo de extracción diferente en caso necesario. Esta decisión fue tomada en base a que los resultados obtenidos en la etapa anterior no fueron los esperados, dado que 13 de los extractos procedentes de fermentaciones de pequeña escala, no presentaron actividad en el ensayo LiaRS y su contenido en los compuestos de interés era muy bajo.

A cada extracto se le asignó el número "CA" (CA: colección de actinos) correspondiente a la cepa de la que procedía y un número "MO" relativo al medio en el que se había crecido el aislado correspondiente.

Se prepararon así un total de 71 extractos a una concentración final de 2X WBE.

5.4.2.2 Actividad biológica de los extractos de acetona en el ensayo LiaRS

Alrededor del 83 % de las muestras ensayadas confirmaron la actividad en el ensayo LiaRS. Es decir, 59 extractos de acetona mostraron un halo de inhibición (medido en mm) rodeado por un anillo de color azul en la cepa HB0950, y halo de inhibición sin anillo de color azul en la cepa HB0953. Sin embargo, 12 de los 71 extractos no repitieron la actividad, bien porque no mostraron halo de inhibición o bien porque, aunque presentaban halo de inhibición no exhibían anillo de color azul. Estos datos de inhibición y de intensidad de respuesta azul para cada uno de los 71 extractos se recogen en la Tabla 13.

5.4.2.3 Estudio de los extractos de acetona por metabolómica

Del análisis por LCMS de los 71 extractos de acetona se obtuvo una matriz de datos con la que se pretendía comparar la intensidad de los valores de m/z en el rango del m/z de las ramoplaninas (1260-1300) de los extractos entre sí, para evaluar la similitud o diferencia en su contenido en moléculas relacionadas con la familia de antibióticos que nos ocupa.

Sin embargo, el estudio no pudo realizarse debido a que las intensidades obtenidas en ese rango de m/z eran muy bajas para la mayoría de las muestras. Este hecho nos mostraba que la cantidad de los metabolitos extraídos era muy baja, por lo que resultó necesario utilizar una extracción más específica para ellos.

5.4.2.4 Extracción con butanol

Con el fin de extraer la mayor cantidad posible de compuestos relacionados con las ramoplaninas, y basándonos principalmente en el trabajo de purificación y aislamiento de la ramoplanina A2 publicado por Bruno Cavalleri en 1984 (Cavalleri *et al.*, 1984), diseñamos un procedimiento de extracción en el que se realizó una partición líquido/líquido primero con acetato de etilo y posteriormente otra con n-butanol, ajustando el pH a 3,5 en cada paso (Figura 50).

A partir de segundas alícuotas de 10 mL procedentes de las fermentaciones a media escala (100 mL), se prepararon 71 nuevos extractos a una concentración final de 8X WBE, siguiendo el procedimiento de extracción descrito en detalle en el capítulo de Materiales y Métodos.

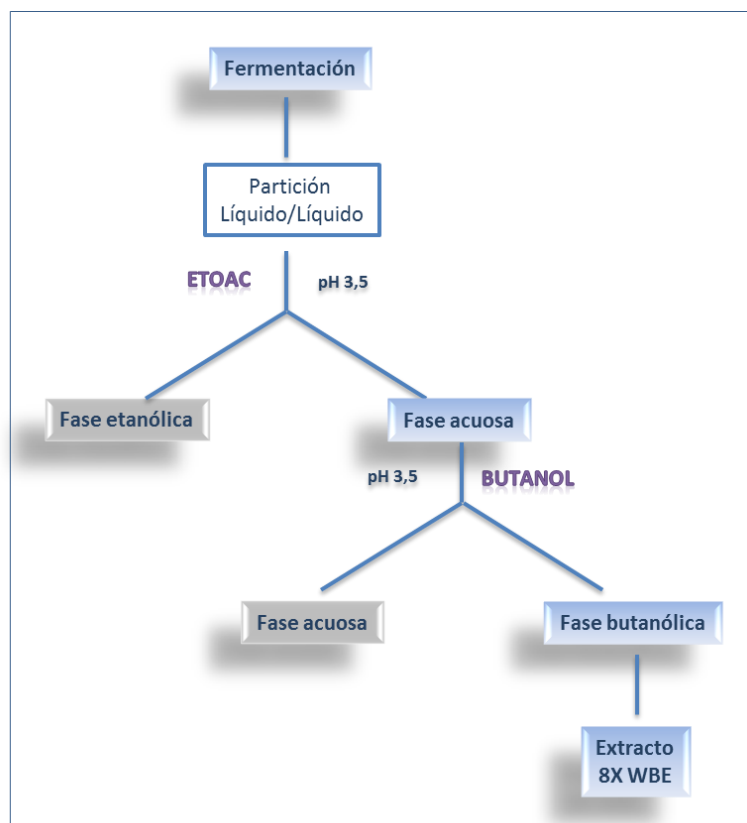


Figura 50. Extracción realizada a partir de una partición líquido/líquido con acetato de etilo y posterior extracción con butanol, manteniendo el pH a 3,5.

5.4.2.5 Actividad biológica de los extractos de butanol en el ensayo LiaRS

Alrededor del 97 % de los extractos de butanol ensayados confirmaron la actividad en el ensayo LiaRS. Es decir, 69 extractos de butanol mostraron un halo de inhibición (medido en mm) rodeado por un anillo de color azul en la cepa HB0950, y halo de inhibición sin anillo de color azul en la cepa HB0953. Sin embargo, 2 de los 71 extractos no repitieron la actividad, ya que ni mostraron halo de inhibición ni exhibían anillo de color azul. Estos datos de inhibición y de intensidad de respuesta azul para cada uno de los 71 extractos se recogen en la Tabla 13.

CEPA	EXTRACTO	MEDIO	DIAS	TEMP	EXTRACCIÓN CON ACETONA		EXTRACCIÓN CON BUTANOL	
					Ensayo LiaRS		Ensayo LiaRS	
					HB950 (mm) Q (#)	HB953 (mm) Q (#)	HB950 (mm) Q (#)	HB953 (mm) Q (#)
CA-117398	CA-117398-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	9 A(3)	9 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-117410	CA-117410-a01-MO008-EC03	CLA	13	28	12 A(3)	12 A(0)	13 A(3)	13 A(0)
CA-142982	CA-142982-a01-MO012-EC03	CLA	13	28	11 A(3)	11 A(0)	12 A(3)	11 A(0)
CA-142982	CA-142982-a01-MO013-EC03	FR23	13	28	14 A(3)	14 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-143677	CA-143677-a01-MO008-EC03	GOT	13	28	15 A(3)	15 A(0)	14 A(3)	14 A(0)
CA-144426	CA-144426-a01-MO008-EC03	GOT	13	28	11 A(3)	11 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-146703	CA-146703-a01-MO021-EC03	GOT	7	28	11 A(3)	11 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-146703	CA-146703-a01-MO022-EC03	MPG	7	28	12 A(2)	12 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-149663	CA-149663-a01-MO038-EC03	CLA	13	28	11 A(2)	11 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-149663	CA-149663-a01-MO039-EC03	GOT	13	28	11 A(3)	11 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-149663	CA-149663-a01-MO040-EC03	MPG	13	28	0	0	6 A(2)	6 A(0)
CA-151217	CA-151217-a01-MO007-EC03	GOT	13	28	7 E(0)	0	7 E(0)	7 E(0)
CA-151222	CA-151222-a01-MO016-EC03	FR23	13	28	10 A(2)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-151222	CA-151222-a01-MO017-EC03	GOT	13	28	11 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-152578	CA-152578-a01-MO013-EC03	DNPM	7	28	5 A(1)	6 A(0)	6 A(2)	6 A(0)
CA-161197	CA-161197-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-161197	CA-161197-a01-MO011-EC03	RAM-2	13	28	5 A(1)	5 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-161233	CA-161233-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	10 A(3)	10 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-162175	CA-162175-a01-MO007-EC03	MPG	13	28	14 A(3)	14 A(0)	16 A(3)	16 A(0)
CA-168651	CA-168651-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	12 A(3)	13 A(0)	13 A(3)	13 A(0)
CA-168651	CA-168651-a01-MO011-EC03	MPG	13	28	10 A(2)	10 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-169254	CA-169254-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	11 C(2)	11 C(0)	9 A(2)	9 A(0)
CA-169254	CA-169254-a01-MO011-EC03	MPG	13	28	11 A(2)	11 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-169257	CA-169257-a01-MO010-EC03	GOT	13	28	13 A(2)	13 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-169257	CA-169257-a01-MO011-EC03	MPG	13	28	11 A(3)	11 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-169627	CA-169627-a01-MO008-EC03	FR23	13	28	10 A(2)	10 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-170297	CA-170297-a01-MO007-EC03	GOT	13	28	10 A(1)	13 A(0)	8 A(2)	8 A(0)
CA-170386	CA-170386-a01-MO031-EC03	FR23	13	28	11 C(2)	11 C(0)	13 A(2)	13 A(0)
CA-170386	CA-170386-a01-MO032-EC03	GOT	13	28	13 A(0)	13 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-170386	CA-170386-a01-MO033-EC03	MPG	13	28	0	0	10 A(3)	10 A(0)
CA-171509	CA-171509-a01-MO010-EC03	FR23	13	28	11 A(3)	10 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-171509	CA-171509-a01-MO011-EC03	GOT	13	28	9 A(2)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-172901	CA-172901-a01-MO013-EC03	GOT	7	28	12 A(3)	12 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-172915	CA-172915-a01-MO012-EC03	GOT	13	28	14 A(2)	13 A(0)	14 A(3)	14 A(0)
CA-175357	CA-175357-a01-MO009-EC03	SOTM	13	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-175917	CA-175917-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	7 C(2)	7 C(0)	7 E(0)	7 E(0)
CA-177328	CA-177328-a01-MO024-EC03	MPG	7	28	11 A(3)	11 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-177430	CA-177430-a01-MO025-EC03	MPG	7	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-177487	CA-177487-a01-MO022-EC03	CLA	13	28	10 A(2)	10 A(0)	9 A(2)	9 A(0)
CA-177487	CA-177487-a01-MO023-EC03	FR23	13	28	12 C(2)	12 C(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-177487	CA-177487-a01-MO024-EC03	GOT	13	28	11 A(3)	11 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-177720	CA-177720-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	13 A(3)	14 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-177720	CA-177720-a01-MO011-EC03	FR23	13	28	13 A(3)	15 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-177770	CA-177770-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	12 A(2)	12 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-177770	CA-177770-a01-MO011-EC03	FR23	13	28	10 A(1)	11 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-177777	CA-177777-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	11 A(3)	11 A(0)	11 A(3)	11 A(0)
CA-178247	CA-178247-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	7 A(1)	7 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-178252	CA-178252-a01-MO007-EC03	CLA	13	28	13 A(3)	13 A(0)	14 A(3)	14 A(0)
CA-178253	CA-178253-a01-MO007-EC03	CLA	13	28	9 A(2)	9 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-178368	CA-178368-a01-MO007-EC03	MPG	7	28	12 A(2)	12 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-178528	CA-178528-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-178528	CA-178528-a01-MO011-EC03	FR23	13	28	11 A(3)	11 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-178645	CA-178645-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	9 C(1)	9 C(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-178645	CA-178645-a01-MO011-EC03	FR23	13	28	6 A(3)	6 A(0)	8 A(2)	8 A(0)
CA-178647	CA-178647-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	9 C(2)	9 A(0)	13 A(3)	13 A(0)
CA-178647	CA-178647-a01-MO011-EC03	FR23	13	28	11 A(3)	11 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-178674	CA-178674-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	12 A(3)	12 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-178679	CA-178679-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	12 A(2)	11 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-179400	CA-179400-a01-MO010-EC03	CLA	13	28	11 A(3)	11 A(0)	13 A(3)	13 A(0)
CA-179413	CA-179413-a01-MO030-EC03	CLA	13	28	10 A(2)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-179413	CA-179413-a01-MO031-EC03	FR23	13	28	12 A(3)	12 A(0)	15 A(3)	15 A(0)
CA-179434	CA-179434-a01-MO016-EC03	FR23	13	28	7 A(2)	7 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-179434	CA-179434-a01-MO017-EC03	GOT	13	28	7 C(1)	7 C(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-179454	CA-179454-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-182202	CA-182202-a01-MO007-EC03	MPG	13	28	10 A(3)	10 A(0)	10 A(3)	10 A(0)
CA-182239	CA-182239-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	5 A(1)	5 A(0)	7 A(2)	7 A(0)
CA-182241	CA-182241-a01-MO010-EC03	FR23	13	28	9 A(3)	9 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-182241	CA-182241-a01-MO011-EC03	MPG	13	28	7 A(3)	7 A(0)	9 A(3)	9 A(0)
CA-188416	CA-188416-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	13 A(3)	13 A(0)	12 A(3)	12 A(0)
CA-188417	CA-188417-a01-MO008-EC03	FR23	13	28	8 A(2)	8 A(0)	8 A(2)	8 A(0)
CA-188442	CA-188442-a01-MO007-EC03	FR23	13	28	7 A(2)	7 A(0)	9 A(2)	9 A(0)

Tabla 13. Resultados de actividad frente al ensayo LiaRS de los extractos procedentes de ambos métodos de extracción: acetona y butanol.

5.4.2.6 Estudio de los extractos de butanol por LC-MS (METABOLÓMICA)

Del análisis por LCMS de los 71 extractos de butanol sí se pudo obtener una matriz de datos con la que se comparó la presencia de los diferentes valores de m/z detectados en el rango de los m/z de las ramoplaninas (1260-1300) para los diferentes extractos entre sí. Esto nos permitió evaluar la similitud o la diferencia en su contenido en moléculas relacionadas con la familia de antibióticos que nos ocupa y además clasificarlos en 5 categorías, tal y como se refleja en la Tabla 14. De este modo, 6 extractos fueron clasificados dentro del grupo de “alta actividad con mayor intensidad de iones detectables”, 8 fueron clasificados dentro del grupo “actividad media sin iones detectables”, 4 dentro del grupo “actividad media con iones detectables”, 35 en la categoría de “alta actividad con menor intensidad de iones detectables” y 18 extractos en la categoría de “sin actividad y sin iones detectables”.

5.4.2.7 Perfil antimicrobiano de los extractos de butanol

Para confirmar el perfil de actividad antimicrobiano de los 71 extractos, estos se ensayaron frente a 2 bacterias Gram-positivas: *SASM* y *SARM*, 1 bacteria Gram-negativa: *E. coli* y 1 levadura: *C. albicans*. Los experimentos se realizaron a un solo punto de concentración de extracto de 0,4 X WBE, y se llevaron a cabo por duplicado en días distintos.

En la Tabla 15 se representan gráficamente los datos obtenidos, de tal manera que el color azul más intenso representa el valor de porcentaje de inhibición más alto (100%) y el color azul más claro representa el porcentaje de inhibición menor (0%). Como puede observarse, la mayoría de los extractos presentaron actividad frente a bacterias Gram-positivas (*S. aureus* tanto sensible como resistente a metilicina) con valores que oscilan entre el 60 % y 100 % de inhibición. Así mismo se puede observar también en la misma tabla que frente a *E. coli* y *C. albicans* ninguno de los extractos mostró actividad.

Con estos resultados comprobamos que los extractos mantenían la característica de inhibir predominantemente bacterias Gram-positivas en vez de bacterias Gram-negativas o levaduras.

CEPA	EXTRACTO	MEDIO	DÍAS	TEMP	Bacterias gram-positivas		Bacterias gram-negativas	Levadura
					MSSA	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CA-117398	CA-117398-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-117410	CA-117410-a01-MO008-EC03	CLA	13	28				
CA-142982	CA-142982-a01-MO012-EC03	CLA	13	28				
CA-142982	CA-142982-a01-MO013-EC03	FR23	13	28				
CA-143677	CA-143677-a01-MO008-EC03	GOT	13	28				
CA-144426	CA-144426-a01-MO008-EC03	GOT	13	28				
CA-146703	CA-146703-a01-MO021-EC03	GOT	7	28				
CA-146703	CA-146703-a01-MO022-EC03	MPG	7	28				
CA-149663	CA-149663-a01-MO038-EC03	CLA	13	28				
CA-149663	CA-149663-a01-MO039-EC03	GOT	13	28				
CA-149663	CA-149663-a01-MO040-EC03	MPG	13	28				
CA-151217	CA-151217-a01-MO007-EC03	GOT	13	28				
CA-151222	CA-151222-a01-MO016-EC03	FR23	13	28				
CA-151222	CA-151222-a01-MO017-EC03	GOT	13	28				
CA-152578	CA-152578-a01-MO013-EC03	DNPM	7	28				
CA-161197	CA-161197-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-161197	CA-161197-a01-MO011-EC03	RAM-2	13	28				
CA-161233	CA-161233-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-162175	CA-162175-a01-MO007-EC03	MPG	13	28				
CA-168651	CA-168651-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-168651	CA-168651-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169254	CA-169254-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-169254	CA-169254-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169257	CA-169257-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-169257	CA-169257-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169627	CA-169627-a01-MO008-EC03	FR23	13	28				
CA-170297	CA-170297-a01-MO007-EC03	GOT	13	28				
CA-170386	CA-170386-a01-MO031-EC03	FR23	13	28				
CA-170386	CA-170386-a01-MO032-EC03	GOT	13	28				
CA-170386	CA-170386-a01-MO033-EC03	MPG	13	28				
CA-171509	CA-171509-a01-MO010-EC03	FR23	13	28				
CA-171509	CA-171509-a01-MO011-EC03	GOT	13	28				
CA-172901	CA-172901-a01-MO013-EC03	GOT	7	28				
CA-172915	CA-172915-a01-MO012-EC03	GOT	13	28				
CA-175357	CA-175357-a01-MO009-EC03	SOTM	13	28				
CA-175917	CA-175917-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-177328	CA-177328-a01-MO024-EC03	MPG	7	28				
CA-177430	CA-177430-a01-MO025-EC03	MPG	7	28				
CA-177487	CA-177487-a01-MO022-EC03	CLA	13	28				
CA-177487	CA-177487-a01-MO023-EC03	FR23	13	28				
CA-177487	CA-177487-a01-MO024-EC03	GOT	13	28				
CA-177720	CA-177720-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-177720	CA-177720-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-177770	CA-177770-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-177770	CA-177770-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-177777	CA-177777-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178247	CA-178247-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178252	CA-178252-a01-MO007-EC03	CLA	13	28				
CA-178253	CA-178253-a01-MO007-EC03	CLA	13	28				
CA-178368	CA-178368-a01-MO007-EC03	MPG	7	28				
CA-178528	CA-178528-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-178528	CA-178528-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178645	CA-178645-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-178645	CA-178645-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178647	CA-178647-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-178647	CA-178647-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178674	CA-178674-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178679	CA-178679-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-179400	CA-179400-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-179413	CA-179413-a01-MO030-EC03	CLA	13	28				
CA-179413	CA-179413-a01-MO031-EC03	FR23	13	28				
CA-179434	CA-179434-a01-MO016-EC03	FR23	13	28				
CA-179434	CA-179434-a01-MO017-EC03	GOT	13	28				
CA-179454	CA-179454-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-182202	CA-182202-a01-MO007-EC03	MPG	13	28				
CA-182239	CA-182239-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-182241	CA-182241-a01-MO010-EC03	FR23	13	28				
CA-182241	CA-182241-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-188416	CA-188416-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-188417	CA-188417-a01-MO008-EC03	FR23	13	28				
CA-188442	CA-188442-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				

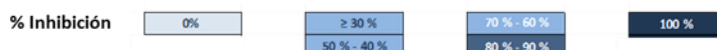


Tabla 15. Resultados que confirman el perfil de actividad antimicrobiana de los 71 extractos de butanol. (MRSA: del inglés Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; MSA: del inglés Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*).

5.4.2.8 Perfil citotóxico de los extractos de butanol

El potencial citotóxico de los extractos se evaluó a dos concentraciones distintas (4 WBE y 2 WBE) frente a dos líneas celulares diferentes: una línea celular inmortalizada de carcinoma de hígado, HepG2 y una línea primaria de hígado, THLE-2.

En la Tabla 16 se representan gráficamente los datos obtenidos, de tal manera que el color azul más intenso representa el valor de porcentaje de inhibición más alto (100%) y el color azul más claro representa el porcentaje de inhibición menor (0%).

Como se puede observar en la tabla frente a la línea celular HepG2, e independientemente de la concentración ensayada, la mayoría de los extractos no presentaron porcentajes de inhibición superiores al 30-40%, lo que indica que no son citotóxicos. De todo el grupo solo destaca el CA-172915-a01-MO012-EC03 que mostró un 70 % de inhibición cuando se ensayó frente a esta línea celular a la concentración más alta (0,4 WBE).

Además, en la misma tabla (Tabla 16) se recogen los datos obtenidos frente a la línea celular THLE-2. Queda reflejado por las intensidades de color azul que la gran parte de los extractos se comportaron de manera similar a la que lo hicieron frente a HepG2 no superando el 40% de inhibición en ninguna de las dos concentraciones. Sin embargo, hay varios extractos que inhibieron el crecimiento de las células THLE-2 por encima del 80%, a la concentración más alta en la que fueron ensayados (0,4 WBE). Este hecho les señala como extractos en los que se podría encontrar algún compuesto potencialmente citotóxico. Entre ellos destacan 3 extractos que muestran inhibiciones del 100% en ambas concentraciones: CA-117398-a01-MO010-EC03, CA-169257-a01-MO011-EC03 y CA-178253-a01-MO007-EC03.

A la vista general de los resultados se puede considerar que en su gran mayoría los extractos presentan una baja o nula citotoxicidad.

CEPA	EXTRACTO	MEDIO	DIAS	TEMP	HepG2		THLE2	
					0,4 X WBE	0,2 X WBE	0,4 X WBE	0,2 X WBE
CA-117398	CA-117398-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-117410	CA-117410-a01-MO008-EC03	CLA	13	28				
CA-142982	CA-142982-a01-MO012-EC03	CLA	13	28				
	CA-142982-a01-MO013-EC03	FR23	13	28				
CA-143677	CA-143677-a01-MO008-EC03	GOT	13	28				
CA-144426	CA-144426-a01-MO008-EC03	GOT	13	28				
CA-146703	CA-146703-a01-MO021-EC03	GOT	7	28				
	CA-146703-a01-MO022-EC03	MPG	7	28				
	CA-149663-a01-MO038-EC03	CLA	13	28				
CA-149663	CA-149663-a01-MO039-EC03	GOT	13	28				
	CA-149663-a01-MO040-EC03	MPG	13	28				
CA-151217	CA-151217-a01-MO007-EC03	GOT	13	28				
CA-151222	CA-151222-a01-MO016-EC03	FR23	13	28				
	CA-151222-a01-MO017-EC03	GOT	13	28				
CA-152578	CA-152578-a01-MO013-EC03	DNPM	7	28				
CA-161197	CA-161197-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
	CA-161197-a01-MO011-EC03	RAM-2	13	28				
CA-161233	CA-161233-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
CA-162175	CA-162175-a01-MO007-EC03	MPG	13	28				
CA-168651	CA-168651-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
	CA-168651-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169254	CA-169254-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
	CA-169254-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169257	CA-169257-a01-MO010-EC03	GOT	13	28				
	CA-169257-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-169627	CA-169627-a01-MO008-EC03	FR23	13	28				
CA-170297	CA-170297-a01-MO007-EC03	GOT	13	28				
CA-170386	CA-170386-a01-MO031-EC03	FR23	13	28				
	CA-170386-a01-MO032-EC03	GOT	13	28				
	CA-170386-a01-MO033-EC03	MPG	13	28				
CA-171509	CA-171509-a01-MO010-EC03	FR23	13	28				
	CA-171509-a01-MO011-EC03	GOT	13	28				
CA-172901	CA-172901-a01-MO013-EC03	GOT	7	28				
CA-172915	CA-172915-a01-MO012-EC03	GOT	13	28				
CA-175357	CA-175357-a01-MO009-EC03	SOTM	13	28				
CA-175917	CA-175917-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-177328	CA-177328-a01-MO024-EC03	MPG	7	28				
CA-177430	CA-177430-a01-MO025-EC03	MPG	7	28				
	CA-177487-a01-MO022-EC03	CLA	13	28				
CA-177487	CA-177487-a01-MO023-EC03	FR23	13	28				
	CA-177487-a01-MO024-EC03	GOT	13	28				
CA-177720	CA-177720-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
	CA-177720-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-177770	CA-177770-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
	CA-177770-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-177777	CA-177777-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178247	CA-178247-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178252	CA-178252-a01-MO007-EC03	CLA	13	28				
CA-178253	CA-178253-a01-MO007-EC03	CLA	13	28				
CA-178368	CA-178368-a01-MO007-EC03	MPG	7	28				
CA-178528	CA-178528-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
	CA-178528-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178645	CA-178645-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
	CA-178645-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178647	CA-178647-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
	CA-178647-a01-MO011-EC03	FR23	13	28				
CA-178674	CA-178674-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-178679	CA-178679-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-179400	CA-179400-a01-MO010-EC03	CLA	13	28				
CA-179413	CA-179413-a01-MO030-EC03	CLA	13	28				
	CA-179413-a01-MO031-EC03	FR23	13	28				
CA-179434	CA-179434-a01-MO016-EC03	FR23	13	28				
	CA-179434-a01-MO017-EC03	GOT	13	28				
CA-179454	CA-179454-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-182202	CA-182202-a01-MO007-EC03	MPG	13	28				
CA-182239	CA-182239-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-182241	CA-182241-a01-MO010-EC03	FR23	13	28				
	CA-182241-a01-MO011-EC03	MPG	13	28				
CA-188416	CA-188416-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				
CA-188417	CA-188417-a01-MO008-EC03	FR23	13	28				
CA-188442	CA-188442-a01-MO007-EC03	FR23	13	28				

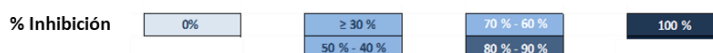


Tabla 16. Perfil citotóxico frente a las líneas celulares HepG2 y THLE-2 de los 71 extractos extraídos con butanol.

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU ACTIVIDAD EN EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

Del mismo modo que se fueron caracterizando biológica y químicamente los extractos con el fin de encontrar nuevas moléculas de la familia de las ramoplaninas, las 49 cepas de actinomicetos de cuya fermentación procedían dichos extractos también fueron estudiadas en mayor profundidad para determinar la diversidad y la relación filogenética entre las mismas. Partiendo de la información preliminar descrita en el apartado 4.3, a continuación se detallan los resultados obtenidos según las diferentes técnicas empleadas.

5.5.1 SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S ARNr

El gen 16S ARNr es un marcador molecular eficaz con fines taxonómicos ya que es universal, funcionalmente estable, altamente conservado y sujeto con poca frecuencia a transferencia génica horizontal (Embley y Stackebrandt, 1994). A pesar de estar altamente conservado, contiene seis regiones variables que son útiles para el diseño de sondas específicas que pueden ser utilizadas para diferenciar géneros, especies e incluso subespecies. Debido a estas propiedades y al hecho de ser el gen que ha evolucionado más lentamente, el gen del ARNr 16S se estableció como elemento de referencia para identificar especies, géneros y familias de bacterias (Embley y Stackebrandt, 1994).

Por estas razones, una vez determinada la taxonomía inicial de las 49 cepas en función de sus características morfológicas, se determinó su secuencia casi completa (de unos 1400 nt) revisándose manualmente para identificar posiciones con un alineamiento dudoso, y una vez alineadas, las secuencias se recortaron en sus extremos dejando unos 1300 nt que incluían la posición 100 hasta la 1400. Dichas secuencias fueron comparadas con las secuencias de cepas tipo con nombres procarióticos validados publicados y registrados en la base de datos EzTaxon®.

En la Tabla 17 se incluyen las diferentes identificaciones taxonómicas de la especie más cercana resultantes y se puede observar que el porcentaje de similitud en la secuencia del 16S de todas las cepas con respecto a la especie más cercana resultó por encima del 98%, esto es por encima del umbral habitual establecido (97%) para ser considerada alguna de ellas como nueva especie (Stackebrandt and Goebel 1994). Sin embargo, debido a que en muchos casos es difícil diferenciar dos especies usando sólo las

secuencias del gen 16S ARNr, en varias ocasiones se ha propuesto elevar este valor. Así, Stackebrandt y Ebers propusieron en 2006 como nuevo punto de corte el rango entre el 98,7-99,0% de similitud de secuencia (Stackebrandt y Ebers, 2006), y más recientemente Kim y colaboradores y Meier-Kolthoff y colaboradores ambos en 2014 propusieron el valor del corte en 98,65 % (M. Kim *et al.*, 2014) y el rango entre 98,2-99,0% (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014), respectivamente.

FAMILIA	CEPA	CONTINENTE / REGIÓN	PAÍS	TIPO DE SUELO	ESPECIE MÁS CERCANA	SIMILITUD (%)	
Micromonosporaceae	CA-172901	Asia	Sri Lanka	Manglar	<i>Actinoplanes abujensis</i> A4029(T)	98.79	
	CA-172915	Asia	Sri Lanka	Manglar		98.87	
	CA-178252	América Central	México	Suelo	<i>Actinoplanes ferrugineus</i> IFO 15555(T)	97.98	
	CA-179413	América Central	México	Estanque		99.85	
	CA-182202	África	Sudáfrica	Rizosfera		99.64	
	CA-182239	África	Sudáfrica	Rizosfera		99.64	
	CA-182241	África	Sudáfrica	Rizosfera		99.64	
	CA-188416	África	Sudáfrica	Rizosfera		99.64	
	CA-188417	África	Sudáfrica	Rizosfera	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> MCS-1(T)	99.64	
	CA-188442	África	Sudáfrica	Rizosfera		99.63	
	CA-175917	América Central	México	Estanque		99.06	
	CA-142982	América Central	México	Tierra agrícola		99.42	
	CA-151217	América del Sur	Guayana Francesa	Bosque lluvioso		99.35	
	CA-143677	Oceania	Nueva Caledonia	Sabana		99.78	
	CA-149663	Oceania	Nueva Caledonia	Sabana		99.72	
	CA-162175	América del Sur	Guayana Francesa	Bosque lluvioso		99.64	
	CA-169627	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.71	
	CA-175357	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.64	
	CA-177720	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.78	
	CA-177770	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.57	
	CA-177777	Asia	Sri Lanka	Manglar	<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151(T)	99.71	
	CA-178645	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.71	
	CA-178647	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.71	
	CA-179454	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.64	
	CA-178674	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.78	
	CA-178679	Asia	Sri Lanka	Manglar		99.64	
	CA-144426	Oceania	Nueva Caledonia	Bosque sempervirente		99.64	
	CA-151222	América del Sur	Guayana Francesa	Bosque lluvioso		<i>Micromonospora endolithica</i> DSM 44398(T)	99.57
	CA-170297	África	Sudáfrica	Vegetales asociados	<i>Micromonospora equina</i> Y22(T)	99.41	
	CA-178247	América Central	México	Suelo	<i>Micromonospora fulvivoridis</i> DSM 43906(T)	99.42	
	CA-161233	África	Sudáfrica	Duna		99.85	
	CA-168651	África	Sudáfrica	Vegetales asociados	<i>Micromonospora halotolerans</i> CR18(T)	99.64	
	CA-179400	América Central	México	Estanque		99.64	
	CA-170386	África	Sudáfrica	Vegetales asociados		99.5	
	CA-169254	África	Sudáfrica	Vegetales asociados		99.43	
	CA-169257	África	Sudáfrica	Vegetales asociados	<i>Micromonospora inositol</i> DSM 43819(T)	99.48	
	CA-171509	África	Sudáfrica	Vegetales asociados		99.49	
	CA-177487	América Central	México	Suelo		99.48	
	CA-178528	América Central	México	Suelo		99.36	
	Nocardiaceae	CA-146703	Oceania	Nueva Caledonia	Bosque sempervirente	<i>Nocardia niigatensis</i> NBRC 100131(T)	99.86
		CA-161197	África	Sudáfrica	Duna	<i>Nocardia testacea</i> NBRC 100365(T)	99.64
	Pseudonocardiaceae	CA-117398	América Central	Costa Rica	Tierra agrícola	<i>Amycolatopsis umgeniensis</i> UM16(T)	99.71
		CA-117410	América Central	Costa Rica	Tierra agrícola		99.71
		CA-178253	América Central	México	Suelo	<i>Lechevalieria atacamensis</i> C61(T)	98.99
	Streptomycetaceae	CA-177328	América Central	México	Lago	<i>Streptomyces atrovirens</i> NRRL B-16357(T)	99.62
		CA-177430	América Central	México	Suelo		99.57
		CA-152578	Europa	España	Cauce de río	<i>Streptomyces mirabilis</i> NBRC 13450(T)	99.36
CA-178368		América Central	México	Lago	?		
Unidentified	CA-179434	América Central	México	Suelo	?		

Tabla 17. Asignación de especies a los 47 cultivos secuenciados según el resultado del análisis de EzTaxon y distribución de las especies identificadas según sus lugares de origen. Además, con el signo de interrogación aparecen, la cepa incluida en la familia *Streptomycetaceae* por su morfología y la cepa que no se pudo identificar.

Este análisis nos permitió clasificar todas aquellas cepas que por su morfología no pudieron ser identificadas y que se habían agrupado como *no identificados*. Así, resultó que el grupo taxonómico más abundante fue la familia *Micromonosporaceae* ya que 39 de las cepas (representando un 79,6% respecto del total) resultaron estar incluidas en este grupo, siendo 36 de ellas del género *Micromonospora* y 3 del género *Actinoplanes*. El resto de las cepas (10 cepas) se distribuyeron en tres familias distintas, de manera que se identificaron 4 cepas pertenecientes a la familia *Streptomycetaceae* (aunque a 1 de ellas se le asignó al género por su morfología solamente), 3 cepas pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae* siendo 2 de ellas del género *Amycolaptosis* y 1 del género *Lechevalieria*, 2 cepas pertenecientes a la familia *Nocardiaceae*, y por último una cepa que no pudo ser clasificada dado que su secuencia fue fallida.

También se observa en la Tabla 17 que las cepas clasificadas dentro de la familia *Micromonosporaceae* están ampliamente distribuidas a nivel geográfico.

Cabe destacar que el hecho de que la mayoría de los organismos pertenezca a la familia *Micromonosporaceae* es consistente con la taxonomía del organismo original productor de ramoplanina.

5.5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS IDENTIFICADAS

La diversidad de las cepas identificadas se estudió mediante el cálculo de la matriz de distancias a partir de las secuencias del 16S alineadas. Con esta matriz y mediante el método de Neighbor-Joining se construyó un árbol filogenético (Figura 51) para ver la topología general de las ramas que agrupaban los distintos taxones de las cepas estudiadas. Se evaluó la robustez del árbol mediante *bootstrapping* realizando alrededor de 1000 muestreos aleatorios y se consideraron valores de bootstrap suficientemente robustos aquellos >70% (equivalente a un nivel de significación $p < 0.05$).

En el árbol filogenético (Figura 51) podemos diferenciar 3 ramas principales: un primer gran clado formado por todas las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, otro formado por las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* y *Nocardiaceae* y por último a mayor distancia un clado formado por las cepas de la familia *Streptomycetaceae*.



Figura 51. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr de las 47 cepas seleccionadas. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70%. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleótidas por sitio.

EL primer gran clado contiene el grupo de 36 cepas del género *Micromonospora* asociadas a las siguientes 7 diferentes especies tipo más cercanas: *Micromonospora chersina* DSM44151, *Micromonospora halotolerans* CR18, *Micromonospora chaiyaphumensis* MC5-1, *Micromonospora endolithica* DSM44398, *Micromonospora fulviviridis* DSM43906, *Micromonospora inositola* DSM43819, *Micromonospora equina* Y22; más una rama con 2 cepas que se unen con la cepa tipo *Actinoplanes abujensis* A4029. A continuación, encontramos otra rama formada por 1 sola cepa asociada a la cepa tipo *Actinoplanes ferrugineus* IMSNU22125.

En el segundo clado encontramos por un lado 1 cepa asociada a la cepa tipo *Lechevalieria atacamensis* C61 de la familia *Pseudonocardiaceae* y por otro lado otra rama con dos clados, uno con 2 cepas de la misma familia que la anterior asociadas a *Amycolatopsis umgeniensis* UM16 y por otro lado 2 cepas de la familia *Nocardiaceae* asociadas a *Nocardia niigatensis* DSM44670 y *Nocardia testacea* NBRC100365 respectivamente.

El último y tercer clado principal formado por las cepas de la familia *Streptomycetaceae*, se bifurca en dos ramas, una rama con 1 cepa asociada a *Streptomyces mirabilis* NBRC13450 y otra rama, con 2 cepas asociadas *Streptomyces atrovirens* NRRL B16357.

No obstante, la igualdad de las secuencias del ARNr 16S puede no implicar necesariamente la igualdad de las especies. Por lo tanto, si bien las secuencias del ARNr 16S pueden ser utilizadas rutinariamente para distinguir y establecer relaciones entre géneros y especies bien definidas, en el caso de cepas muy similares de especies cuya divergencia es muy reciente estas diferencias puede que no sean reconocidas.

5.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE PERFILES DE AMPLIFICACIÓN (*fingerprinting*)

Después de asignar la posición taxonómica más precisa de las 47 cepas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, se estudió con mayor detalle la diversidad de las mismas mediante dos técnicas distintas de PCR-*fingerprinting* (BOX y REP) con distinto poder de resolución para poder comparar los resultados obtenidos en cada uno de los análisis realizados e intentar discernir cuál de ellas es la que discrimina mejor las cepas de actinomicetos.

En general, las técnicas de PCR-*fingerprinting* nos permiten estudiar con mayor resolución la diversidad de las cepas. Por nuestra parte, establecimos que aquellas cepas con una

similitud mayor del 80% podrían considerarse la misma cepa y aquellas con un porcentaje menor serían consideradas cepas distintas. Este punto de corte se estableció en base a nuestra propia experiencia con otros grupos de cepas y en base al trabajo de otros autores que utilizaron este valor en sus estudios (Lanoot *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006)

5.5.3.1 Técnica BOX-PCR

La primera de las técnicas utilizadas para evaluar detalladamente la diversidad de las cepas fue la de BOX-PCR en la que se utiliza el oligonucleótido BOXA1R que permite amplificar regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano y esto hace que podamos discriminar las cepas por debajo del nivel de especie (Versalovic *et al.*, 1994). Se ha comprobado que, para identificar rápidamente una cepa desconocida por comparación con un control conocido, la técnica BOX-PCR es una de las más útiles de ADN *fingerprinting*, ya que genera unos perfiles de amplificación sólidos, reproducibles y suficientemente complejos para poder distinguir entre organismos no emparentados entre sí (Rademaker y De Bruijn, 1997), siendo además la técnica menos sensible a la presencia de contaminantes en el ADN y por tanto generando perfiles de amplificación incluso bajo condiciones subóptimas (Louws *et al.*, 1995).

En nuestro estudio, el análisis de *clusters* se realizó con 48 cepas, ya que menos en un caso, en el resto el cebador BOXA1R produjo unos patrones de amplificación de muy alta resolución con tamaños de bandas que variaban desde menos de 0,2 kb hasta aproximadamente 2,0 kb. Los perfiles electroforéticos con DNA-*chips* se analizaron mediante el programa informático Bionumerics® de Applied Maths™ (versión 6.6) utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson.

La Figura 52, muestra el dendrograma que se obtuvo al integrar los resultados de las 48 cepas que se agruparon en 40 *clusters* definidos a un punto de corte del 80 % de similitud, dando esto idea de la gran diversidad de estas cepas. Se puede observar en la Figura 52 que de los 40 *clusters*, 33 de ellos eran únicos con 1 sola cepa, 6 *clusters* contenían 2 cepas y 1 *cluster* contenía 3 cepas. También cabe destacar que en cuanto a los orígenes de las cepas existe una clara tendencia de las mismas a agruparse según su procedencia, y que los 7 *clusters* con más de una cepa están formados por cultivos del mismo origen y en todos los casos las cepas tenían la misma identificación taxonómica según su secuencia.

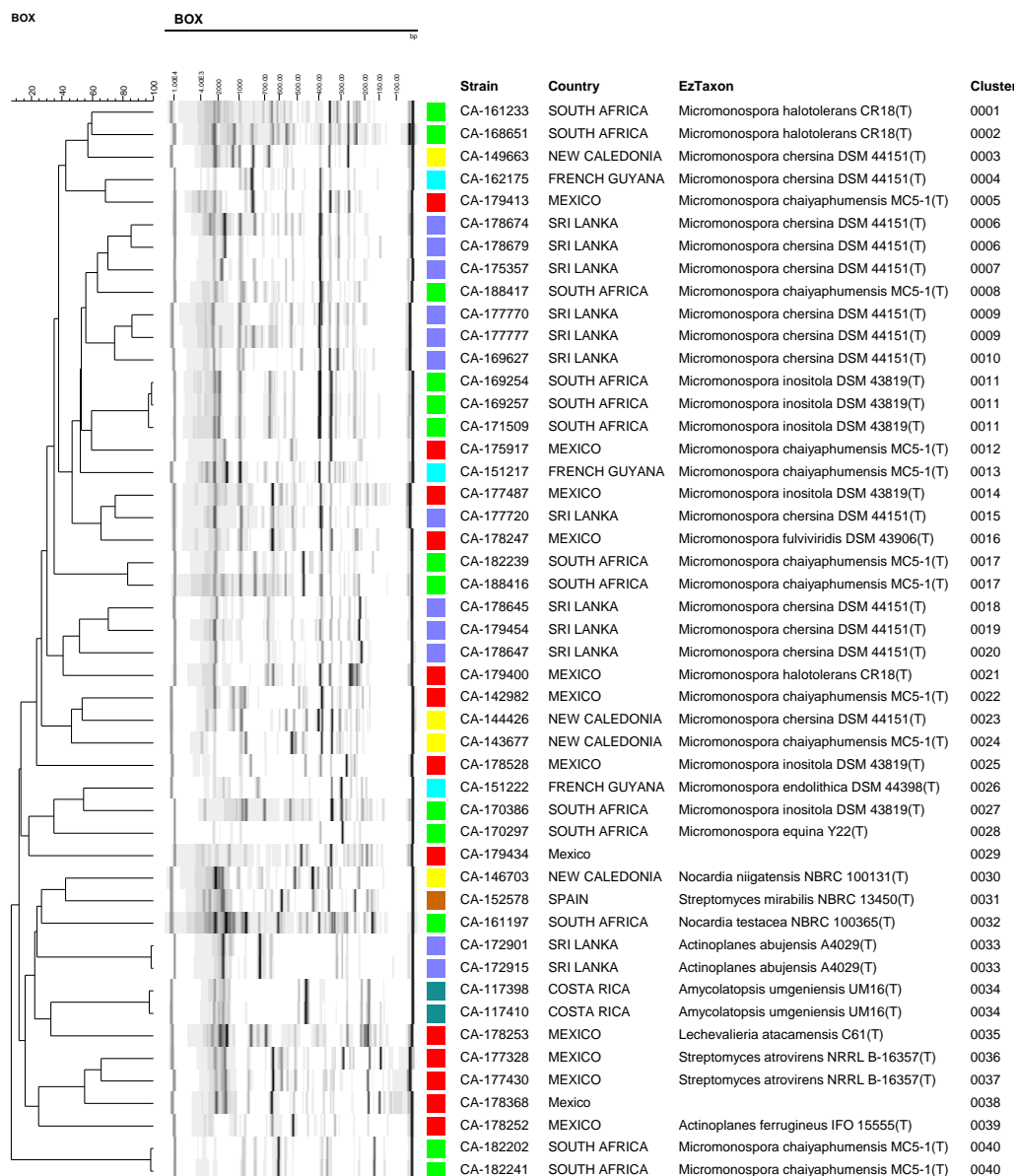


Figura 52. Dendrograma de las cepas resultante del análisis por BOX-PCR. Se indica el nombre de la cepa, el país de origen (colores), identificación taxonómica de la especie más cercana y el cluster en que se agrupa cada cepa a un punto de corte del 80 % de similitud.

Las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, se agruparon en 30 clusters distintos, de los cuales 28 de ellos incluían 33 *Micromonospora* spp., y los otros 2 clusters 3 cepas de *Actinoplanes* spp. Este hecho destaca la gran diversidad que existe entre las cepas de este gran grupo. Hay que destacar también, en contraste con el resultado obtenido con el árbol filogenético, que de los 28 clusters que incluían las cepas *Micromonospora* spp. solo

5 de ellos agrupaban 2 cepas y tan solo 1 *cluster* estaba formado por 3 cepas. La tendencia de estas agrupaciones es la de asociarse según su origen y taxonomía a excepción de 1 *cluster* que reúne 2 cepas de distinto lugar (México y Sri Lanka) y taxonomía (*Micromonospora inositola* y *Micromonospora chersina*).

Las dos cepas de la familia *Nocardiaceae* se agruparon en 2 *clusters* independientes, así como las 3 cepas de la familia *Streptomycetaceae*, lo que también subraya la diversidad entre ellas respectivamente.

En cuanto a las 3 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* se agruparon en 2 *clusters* diferentes, uno formado por las dos cepas de *Amycolatopsis umgeniensis* ambas de Costa Rica y otro formado por la cepa de *Lechevalieria atacamensis*.

5.5.3.2 Técnica REP-PCR

La segunda de las técnicas utilizadas para evaluar detalladamente la diversidad de las cepas fue la de REP-PCR, basada en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con secuencias repetitivas, de unos 20 a 40 nucleótidos, palindrómicas extragénicas, es decir aquellas que están situadas en regiones no codificantes del ADN bacteriano. Stern y colaboradores (Stern *et al.*, 1984) las definieron como secuencias REP (del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*).

En nuestro estudio, el análisis de *clusters* se realizó con 47 cepas, ya que dos de ellas no amplificaron correctamente. Como en la técnica descrita en el apartado anterior, los perfiles electroforéticos también se analizaron mediante el programa informático Bionumerics® de Applied Maths™ (versión 6.6) utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson.

Como se puede apreciar en el dendrograma de la Figura 53, las 47 cepas estudiadas se agruparon en 23 *clusters* diferentes definidos a un punto de corte del 80% de similitud. De ellos 15 están formados por 1 sola cepa, mientras que los otros 8 *clusters* incluyen 2 o más cepas en algunos casos de orígenes y taxonomía diferentes. También observamos que las familias taxonómicas no se agrupan entre sí.

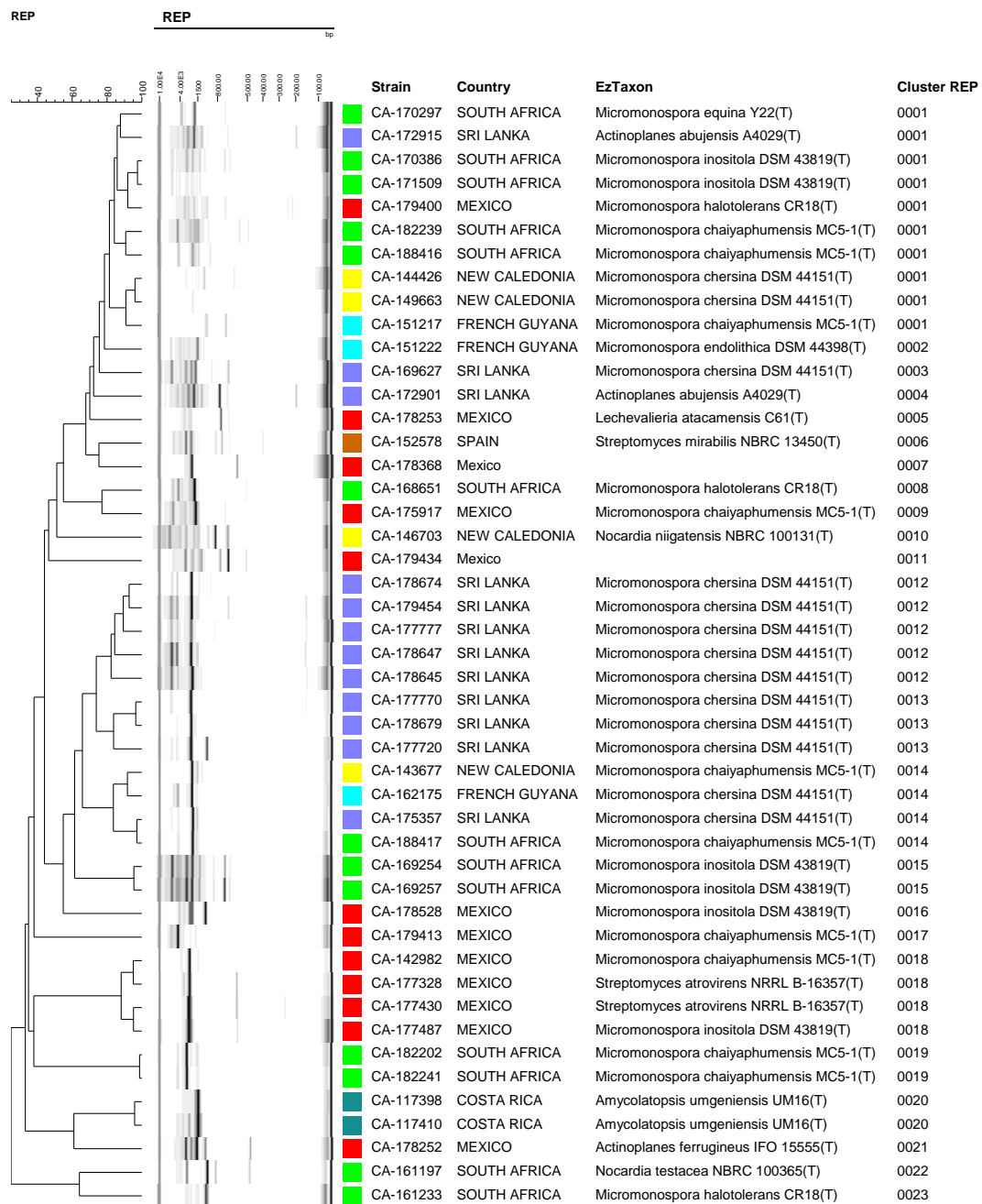


Figura 53. Dendrograma de las cepas resultante del análisis por REP-PCR. Se indica el nombre de la cepa, el país de origen (colores), identificación taxonómica de la especie más cercana y el *cluster* en que se agrupa cada cepa a un punto de corte del 80 % de similitud.

5.5.3.3 Comparación de las técnicas utilizadas

Los resultados obtenidos mediante estas dos técnicas se compararon entre sí para determinar cuál de ellas había aportado mayor profundidad taxonómica y poder de discriminación entre las cepas de nuestro estudio.

En primer lugar, al observar los dendrogramas resultantes de cada método, llama la atención el menor número de *clusters* obtenidos por la técnica de REP-PCR (23 *clusters*) con respecto a BOX-PCR (40 *clusters*). Este hecho podría atribuirse al menor número de bandas que presentan los patrones de amplificación de la primera técnica con respecto a la segunda.

También observamos que los *clusters* 19 y 20 obtenidos por REP-PCR coinciden con los *clusters* 40 y 34 obtenidos por BOX-PCR, respectivamente.

Además, también advertimos claramente que los *clusters* que incluyen varias cepas en uno y otro método se diferencian en que REP-PCR agrupa cepas de orígenes y taxonomías diferentes, mientras que BOX-PCR asocia cultivos del mismo origen y con la misma clasificación taxonómica.

5.5.3.4 Estimación de la diversidad de las cepas

Existen numerosos índices que permiten estudiar la diversidad de cepas presente en una población, y mediante esta forma poder determinar y comparar el poder de resolución de las distintas técnicas de caracterización empleadas. En este trabajo se optó por calcular para el grupo taxonómico mayoritario, es decir para la familia *Micromonosporaceae*, dos de los índices más utilizados habitualmente, el índice de diversidad de Simpson (**D**) y el índice de Shannon-Weiner (**H'**) que se calcularon con Bionumerics®. En el caso del índice de Simpson, cuanto más cercano al 100% sea su valor, mayor diversidad presentará la población estudiada y en el caso del índice de Shannon-Weiner cuanto más cercano sea a 5 mayor diversidad tendremos.

Además, como se ha indicado anteriormente, basándonos en nuestra experiencia y en la de otros autores (Lanoot *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006) se estableció, para las dos técnicas utilizadas, un punto de corte del 80% para definir una OTU.

El valor del índice de Simpson para el grupo de cepas de *Micromonospora* obtenido con la técnica REP-PCR fue de 93,25% mientras que con la técnica BOX-PCR se obtuvo un valor

de 98,72%. Los valores de índice Shannon-Weiner obtenidos fueron 2,7944 y 3,3320 para REP-PCR y BOX-PCR, respectivamente.

Ambos índices indican que en nuestro estudio la capacidad de resolver entre cepas ha sido mayor con la técnica BOX-PCR.

5.5.4 DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE GENES BIOSINTÉTICOS: PKS-I, PKS-II Y NRPS

Los actinomicetos producen metabolitos secundarios de gran diversidad estructural mediante sistemas multifuncionales tales como las sintasas modulares de policétidos: PKS-I (Hopwood, 1997), las sintasas iterativas de policétidos: PKS-II (Hopwood, 1997) (Shen, 2003) y las sintetasas de péptidos no-ribosomales: NRPS (Schwarzer *et al.*, 2003).

Se decidió estudiar la presencia y distribución de sistemas NRPS, PKS-I y PKS-II en las 49 cepas seleccionadas en este estudio por un lado para caracterizar el potencial metabólico de las mismas y por otro lado para corroborar la presencia de secuencias de los genes biosintéticos NRPS dado que por la bibliografía sabíamos que el organismo productor de ramoplanina biosintetiza este antibiótico mediante sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS).

Como puede verse en la Tabla 18, en general, se obtuvieron altas frecuencias de amplificaciones específicas positivas para NRPS (89,6 %) y PKS-I (77,1 %) y bajas para PKS-II (31,25 %). En la tabla se señala con asterisco (*) una cepa que no amplificó, y que no se ha tenido en cuenta en los cálculos de porcentajes.

Destacó la detección positiva de genes asociados a sistemas NRPS que se observó en la mayoría de las cepas a excepción de 5 de ellas de la familia *Micromonosporaceae* de las cuales 4 solo fueron positivas a genes asociados a sistemas PKS-I, y una de ellas que fue negativa para todos los sistemas. Este resultado apoyaría la idea de que en su mayoría estas cepas son productoras de ramoplanina o moléculas relacionadas con este antibiótico.

FAMILIA	CEPA	PAÍS	ESPECIE MÁS CERCANA	NRPS	PKS-I	PKS-II	
	CA-172901	Sri Lanka	Actinoplanes abujensis A4029(T)	+	+	+	
	CA-172915	Sri Lanka		+	+	+	
	CA-178252	México	Actinoplanes ferrugineus IFO 15555(T)	+	+	+	
	CA-179413	México	Micromonospora chersina DSM 44151(T)	+	x	x	
	CA-182202	Sudáfrica		+	+	+	
	CA-182239	Sudáfrica		+	+	x	
	CA-182241	Sudáfrica		+	+	x	
	CA-188416	Sudáfrica		+	+	x	
	CA-188417	Sudáfrica		Micromonospora chalybophumensis MCS-1(T)	+	+	x
	CA-188442	Sudáfrica		*	*	*	
	CA-175917	México		+	+	x	
	CA-142982	México		+	+	x	
	CA-151217	Guayana Francesa		+	+	x	
	CA-143677	Nueva Caledonia	+	+	x		
	CA-149663	Nueva Caledonia	Micromonospora endolithica DSM 44398(T)	x	+	x	
	CA-162175	Guayana Francesa		+	+	x	
	CA-169627	Sri Lanka		+	x	x	
	CA-175357	Sri Lanka		+	+	+	
	CA-177720	Sri Lanka		+	+	x	
<i>Micromonosporaceae</i>	CA-177770	Sri Lanka		+	+	x	
	CA-177777	Sri Lanka		x	+	x	
	CA-178645	Sri Lanka		+	+	x	
	CA-178647	Sri Lanka		+	+	x	
	CA-179454	Sri Lanka		x	+	x	
	CA-178674	Sri Lanka	+	+	x		
	CA-178679	Sri Lanka	+	x	x		
	CA-144426	Nueva Caledonia	+	x	+		
	CA-151222	Guayana Francesa	Micromonospora equina Y22(T)	+	x	x	
	CA-170297	Sudáfrica	Micromonospora fulviviridis DSM 43906(T)	+	x	x	
	CA-161233	Sudáfrica	Micromonospora halotolerans CR18(T)	+	+	x	
	CA-168651	Sudáfrica		+	+	+	
	CA-179400	México	+	x	x		
	CA-170386	Sudáfrica	Micromonospora inositola DSM 43819(T)	+	+	x	
	CA-169254	Sudáfrica		+	x	x	
	CA-169257	Sudáfrica		+	+	x	
	CA-171509	Sudáfrica		+	x	+	
	CA-177487	México		x	+	x	
	CA-178528	México		+	+	+	
	CA-146703	Nueva Caledonia		Nocardia niigatensis NBRC 100131(T)	+	+	+
<i>Nocardiaceae</i>	CA-161197	Sudáfrica	Nocardia testacea NBRC 100365(T)	+	+	+	
	CA-117398	Costa Rica	Amycolatopsis umgeniensis UM16(T)	+	+	+	
	CA-117410	Costa Rica		+	+	+	
<i>Pseudonocardiaceae</i>	CA-178253	México	Lechevalieria atacamensis C61(T)	+	+	x	
	CA-177328	México	Streptomyces atrovirens NRRL B-16357(T)	+	x	+	
	CA-177430	México		+	+	+	
<i>Streptomycetaceae</i>	CA-152578	España		Streptomyces mirabilis NBRC 13450(T)	+	+	x
	CA-178368	México	?	+	+	x	
Unidentified	CA-179434	México	?	+	+	x	

Tabla 18. Detección positiva (+) o negativa (x) de los sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II, NRPS para cada una de las 49 cepas seleccionadas en este estudio. Marcada con asterisco (*) una cepa que no amplificó en ninguno de los casos.

Cabe señalar también, que todas las cepas que fueron positivas en sistemas PKS-I además lo fueron en sistemas NRPS. Y de las 11 cepas negativas en PKS-I, 1 fue la cepa que dio negativo en todos los sistemas, 3 fueron positivas en PKS-II, y 7 fueron positivas solo en NRPS.

Solo 12 cepas, que representan el 25% del total de ellas, presentaron genes asociados a los 3 sistemas biosintéticos. De ellas, 2 (100 %) pertenecientes a la familia *Nocardiaceae*, 3 (66,6 %) pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae*, 1 (25 %) cepa perteneciente a la familia *Streptomycetaceae*, 7 (18 %) pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae*, y 1 cepa que no fue identificada. Potencialmente, estas cepas serían las que tendrían mayor capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad biológica.

5.5.4.1 Perfiles de digestión con enzima *HinF1* de los productos de amplificación del sistema NRPS

Con objeto de evaluar la diversidad de los productos amplificados y el potencial metabólico para producir compuestos sintetizados por el sistema NRPS, se llevó a cabo una digestión de los productos de amplificación obtenidos con la pareja de oligonucleótidos específicos para esta ruta utilizando la enzima de restricción *HinF1*. Posteriormente, se analizaron los *clusters* mediante el programa Bionumerics® para construir el correspondiente dendrograma (Figura 54).

En la Figura 68 se puede observar que para un punto de corte del 80% de similitud, se obtuvieron 3 grupos diferentes de cepas. Un gran grupo formado por 38 cepas (*Cluster 1*), otro formado por 4 cepas (*Cluster 2*) y otro formado por 3 cepas (*Cluster 3*). En el análisis no se incluyeron las 4 cepas que habían mostrado una detección negativa de genes asociados a sistemas NRPS.

A la vista del dendrograma (Figura 54), encontramos que la agrupación en *clusters* aparece independientemente de la taxonomía de las cepas, excepto para el caso de los dos *Actinoplanes* que se encuentran juntos en el *Cluster 2*. Estos resultados podrían sugerir que la mayoría de las cepas agrupadas en el *Cluster 1* son productoras de ramoplanina o moléculas relacionadas con esta, mientras que las cepas de los *Cluster 2* y *Cluster 3* tendrían un potencial metabólico diferente, si bien esto no se puede asegurar.

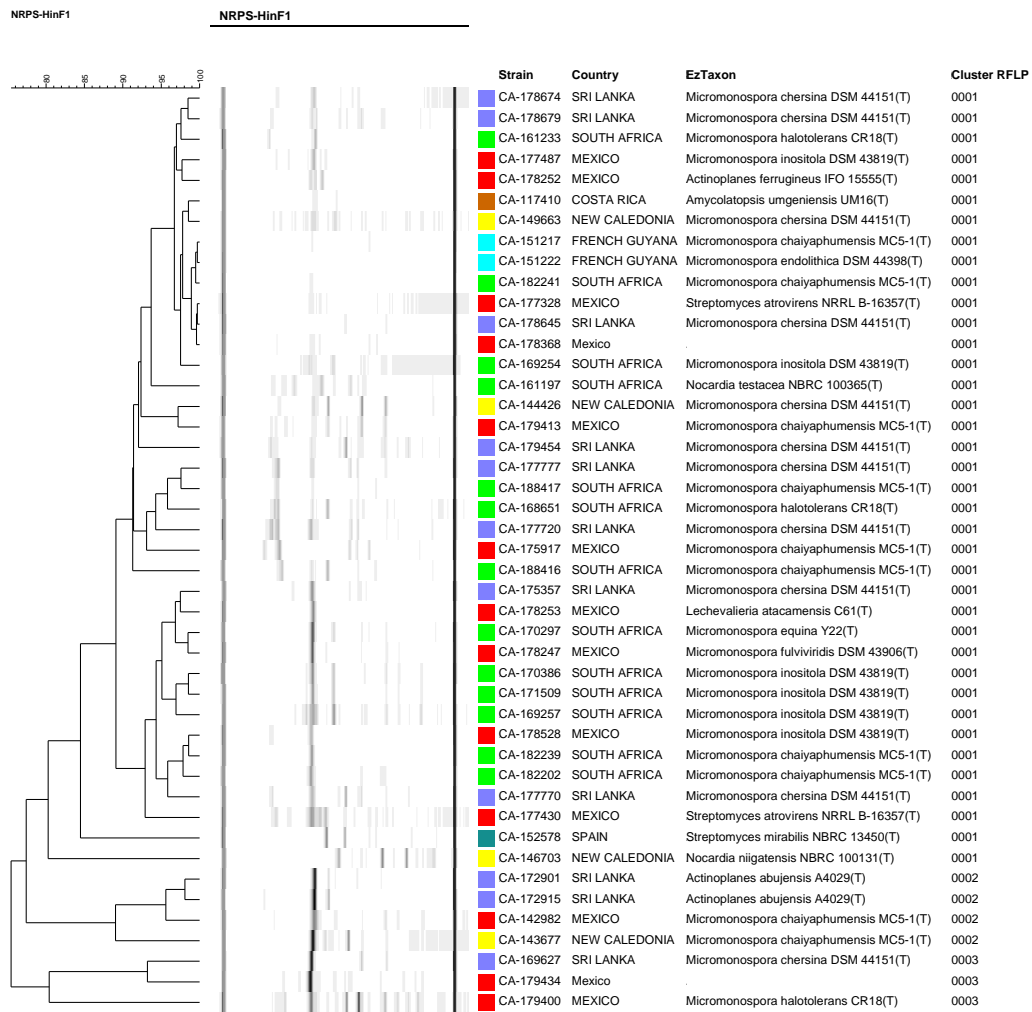


Figura 54. Dendrograma de los perfiles de restricción con la enzima HinF1 de los productos de amplificación del sistema NRPS. Se indica el nombre de la cepa, el país de origen (colores), identificación taxonómica de la especie más cercana y el cluster en que se agrupa cada cepa a un punto de corte del 80 % de similitud.

5.6 FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO DE LOS EXTRACTOS

5.6.1 SELECCIÓN DE EXTRACTOS PARA FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO

En la identificación química y aislamiento de compuestos procedentes de extractos de origen natural es habitual seguir una metodología de fraccionamiento biodirigido. En esta metodología la actividad medida en los bioensayos orienta el proceso de fraccionamiento y aislamiento de moléculas de interés. Así, primero se realiza un fraccionamiento del extracto original donde se detectó la bioactividad y las correspondientes fracciones vuelven a testarse sobre el bioensayo. Las fracciones que resultan activas se vuelven a fraccionar y a ensayar, y esto se repite tantas veces como sea necesario para obtener el compuesto activo con el mínimo número de impurezas.

Para seleccionar los extractos con los que continuar el trabajo y pasar a la etapa de fraccionamiento, utilizamos la combinación de tres criterios. Por un lado, se tuvo en cuenta la actividad que dichos extractos presentaron en el ensayo de agar LiRS (mayor tamaño de halo de inhibición y mayor intensidad del color azul), por otro la potencia de los mismos frente a *SARM* y/o a *SASM* y además los resultados obtenidos del análisis por LC/MS. A su vez, se consideró también la taxonomía inicial procedente de la identificación morfológica de las cepas, intentando escoger al menos algún representante de cada familia identificada (ver apartado 4.3.1, Tabla 10). Dado que el perfil citotóxico de los extractos se consideró bajo en general no se incluyeron esos resultados entre los criterios de selección.

Del total de 71 extractos, se eligieron 36 para fraccionamiento semipreparativo (Tabla 19), que correspondieron con 32 cepas diferentes, puesto que de 4 de ellas (CA-161197, CA-169254, CA-178645 y CA-179434) se eligieron dos extractos en medios diferentes.

CEPA	TAXONOMÍA INICIAL	EXTRACTO	MEDIO	DÍAS	TEMP
CA-142982	Micromonosporaceae	CA-142982-a01-MO013-EB04-a03	FR23	13	28
CA-143677	Micromonosporaceae	CA-143677-a01-MO008-EB04-a03	GOT	13	28
CA-149663	Micromonosporaceae	CA-149663-a01-MO040-EB04-a03	MPG	13	28
CA-151217	Micromonosporaceae	CA-151217-a01-MO007-EB04-a03	GOT	13	28
CA-179413	Micromonosporaceae	CA-179413-a01-MO031-EB04-a03	FR23	13	28
CA-162175	No identificado	CA-162175-a01-MO007-EB04-a03	MPG	13	28
CA-168651	No identificado	CA-168651-a01-MO011-EB04-a03	MPG	13	28
CA-169254	No identificado	CA-169254-a01-MO010-EB04-a03	GOT	13	28
		CA-169254-a01-MO011-EB04-a03	MPG	13	28
CA-169627	No identificado	CA-169627-a01-MO008-EB04-a03	FR23	13	28
CA-170297	No identificado	CA-170297-a01-MO007-EB04-a03	GOT	13	28
CA-175357	No identificado	CA-175357-a01-MO009-EB04-a03	SOTM	13	28
CA-175917	No identificado	CA-175917-a01-MO007-EB04-a03	FR23	13	28
CA-177487	No identificado	CA-177487-a01-MO022-EB04-a03	CLA	13	28
CA-177770	No identificado	CA-177770-a01-MO011-EB04-a03	FR23	13	28
CA-178247	No identificado	CA-178247-a01-MO007-EB04-a03	FR23	13	28
CA-178253	No identificado	CA-178253-a01-MO007-EB04-a03	CLA	13	28
CA-178528	No identificado	CA-178528-a01-MO011-EB04-a03	FR23	13	28
CA-178645	No identificado	CA-178645-a01-MO010-EB04-a03	CLA	13	28
		CA-178645-a01-MO011-EB04-a03	FR23	13	28
CA-179400	No identificado	CA-179400-a01-MO010-EB04-a03	CLA	13	28
CA-179434	No identificado	CA-179434-a01-MO016-EB04-a03	FR23	13	28
		CA-179434-a01-MO017-EB04-a03	GOT	13	28
CA-179454	No identificado	CA-179454-a01-MO007-EB04-a03	FR23	13	28
CA-182202	No identificado	CA-182202-a01-MO007-EB04-a03	MPG	13	28
CA-182239	No identificado	CA-182239-a01-MO007-EB04-a03	FR23	13	28
CA-188417	No identificado	CA-188417-a01-MO008-EB04-a03	FR23	13	28
CA-188442	No identificado	CA-188442-a01-MO007-EB04-a03	FR23	13	28
CA-161197	Nocardiaceae	CA-161197-a01-MO010-EB04-a03	GOT	13	28
		CA-161197-a01-MO011-EB04-a03	RAM-2	13	28
CA-117398	Pseudonocardiaceae	CA-117398-a01-MO010-EB04-a03	GOT	13	28
CA-117410	Pseudonocardiaceae	CA-117410-a01-MO008-EB04-a03	CLA	13	28
CA-152578	Streptomyetaceae	CA-152578-a01-MO013-EB04-a03	DNPM	7	28
CA-177328	Streptomyetaceae	CA-177328-a01-MO024-EB04-a03	MPG	7	28
CA-177430	Streptomyetaceae	CA-177430-a01-MO025-EB04-a03	MPG	7	28
CA-178368	Streptomyetaceae	CA-178368-a01-MO007-EB04-a03	MPG	7	28

Tabla 19. Cepas y extractos que se seleccionaron para fraccionamiento semipreparativo.

5.6.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FRACCIONAMIENTOS EN EL ENSAYO LiARS

Con el objetivo de obtener fracciones enriquecidas en los componentes de nuestro interés, se realizó un fraccionamiento de los 36 extractos seleccionados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna semipreparativa Zorbax® (C-8 250 × 9 mm) tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, obteniéndose 80 fracciones por cada uno de los extractos. En el Anexo 2, se presentan los perfiles cromatográficos de los mismos.

Cada uno de los 36 grupos de 80 fracciones se ensayaron en una sola placa de agar frente a la cepa *B. subtilis* HB0950 para comprobar qué fracciones mostraban halos de inhibición con respuesta de color azul.

En la Figura 55 se presenta un ejemplo correspondiente al extracto de la cepa CA-178368 crecida en medio MPG durante 7 días. Se puede observar el cromatograma obtenido

mediante HPLC semipreparativo del extracto y cómo los distintos picos, representando diferentes metabolitos secundarios, se reparten a lo largo de las fracciones que se van colectando. La actividad de dichas fracciones se comprueba mediante el ensayo en agar LiaRS. En el cromatograma se ha indicado con un recuadro de color rojo el pico cromatográfico que coincide con las fracciones activas.

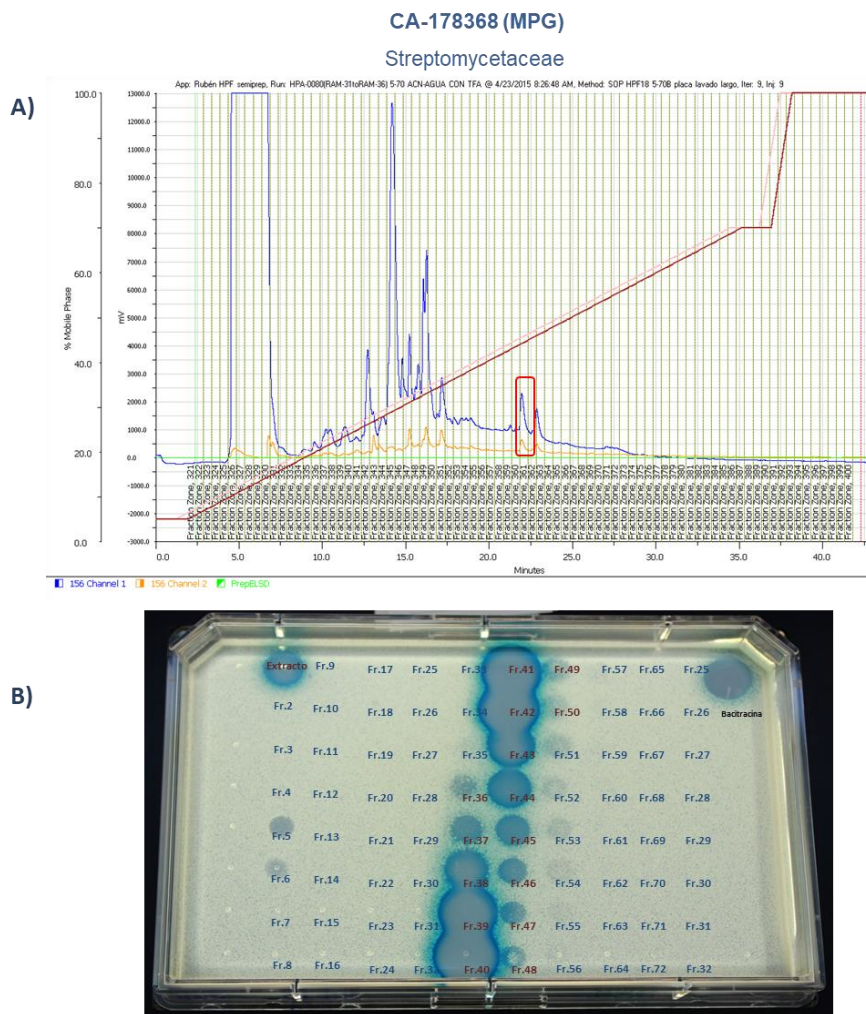


Figura 55. A) Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento semipreparativo del extracto procedente de la cepa CA-178368 crecida en medio MPG. Se indica el pico cromatográfico que coincide con **B)** las fracciones que muestran actividad positiva (halo de inhibición con anillo de color azul) en el ensayo de agar LiaRS.

Además, en la fotografía de la Figura 55B) se puede observar el halo de inhibición y la respuesta de color azul del extracto original y de la bacitarcina que se utiliza como control positivo del ensayo. Asimismo, se pueden ver las fracciones activas de este

fraccionamiento, que corresponden con el intervalo comprendido entre la fracción 37 y la fracción 48.

En la Tabla 20 se muestran de una manera gráfica los resultados obtenidos para cada uno de los 36 fraccionamientos semipreparativos. Para facilitar la interpretación y visualización de los datos se ha definido una escala de intensidades de color azul hasta el violeta.

EXTRACTO	TAXONOMÍA INICIAL	FRACCIONES																
		F35	F36	F37	F38	F39	F40	F41	F42	F43	F44	F45	F46	F47	F48	F49	F50	F51
CA-142982-a01-MO013-EB04-a03	Micromonosporaceae																	
CA-143677-a01-MO008-EB04-a03	Micromonosporaceae																	
CA-149663-a01-MO040-EB04-a03	Micromonosporaceae																	
CA-151217-a01-MO007-EB04-a03	Micromonosporaceae																	
CA-179413-a01-MO031-EB04-a03	Micromonosporaceae																	
CA-168651-a01-MO011-EB04-a03	No identificado																	
CA-169254-a01-MO011-EB04-a03	No identificado																	
CA-169627-a01-MO008-EB04-a03	No identificado																	
CA-175357-a01-MO009-EB04-a03	No identificado																	
CA-179454-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-182202-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-162175-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-178528-a01-MO011-EB04-a03	No identificado																	
CA-179400-a01-MO010-EB04-a03	No identificado																	
CA-169254-a01-MO010-EB04-a03	No identificado																	
CA-170297-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-175917-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-177487-a01-MO022-EB04-a03	No identificado																	
CA-177770-a01-MO011-EB04-a03	No identificado																	
CA-178247-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-178253-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-178645-a01-MO010-EB04-a03	No identificado																	
CA-178645-a01-MO011-EB04-a03	No identificado																	
CA-179434-a01-MO016-EB04-a03	No identificado																	
CA-179434-a01-MO017-EB04-a03	No identificado																	
CA-182239-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-188417-a01-MO008-EB04-a03	No identificado																	
CA-188442-a01-MO007-EB04-a03	No identificado																	
CA-161197-a01-MO010-EB04-a03	Nocardiaceae																	
CA-161197-a01-MO011-EB04-a03	Nocardiaceae																	
CA-117398-a01-MO010-EB04-a03	Pseudonocardiaceae																	
CA-117410-a01-MO008-EB04-a03	Pseudonocardiaceae																	
CA-177328-a01-MO024-EB04-a03	Streptomycetaceae																	
CA-177430-a01-MO025-EB04-a03	Streptomycetaceae																	
CA-178368-a01-MO007-EB04-a03	Streptomycetaceae																	
CA-152578-a01-MO013-EB04-a03	Streptomycetaceae																	

Tabla 20. Representación gráfica de la actividad positiva en el ensayo LiARS del intervalo de fracciones 35 a 51 de los fraccionamientos semipreparativos de los 36 extractos ordenados según su clasificación taxonómica inicial.

Los colores más claros en la tabla corresponden con los halos de inhibición de tamaño más pequeño y de menor intensidad en el color azul del anillo que se forma alrededor del halo (hidrólisis de X-gal por la presencia de β -galactosidasa), mientras que los colores azules más oscuros y el violeta corresponden con los halos de mayor tamaño y mayor intensidad en el color azul del anillo que se forma.

La mayoría de los fraccionamientos presentaron las zonas de actividad en el intervalo comprendido entre las fracciones 40 y 48. Solo en el caso de los fraccionamientos de los extractos de las familias *Pseudonocardiaaceae* y *Streptomycetaceae*, las fracciones activas se observaron desplazadas, en el primer caso hacia el intervalo comprendido entre las fracciones 36 y 40, y en el segundo caso entre las fracciones 39 y 44.

En el grupo de la familia *Micromonosporaceae*, las actividades más pequeñas y de menor intensidad se vieron en los extractos CA-151217-a01-MO007-EB04-a03 y CA-149663-a01-MO040-EB04-a03, mientras que las mejores actividades en cuanto a tamaño de halo e intensidad del color azul del anillo se pudieron observar en las fracciones 43 y 44 del extracto CA-142982-a01-MO013-EB04-a03 y del extracto CA-179413-a01-MO031-EB04-a03, que se seleccionaron para ser analizadas mediante LC-HRMS.

En el grupo de extractos pertenecientes a las cepas cuya taxonomía inicial no había sido identificada, los fraccionamientos correspondientes a los extractos CA-175917-a01-MO007-EB04-a03 y CA-178253-a01-MO007-EB04-a03 no mostraron actividad en ninguna de sus fracciones. Sin embargo, las actividades más sobresalientes en tamaño de halo y color del anillo se apreciaron en las fracciones 41, 42, 43 y 44 de los extractos CA-162175-a01-MO007-EB04-a03, CA-178528-a01-MO011-EB0-a03 y CA-179400-a01-MO10-EB04-a03 que se seleccionaron para su posterior análisis mediante LC-HRMS.

Curiosamente el fraccionamiento del extracto de la cepa clasificada inicialmente como *Nocardiaaceae* crecida en el medio RAM-2 no mostró ninguna fracción activa, mientras que el extracto de la misma cepa crecida en el medio GOT dio lugar a un intervalo amplio de fracciones activas relativamente potentes comprendidas entre las fracciones 41 y 47. En este caso no se seleccionó ninguna de ellas para su posterior análisis mediante LC-HRMS.

Los fraccionamientos de las dos cepas pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaaceae* presentaron muy buenas actividades, destacando las fracciones 37 y 38 del extracto CA-117410-a01-MO008-EB04-a03. Se seleccionaron para analizar mediante LC-HRMS las fracciones activas de los dos extractos tanto por su destacada potencia como por ser las dos únicas cepas en las que el rango de actividades estaba desplazado entre las fracciones anteriores a la número 40.

Por último, cabe señalar que de los 4 extractos dentro del grupo de la familia *Streptomycetaceae* solo el extracto CA-152578-a01-MO013-EB04-a03 mostró baja

actividad. Todos los demás se distinguieron por exhibir fracciones con tamaños de halo grandes rodeados de anillos de color azul intenso y en el rango comprendido entre las fracciones 39 a 44, por lo que en todos los casos se decidió analizar mediante LC-HRMS las fracciones activas.

5.6.3 ANÁLISIS DE FRACCIONES ACTIVAS MEDIANTE LC-HRMS: METABOLÓMICA

En definitiva, se eligieron para analizar mediante LC-HRMS, 10 fraccionamientos (de los 36) y 16 fracciones activas (correspondientes al rango entre la fracción 35 y la fracción 50) de cada uno de ellos.

Estos 10 fraccionamientos correspondían con los siguientes extractos: CA-117398-a01-MO010-EB04-a03 y CA-117410-a01-MO008-EB04-a03 del grupo de la familia *Pseudonocardiaceae*; CA-142982-a01-MO013-EB04-a03 y CA-179413-a01-MO031-EB04-a03 del grupo de la familia *Micromonosporaceae*; CA-162175-a01-MO007-EB04-a03, CA-178528-a01-MO011-EB0-a03 y CA-179400-a01-MO10-EB04 del grupo de extractos pertenecientes a las cepas cuya taxonomía inicial no había sido identificada; y CA-177328-a01-MO24-EB04-a03, CA-177430-a01-MO25-EB04-a03 y CA-178368-a01-MO007-EB04-a03 del grupo de la familia *Streptomycetaceae*.

Se comparó la presencia de los diferentes valores de m/z en cada una de las fracciones en varios intervalos de m/z de moléculas relacionadas con las ramoplaninas. Estos intervalos de m/z fueron: 723 a 728; 1132 a 1139 y 1155 a 1291. Asimismo, se asociaron la presencia de dichos m/z característicos en las diferentes fracciones activas con los picos de los perfiles cromatográficos de cada fraccionamiento correspondiente (Tabla 19). Como se ve reflejado en la Tabla 21, pudo observarse que los perfiles metabolómicos que se obtenían para las fracciones activas de los 3 extractos pertenecientes al grupo de la familia *Streptomycetaceae* eran muy parecidos entre sí y al mismo tiempo se diferenciaban fácilmente de los obtenidos para las fracciones activas del resto de extractos. También se observaron similitudes entre los perfiles obtenidos para el grupo de la familia *Micromonosporaceae* y *Pseudonocardiaceae*.

Por otro lado, para purificar y aislar nuevas moléculas relacionadas con la ramoplanina, se eligió la cepa CA-178528 ya que según se puede observar en la Tabla 21 era el perfil metabolómico más sencillo de los 10 fraccionamientos elegidos, y en donde de manera sobresaliente en las fracciones 43 y 44 podíamos detectar cantidades abundantes de los

iones m/z 1287 y 1288. Además, esto se correspondía con un pico mayoritario en el cromatograma obtenido en el fraccionamiento (Figura 56).

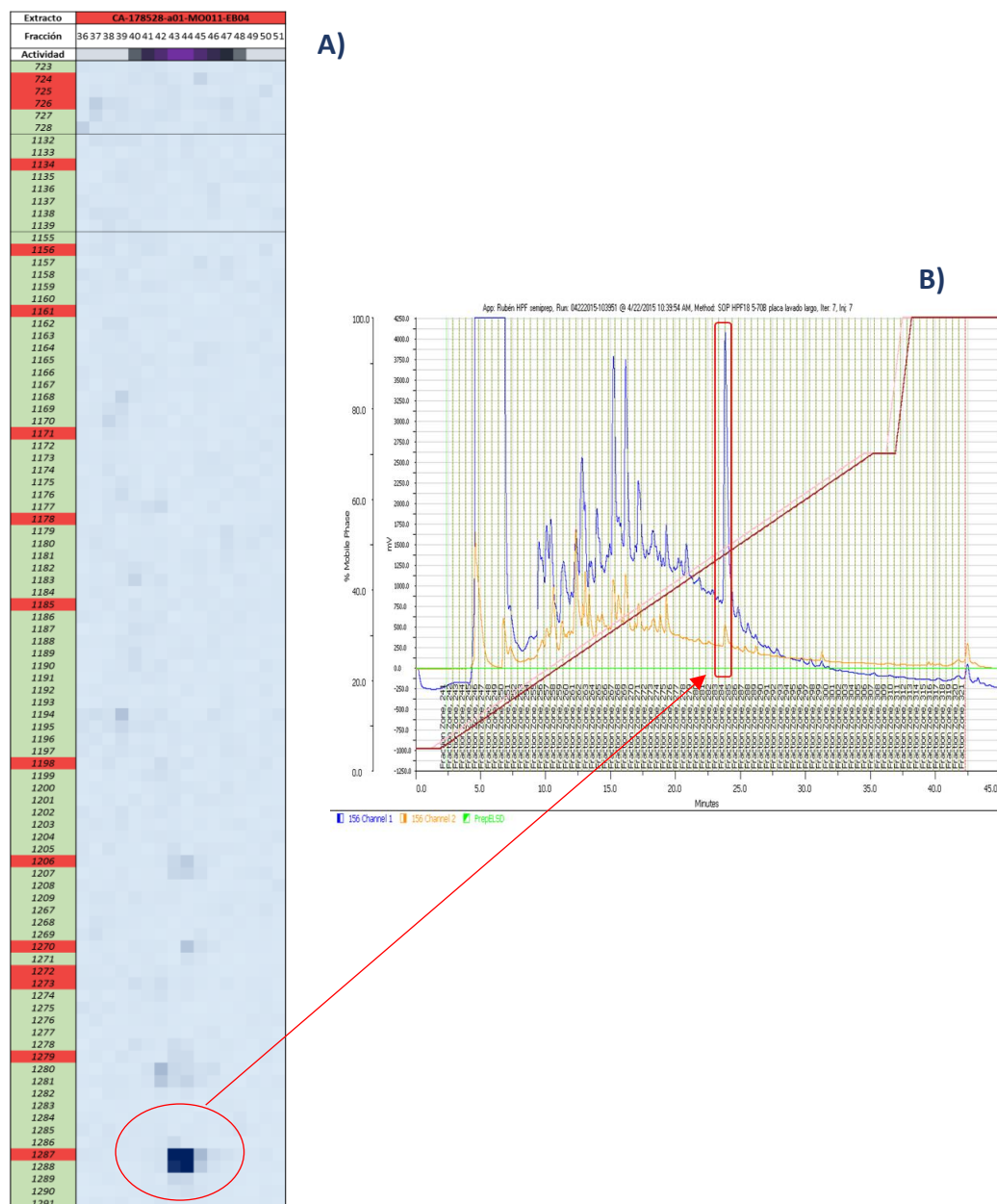
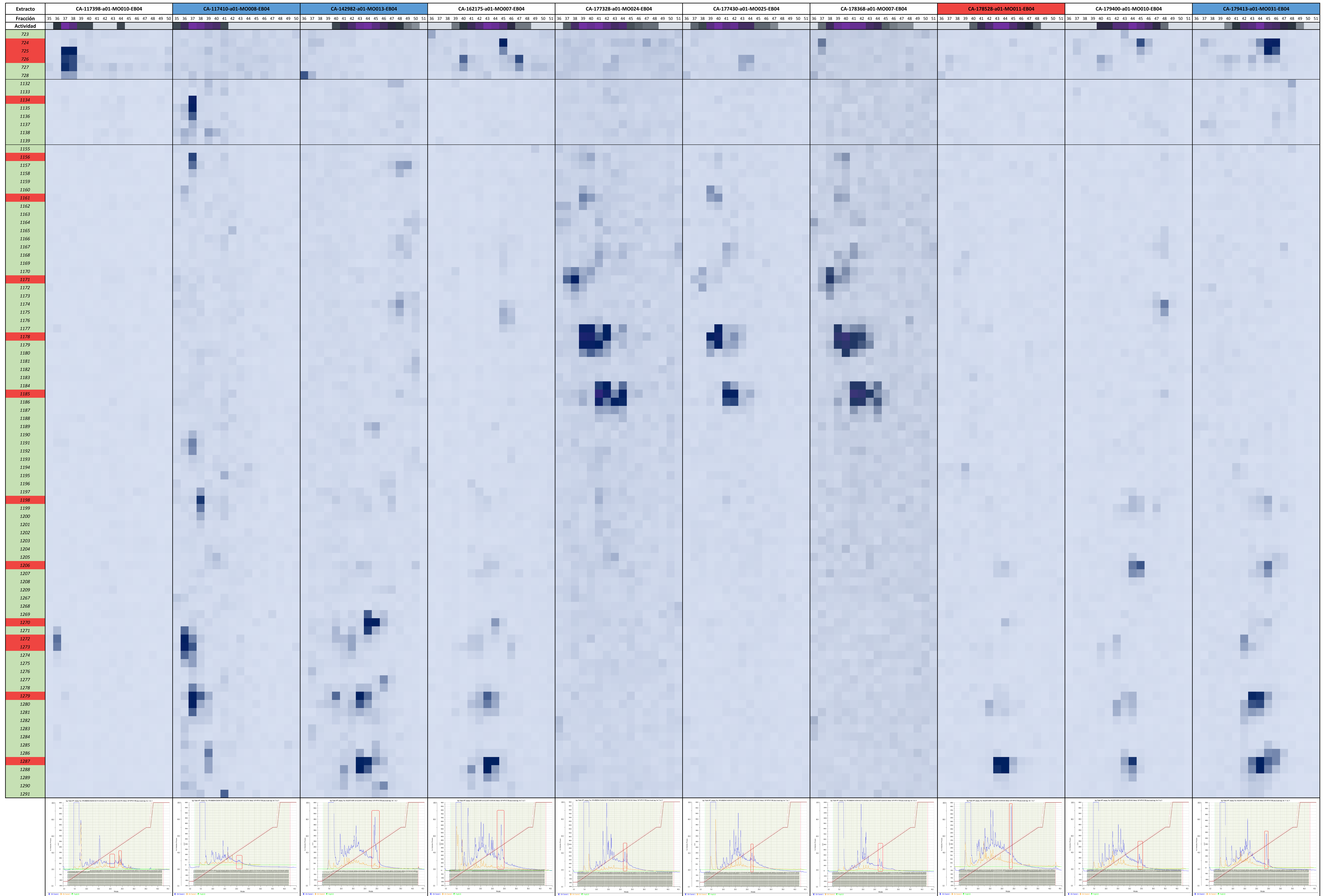


Figura 56. A) Perfil metabólico de las fracciones activas de la cepa CA-178528, y señalados en rojo los iones detectables ($m/z = 1287$) más abundantes **B)** Cromatograma del fraccionamiento semipreparativo del extracto procedente de la misma cepa y señalado en color rojo el pico mayoritario correspondiente con las fracciones activas 43 y 44.

Tabla 21. Comparación actividad vs. fracciones con iones pseudovolúmenes relacionados, con los compuestos, provenientes de los fraccionamientos HPLC comparativos.



5.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2

5.7.1 PURIFICACIÓN DE NUEVO ANÁLOGO A PARTIR DE LA CEPA CA-178528

Una fermentación de 1,5 L de la cepa CA-178528 crecida en medio FR23 durante 13 días se procesó y se extrajo con butanol de la manera anteriormente descrita en el apartado de Materiales y Métodos.

En primer lugar, con una veinteava parte del material que se disponía se realizó un fraccionamiento en fase reversa mediante HPLC en columna preparativa y con un gradiente de acetonitrilo en agua de 5 a 70 % y 0,1 % de TFA. Así se obtuvieron 80 fracciones que se testaron frente al ensayo LiaRS (Figura 57).

(1/20) CA-178528_5-70% ACN/AGUA CON TFA

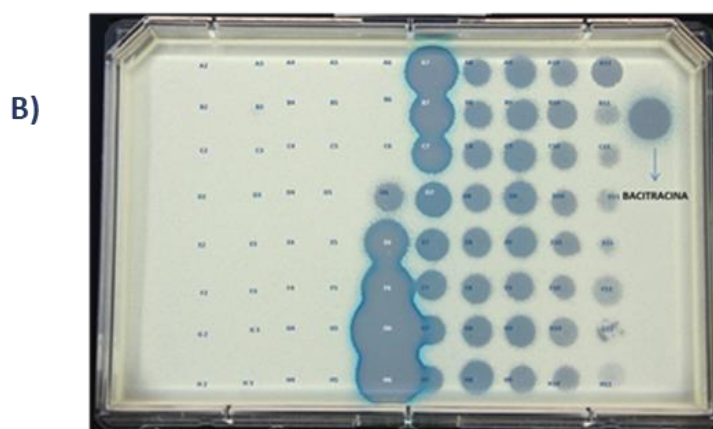
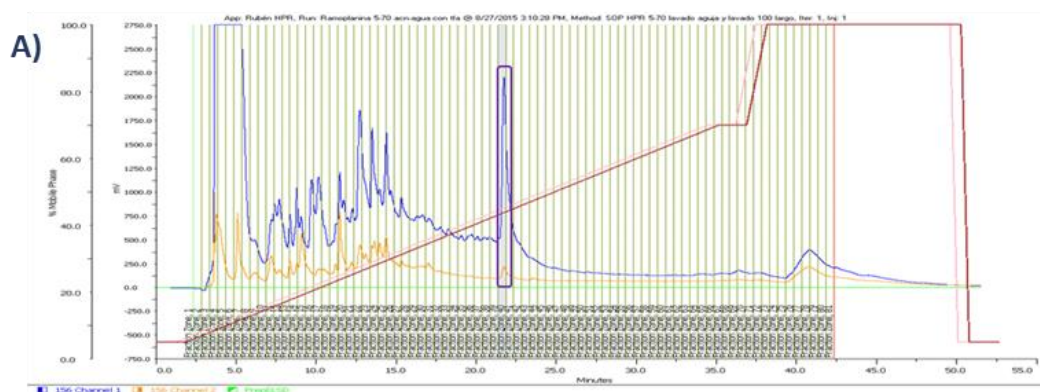


Figura 57. A) Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento preparativo **B)** las fracciones que muestran actividad positiva (halo de inhibición con anillo de color azul) en el ensayo de agar LiaRS.

En el cromatograma de la Figura 57 se señala con un recuadro de color morado el pico cromatográfico que coincide con las fracciones más activas en el ensayo de bioactividad. Mediante el análisis por HRMS de dichas fracciones nos aseguramos de la presencia en ellas de los compuestos de nuestro interés en la fermentación de 1,5 L.

Tras esta comprobación, se fraccionó el resto del material por cromatografía de baja resolución (*flash*) tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos. Obtuvimos así 30 fracciones que de nuevo se testaron frente al ensayo LiARS (Figura 58).

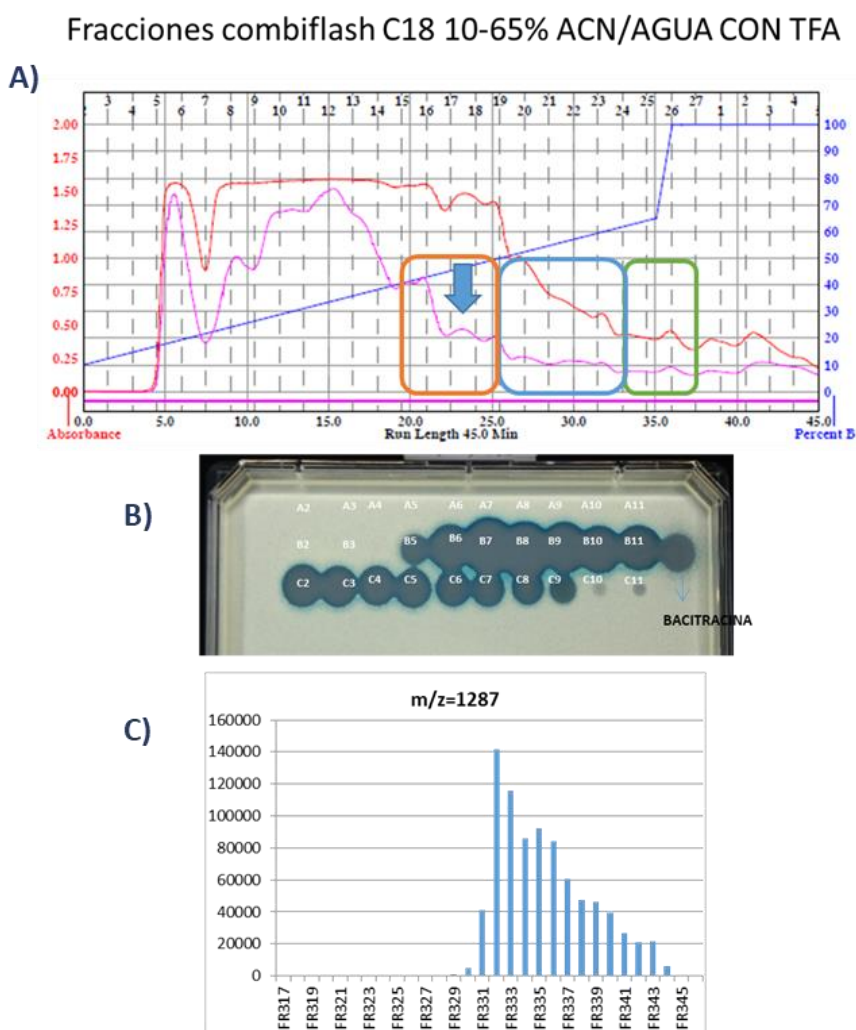


Figura 58. A) Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento de baja precisión. **B)** las fracciones que muestran actividad positiva (halo de inhibición con anillo de color azul) en el ensayo de agar LiARS. **C)** Abundancia relativa de ramoplaninas $m/z = 1287$.

Las fracciones que resultaron activas se agruparon en bloques según la abundancia relativa en ellas de los compuestos de interés teniendo en cuenta para ello las cantidades detectables del ión m/z 1287 que mostraba cada una de ellas así como la de otros componentes. De esta forma, hicimos 3 grupos que en la Figura 58-A aparecen señalados con tres colores diferentes: naranja, azul y verde. De la fracción FR330 a FR333 aparecían las fracciones activas con mayor abundancia y con ellas formamos el grupo de color naranja, con las fracciones FR334 a FR338 que contenían cantidades intermedias formamos el grupo de color azul y con las fracciones FR339 a FR341 se formó el grupo verde que presentaban las menores cantidades (Figura 58-A,C).

Cada uno de estos 3 grupos se fraccionó de nuevo en fase reversa mediante HPLC en columnas preparativas y con un gradiente de acetonitrilo en agua de 5 a 50 % y 0,1 % de TFA obteniéndose a su vez 80 fracciones por grupo, que se testaron frente al ensayo LiRS para determinar la correlación entre los picos cromatográficos y su actividad (Figura 59, Figura 60 y Figura 61).

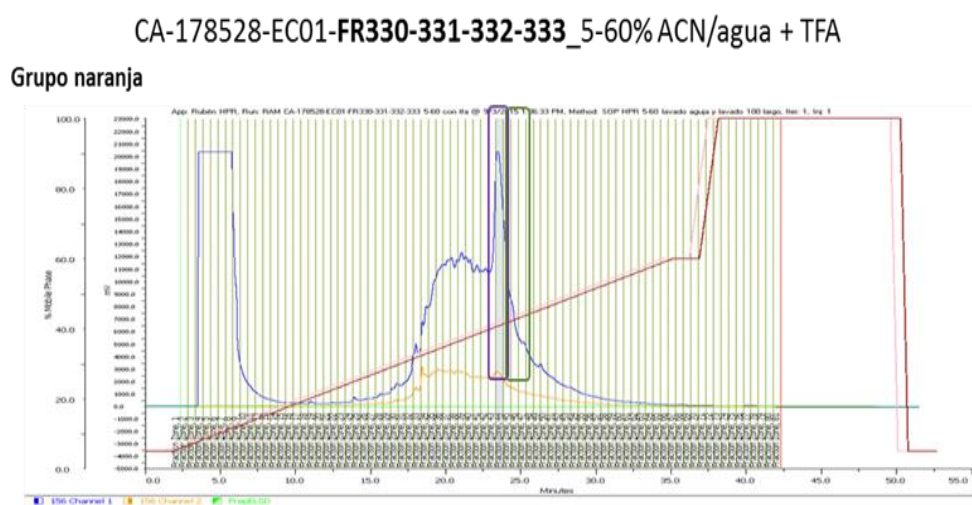


Figura 59. Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento preparativo del grupo naranja de fracciones activas.

CA-178528-EC01-FR334-335-336-337-338_5-60% ACN/agua + TFA
Grupo azul

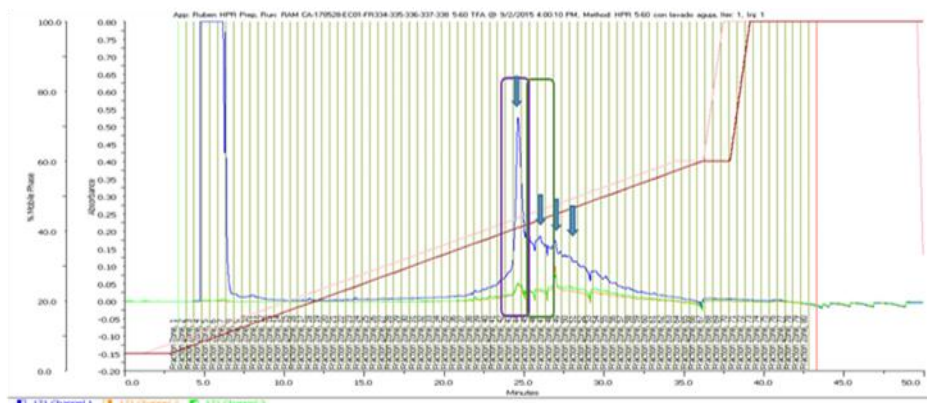


Figura 60. Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento preparativo del grupo azul de fracciones activas. Los picos cromatográficos que presentaron actividad frente al ensayo LiARS se encuentran señalados.

CA-178528-EC01-FR339-340-341_5-60% ACN/agua + TFA
Grupo verde

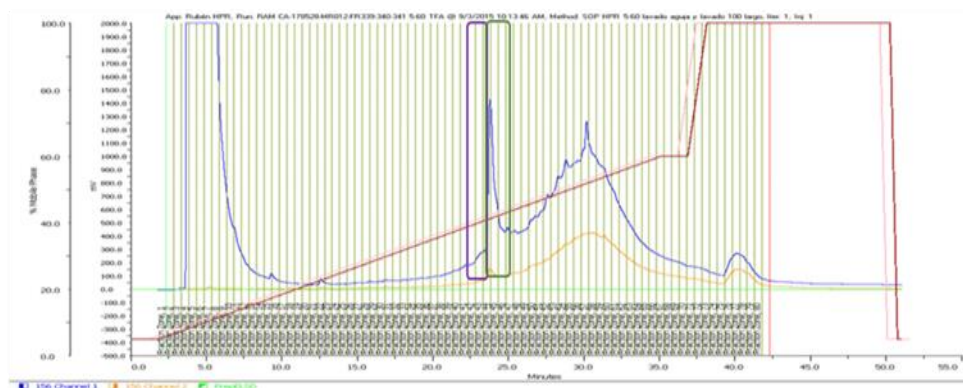
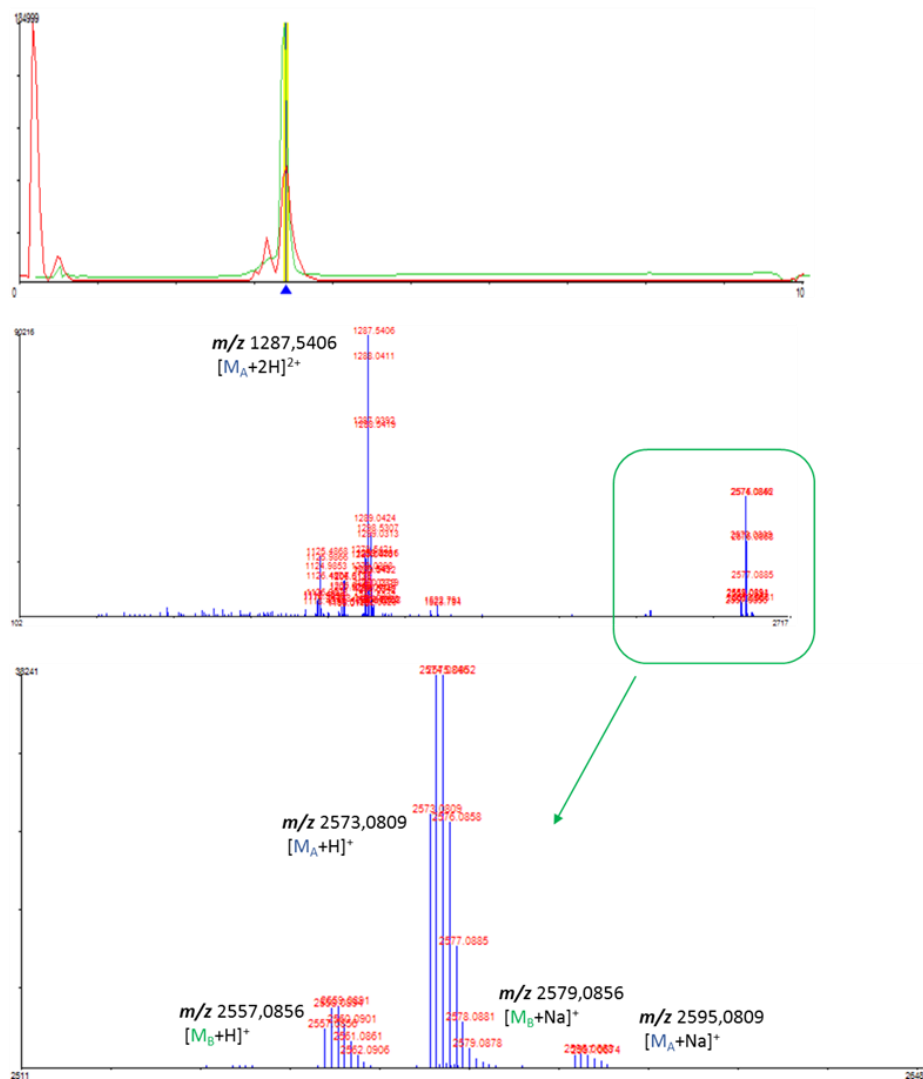


Figura 61. Cromatograma obtenido al realizar el fraccionamiento preparativo del grupo verde de fracciones activas.

Las 4 fracciones activas del grupo azul, señaladas con flechas en el cromatograma de la Figura 60 se analizaron por LCMS. Se comprobó entonces que en 2 de las fracciones se encontraban compuestos relacionados con las ramoplaninas en diferentes proporciones. Los iones detectados se nombraron M_A , M_B y M_C , según el caso (Figura 62 y Figura 63). En las otras 2 fracciones no se detectaron compuestos relacionados con las ramoplaninas (Figura 64 y Figura 65).

Sample Name: CA-178528-a01-MR012-EC01-FR334-FH042-a01
Sample ID: \\maXis01\D\Data\20150902\A178528R012C01R334H042.d
Plate Pos: V03
RT: 3.40
Area: 6486237
Intensity: 835805
Signal To Noise: 30659
Suggested mass: 2573.0773
Suggested formula:
Medina ID: MED-118807



Sample Name: CA-178528-a01-MR012-EC01-FR334-FH045-a01
Sample ID: \\maXis01\D\Data\20150902\A178528R012C01R334H045.d
Plate Pos: V04
RT: 3.52
Area: 1625080
Intensity: 248110
Signal To Noise: 6269
Suggested mass: 1000.5713
Suggested formula:
Medina ID: MED-124839

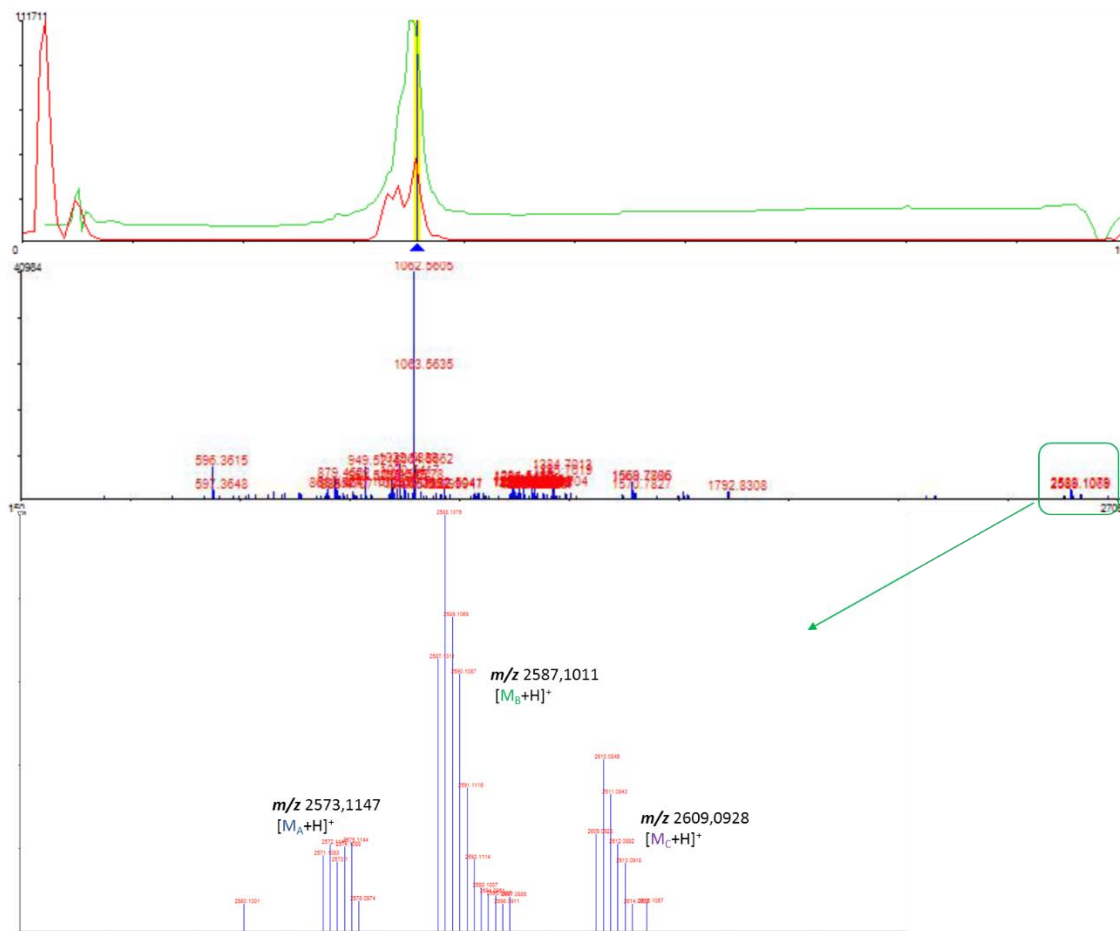


Figura 63. Análisis por LCMS de la segunda fracción activa del grupo azul. Se muestra espectro de masas de alta resolución donde aparecen los iones m/z 2573,1147 [M_A+H]⁺, m/z 2587,1011 [M_B+H]⁺ y m/z 2609,0928 [M_C+H]⁺. Se confirma la presencia de tres compuestos de pesos moleculares: M_A 2572,1147 en una proporción relativa de aproximadamente el 15%, M_B 2556,1011 en una proporción relativa de aproximadamente el 60% y M_C 2608,0928 en una proporción relativa de aproximadamente el 25%.

A la vista de estos resultados se volvieron a agrupar solo las fracciones activas que presentaban ramoplaninas detectadas por LCMS (Figura 62 y Figura 63) y se realizó un fraccionamiento isocrático al 28% de acetonitrilo/agua en el que se pudieron distinguir 2 picos principales señalados con flechas azules en la Figura 66. Uno de los picos comprende desde la fracción 20 a la 45 y el segundo desde la fracción 46 a la 60.

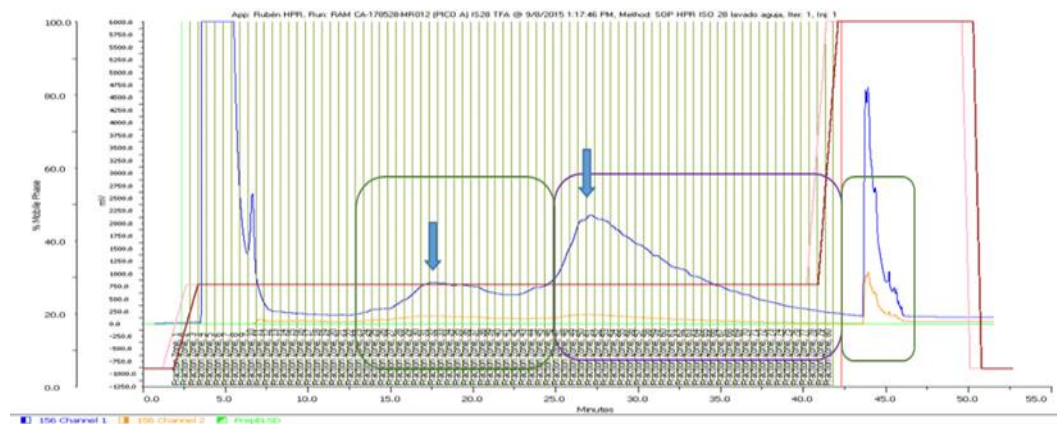


Figura 66. Cromatograma del fraccionamiento isocrático con 28% de ACN/H₂O de las fracciones activas donde se confirmó la presencia de *m/z* de ramoplaninas.

El primer grupo de fracciones (FR20 a FR45) provenientes del fraccionamiento isocrático se agrupó y se realizó un fraccionamiento en fase reversa mediante HPLC en columna preparativa (Figura 67) donde se obtuvo una fracción activa de cuyo análisis por LCMS se confirmó la presencia de una mezcla de 2 compuestos con peso molecular 2556 y 2572 (Figura 68).

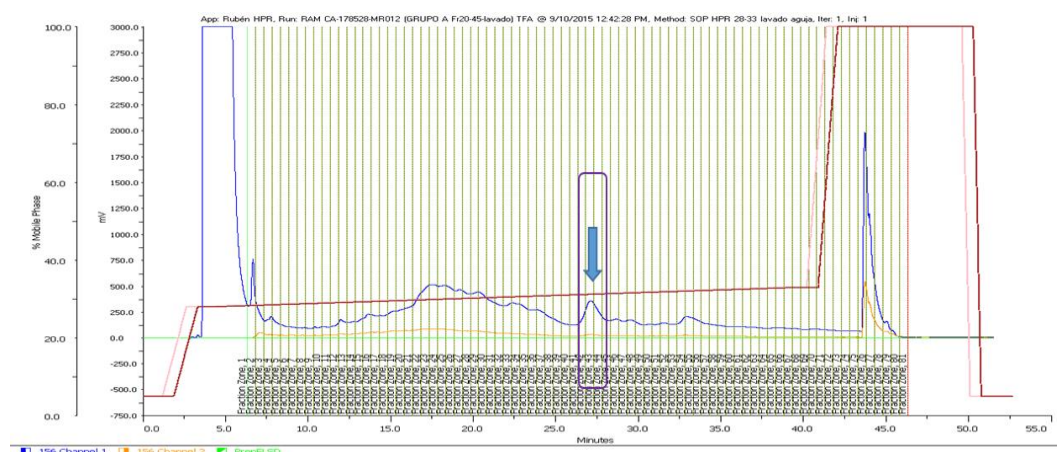


Figura 67. Cromatograma del fraccionamiento preparativo de las fracciones 20 a 45 y señalada con una flecha de color azul la fracción activa que posteriormente se analizó por LCMS (ver Figura 68).

Sample Name: CA-178528-MR012-Fr42
 Sample ID: \\maXis01\D\Data\20150908\CA-178528-MR012-Fr42.d
 Plate Pos: V04
 RT: 3.44
 Area: 2675578
 Intensity: 378137
 Signal To Noise: 9250
 Suggested mass: 1308.5148
 Suggested formula:
 Medina ID: MED-118795

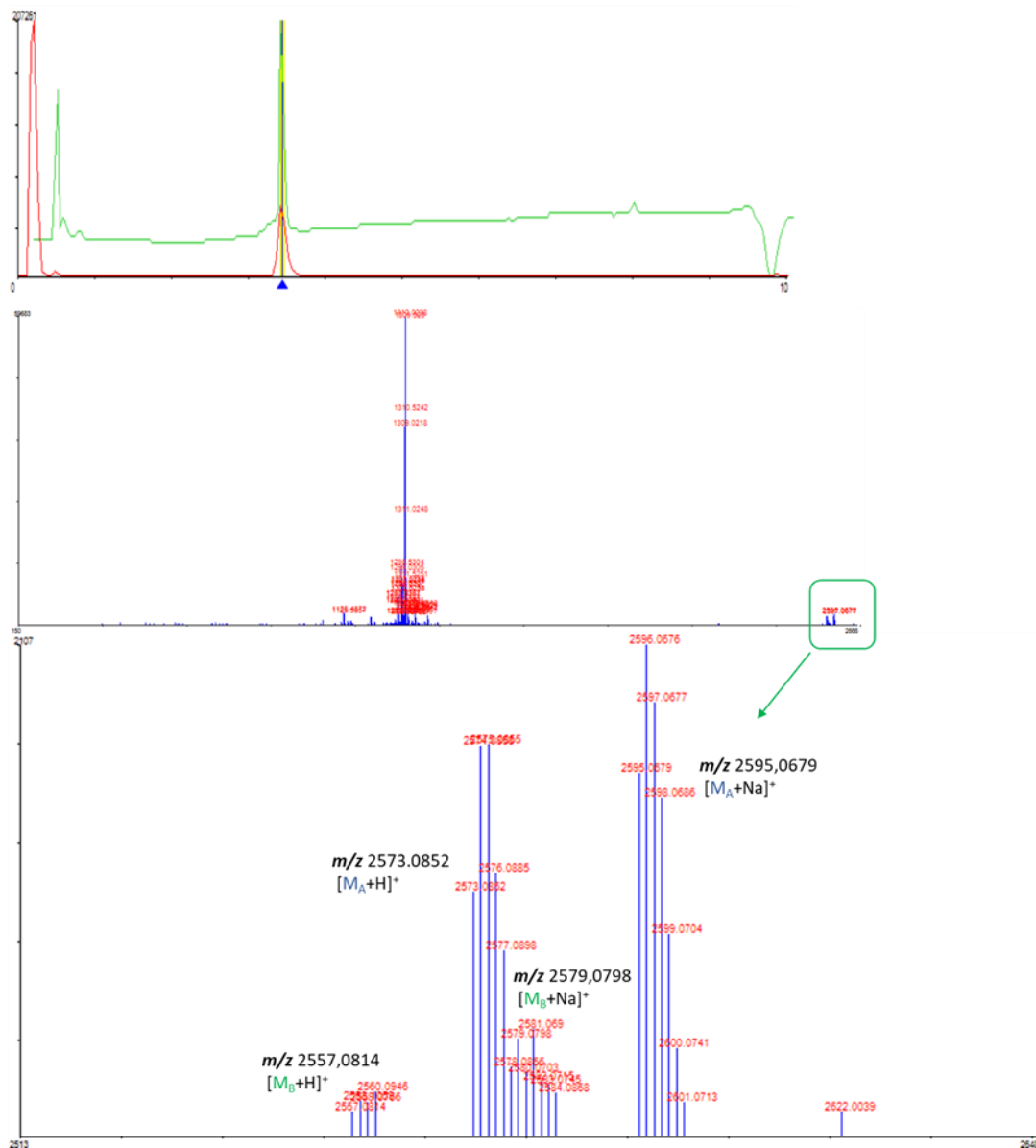


Figura 68. Análisis por LCMS de la fracción activa del fraccionamiento preparativo de las fracciones 20 a 45 (Figura 67). Se confirma la presencia de dos compuestos, uno de peso molecular M_A 2572,0852 en una proporción relativa de aproximadamente el 90% y otro M_B 2556,0814 en una proporción relativa de aproximadamente el 10%.

Por otro lado, del segundo grupo de fracciones (FR46 a FR60) provenientes del fraccionamiento isocrático (Figura 66), se analizó mediante LCMS la fracción 50 que

correspondía con el máximo del pico del cromatograma. En ella, se detectaron dos compuestos de peso molecular 2572 y 2556 en una proporción relativa de 90% a 10% respectivamente (Figura 69).

Sample Name: CA-178528-MR012-Fr50
Sample ID: \\maXis01\D\Data\20150908\CA-178528-MR012-Fr50.d
Plate Pos: V04
RT: 3.41
Area: 6503649
Intensity: 891899
Signal To Noise: 34554
Suggested mass: 2574.0662
Suggested formula:
Medina ID: MED-124785

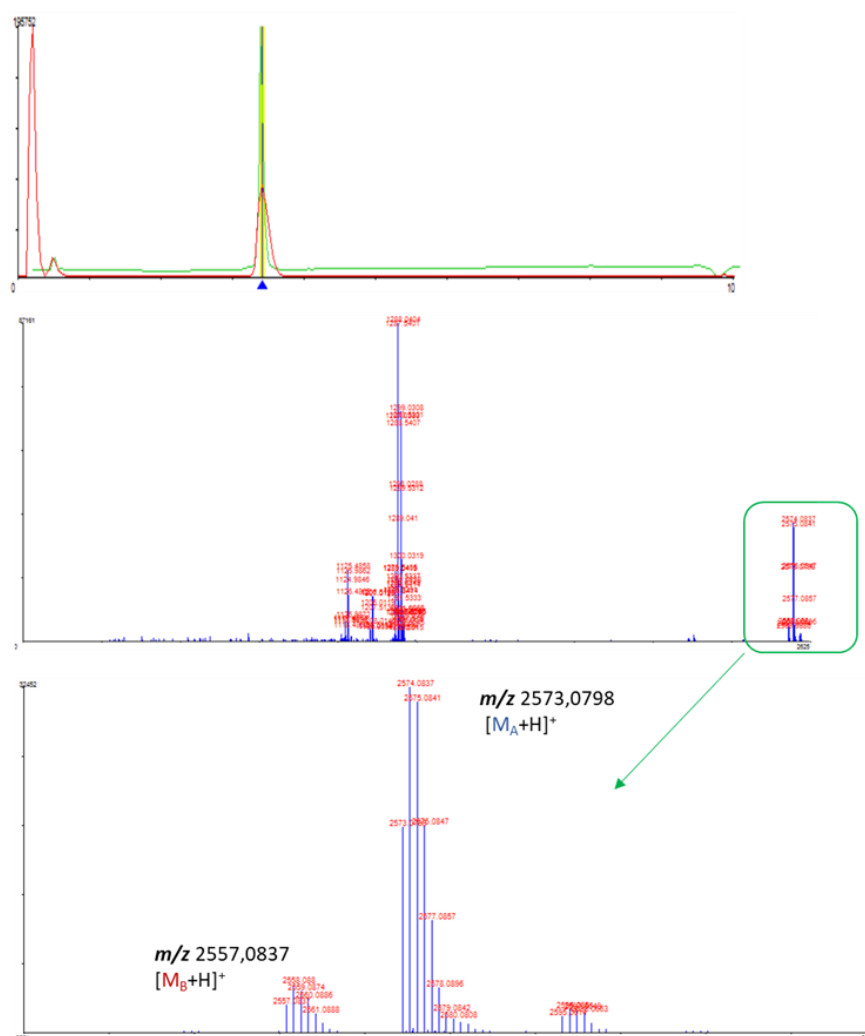


Figura 69. Análisis por LCMS de la fracción 50 correspondiente con el máximo del pico del segundo grupo de fracciones activas del cromatograma del fraccionamiento isocrático. Se muestra espectro de masas de alta resolución donde se detectó la presencia de dos compuestos de peso molecular 2572 y 2556 en una proporción relativa de 90% a 10% respectivamente.

En base a la similitud en proporciones relativas de las dos ramoplaninas 2572 y 2556, de sus LCMS, se agruparon en un único lote que presentó un peso seco de 3,6 mg.

5.8 ESTRUCTURA DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2

5.8.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ANÁLOGO “Ramoplanina_2572”

La elucidación estructural del nuevo análogo de la ramoplanina A2 a la que hemos denominado “ramoplanina_2572” en referencia a su peso molecular, se basó en el análisis de los datos obtenidos mediante diferentes técnicas espectroscópicas.

Con la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvo información sobre su peso y su fórmula molecular, así como de los fragmentos clave de la molécula, y la estructura plana y la estereoquímica relativa se obtuvieron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) monodimensional y bidimensional. Por comparación con un patrón de ramoplanina A2, se realizó la hipótesis estructural de la nueva molécula.

En la Figura 70 se muestran las estructuras de ambos compuestos y se destacan en dos colores distintos los aminoácidos en los que se diferencian. De este modo se observan en color azul el aminoácido 13 hidroxifenilglicina (Hpg-13) y la leucina (Leu) de la ramoplanina A2, y en color rojo el aminoácido 13 dihidroxifenilglicina (Dhpg-13) y la valina (Val) de la ramoplanina_2572. Además, en esta misma figura se puede apreciar la diferencia en la cadena lateral entre ambas moléculas, que es saturada y más larga (un metileno) en el caso de la ramoplanina_2572.

5.9 PERFIL BIOLÓGICO DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2

5.9.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *C. difficile*, SARM, *E. faecalis* Y *E. faecium*

La ramoplanina A2 se caracteriza por presentar una excelente actividad específica frente a bacterias Gram-positivas aeróbicas y anaeróbicas abarcando especies diferentes de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* y *C. difficile*, e incluyendo cepas resistentes a diversos antibióticos, tales como enterococos resistentes a vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a metilicina (SARM) y cepas de *C. difficile* con resistencia a metronidazol o sensibilidad reducida frente a vancomicina.

Por este motivo se determinó la actividad antimicrobiana de la ramoplanina_2572 (nuevo análogo) frente a los patógenos más relevantes anteriormente mencionados, en paralelo con la ramoplanina A2 y con otros antibióticos de primera línea en uso actualmente recomendado en la clínica según el microorganismo del que se trate. El objetivo ha sido determinar si las propiedades de la nueva molécula eran mejores, peores o iguales a los antibióticos conocidos.

5.9.1.1 *Clostridium difficile* (*Clostridioides difficile*)

Las infecciones por *C. difficile* (ICD) representan un gran desafío en cuanto a su tratamiento debido principalmente al número limitado de antibióticos disponibles y a su alta incidencia y recurrencia que además va en aumento.

Este bacilo Gram-positivo, anaerobio estricto y formador de esporas se ha convertido en uno de los principales patógenos gastrointestinales para el ser humano y es la causa principal de diarrea nosocomial. Actualmente, las cifras relativas a la infección provocada por *C. difficile* son alarmantes. La tasa de mortalidad oscila entre el 3% y el 15% y la tasa de recurrencia varía entre el 12% y el 40%, aumentando hasta el 64% el riesgo de recurrencias posteriores a la primera (Petrosillo *et al.*, 2018). Además, de acuerdo con la literatura revisada entre el 15% y el 25% de los casos están asociados al tratamiento con antibióticos, principalmente ampicilina, cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y clindamicina (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018).

La paradoja del tratamiento de ICD es que a pesar de que la exposición a los antibióticos es uno de los principales factores de riesgo, a su vez es la opción terapéutica de primera línea (Chilton *et al.*, 2017). Hoy por hoy los fármacos para tratar esta infección son

metronidazol, vancomicina y fidaxomicina y se administra uno u otro en función de la severidad de la misma. Sin embargo, las opciones de tratamiento frente a ICD se quedan cortas dada la disminución en la eficacia del metronidazol, a que el uso generalizado de la vancomicina favorece el desarrollo de enterococos resistentes dentro de los hospitales, y a que el empleo de la fidaxomicina es bastante restringido debido a su elevado coste. Es por tanto evidente la urgencia en encontrar nuevos antibióticos para combatir esta enfermedad. En este escenario la ramoplanina A2 es uno de los antibióticos que se encuentran en este momento en fase de desarrollo para el tratamiento de ICD (Basseres *et al.*, 2017; Petrosillo *et al.*, 2018).

En nuestro estudio, se probó en paralelo la actividad de la vancomicina, metronidazol, ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 frente a la cepa de referencia *C. difficile* ATCC700057 y frente a 6 diferentes aislados clínicos de *C. difficile* cedidos por el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

Como puede verse en la Tabla 22, la ramoplanina A2 y la ramoplanina_2572 presentaron un perfil muy similar de actividad. Los valores de CMI obtenidos fueron iguales para todos los aislados clínicos salvo para dos de ellos (aislado 2 y aislado 6) en cuyo caso solo se diferenciaron en un punto de concentración (0,125 µg/mL para ramoplanina A2 y 0,25 µg/mL para ramoplanina_2572). Lo mismo se observó para la cepa de referencia *C. difficile* ATCC700057 frente a la que la ramoplanina A2 presentó un valor de CMI de 0,25 µg/mL mientras que el nuevo análogo presentó un valor de 0,5 µg/mL.

<i>C. difficile</i>	CMI [µg/mL]			
	Metronidazol	Vancomicina	Ramoplanina A2	Ramoplanina_2572
Aislado clínico 1	0.122	2	1	1
Aislado clínico 2	0.125	0.5	0.12	0.25
Aislado clínico 3	0.125	0.5	≤ 0.06	≤ 0.06
Aislado clínico 4	0.125	0.25	≤ 0.06	≤ 0.06
Aislado clínico 5	0.25	0.25	≤ 0.06	≤ 0.06
Aislado clínico 6	0.5	0.25	0.125	0.25
ATCC 700057	0.5	2	0.25	0.5

Tabla 22. Valores de CMI [µg/mL] de metronidazole, vancomicina, ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 frente a *C. difficile* ATCC 70057 y frente a varios aislados clínicos cedidos por el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

Ambas ramoplaninas superaron los valores de actividad de la vancomicina en todos los ensayos realizados, destacando principalmente los buenos valores de CMI que mostraron frente a los aislados clínicos 3, 4 y 5. Asimismo, tanto la ramoplanina A2 como la ramoplanina_2572 presentaron mejores actividades que el metronidazol frente a la mayoría de aislados, a excepción del aislado 1.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que en general ambas ramoplaninas tienen mejores propiedades antibacterianas que la vancomicina y el metronidazole frente a *C. difficile*, hecho por otro lado descrito con anterioridad para la ramoplanina A2 (Peláez *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2013).

5.9.1.2 SARM, *E. faecalis* y *E. faecium*

Staphylococcus aureus y *Enterococcus* spp. son entre las bacterias Gram-positivas las principales responsables de infecciones hospitalarias y comunitarias con mayor tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, siendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y los enterococos resistentes a vancomicina (ERV) los patógenos que plantean mayores retos terapéuticos (Cercenado, 2016). Además, tanto *Staphylococcus aureus* como *Enterococcus faecium* forman parte del grupo de los patógenos llamados ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacteriaceae*) que presentan resistencia a varios antibióticos y que “escapan” de la acción de la mayoría de las opciones terapéuticas disponibles (Arias y Murray, 2009).

Durante mucho tiempo la vancomicina ha sido el antibiótico de primera línea frente a *S. aureus* resistente a meticilina, aunque no dejan de buscarse tratamientos alternativos a ella debido tanto a la emergencia de cepas con sensibilidad disminuida a este antibiótico como a los efectos secundarios que provoca.

Además, la vancomicina se ha quedado obsoleta frente a los enterococos (Rincón *et al.*, 2014) ya que han adquirido genes de resistencia a dicho compuesto (siendo VanA y VanB los dos fenotipos más frecuentes) y pese a que se les consideraba microorganismos de baja capacidad patógena, hoy en día representan un gran desafío terapéutico debido tanto a la rapidez con la que se han diseminado y como a la alta frecuencia con la que se aíslan enterococos con resistencia intrínseca a gran variedad de antibióticos. La mayoría de los aislados clínicos de este tipo corresponden con *E. faecium* y *E. faecalis* y actualmente ambos son una de las principales causas de infección nosocomial.

Así pues, el tratamiento para infecciones producidas por cocos Gram-positivos multirresistentes supone un reto clínico de gran envergadura a pesar de la disponibilidad de algunos nuevos, tales como linezolid, daptomicina y tigeciclina dado que estos patógenos continúan adaptándose y desarrollando nuevos mecanismos de resistencia sumado a la pérdida de efectividad de los antibióticos en uso y (Rincón *et al.*, 2014).

En la bibliografía se describe que la ramoplanina A2 tiene muy buena actividad frente a *E. faecalis*, *E. faecium* y *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a vancomicina (Johnson *et al.*, 1992; Rolston *et al.*, 1996; Montecalvo, 2003; Bionda *et al.*, 2013), razón por la cual se evaluó la actividad de la nueva molécula (ramoplanina_2572) frente a estos patógenos y en paralelo con la propia ramoplanina A2 y con otros antibióticos tales como bacitracina, eritromicina, meticilina, tunicamicina y vancomicina. Los ensayos se llevaron a cabo en ausencia y presencia de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,01% basándonos en los datos publicados en los que se demostraba la conveniencia de añadir una pequeña cantidad de proteína para obtener unos resultados fiables en los ensayos de susceptibilidad, ya que esto evita que la ramoplanina quede adherida a la superficie de plástico de las placas multipocillos con las que se realizan estos experimentos (Cheng *et al.*, 2014; Kenny y Brackman, 1994; Scotti *et al.*, 1993).

En el anexo 3 se muestran las curvas dosis respuesta obtenidas para cada uno de los antibióticos mencionados anteriormente, más las curvas de la ramoplanina y la ramoplanina_2572 frente a los diferentes patógenos y en ambas condiciones (con y sin BSA). Se aprecia a simple vista cómo la adición de la albúmina de suero bovino influye en los valores de CMI obtenidos en el caso de las ramoplaninas, mientras que para el resto de los antibióticos la presencia de BSA no afecta a los resultados. Así pues, todos los datos que a continuación se discuten proceden de la condición con BSA que se confirma como la más fiable tal y de acuerdo con lo descrito en la bibliografía.

En general, ambas ramoplaninas presentaron valores de CMI y de CI_{50} (Tabla 23 y Tabla 24) mejores que el resto de los compuestos que se testaron frente a cualquiera de los cuatro patógenos seleccionados en este estudio.

En concreto, tanto la ramoplanina A2 como la nueva molécula, ramoplanina_2572, fueron muy superiores en la actividad mostrada frente a *E. faecalis*, *E. faecium* (VS) sensible a vancomicina y *E. faecium* (VR) resistente a vancomicina, dando lugar a valores de CMI entre 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de CI_{50} entre 0,25 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso de la ramoplanina A2 y

valores de CMI entre 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de IC_{50} entre 0,25 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso de la ramoplanina_2572. El resto de los antibióticos no mostraron actividad frente a ninguno de estos tres microorganismos excepto, muy ligeramente, la tunicamicina (CMI entre 64-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; IC_{50} entre 16-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

ANTIBIÓTICO	CMI [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			
	<i>SARM</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> (VS)	<i>E. faecium</i> (VR)
Bacitracina	>64	>64	>64	>64
Eritromicina	0.5	>64	>64	>64
Meticilina	>64	64	>64	>64
Ramoplanina A2	0.5	0.5	0.5	1
Ramoplanina 2572	4	4	4	8
Tunicamicina	64	32-64	32	64
Vancomicina	4	>64	>64	>64

Tabla 23. Valores de CMI [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de bacitracina, eritromicina, metilina, ramoplanina A2, ramoplanina_2572, tunicamicina y vancomicina frente a *SARM*, *E. faecalis*, *E. faecium* (VS): sensible a vancomicina y *E. faecium* (VR): resistente a vancomicina.

Frente a *SARM*, se obtuvieron valores de CMI iguales a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de IC_{50} entre 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tanto para la ramoplanina_2572 como para la vancomicina, mientras que la eritromicina y la ramoplanina A2 mostraron los valores más bajos tanto de CMI (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como de IC_{50} (0,5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0,25-0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como era de esperar, la metilina no mostró ninguna actividad frente a este patógeno, y la bacitracina y tunicamicina muy ligera actividad.

ANTIBIÓTICO	CI_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			
	<i>SARM</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> (VS)	<i>E. faecium</i> (VR)
Bacitracina	32-64	>64	>64	>64
Eritromicina	0.25-0.5	>64	>64	>64
Meticilina	>64	32-64	>64	>64
Ramoplanina A2	0.5-1	0.25-0.5	0.25-0.5	0.5-1
Ramoplanina 2572	2-4	2-4	2-4	4-8
Tunicamicina	32-64	16-32	16-32	32-64
Vancomicina	2-4	>64	64	>64

Tabla 24. Valores de CI_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de bacitracina, eritromicina, metilina, ramoplanina A2, ramoplanina_2572, tunicamicina y vancomicina frente a *SARM*, *E. faecalis*, *E. faecium* (VS): sensible a vancomicina y *E. faecium* (VR): resistente a vancomicina.

En la Figura 71, se pueden observar y comparar las curvas dosis-respuesta de la ramoplanina A2, de la ramoplanina_2572 y de la vancomicina frente a *SARM* y frente a los tres enterococos seleccionados para este estudio. Sin duda, se pone de manifiesto la buena actividad que poseen ambas ramoplaninas frente a los cuatro patógenos en comparación con la vancomicina, que venía siendo el tratamiento antimicrobiano convencional, hecho que apoyaría el uso de estas ramoplaninas como nueva alternativa terapéutica.

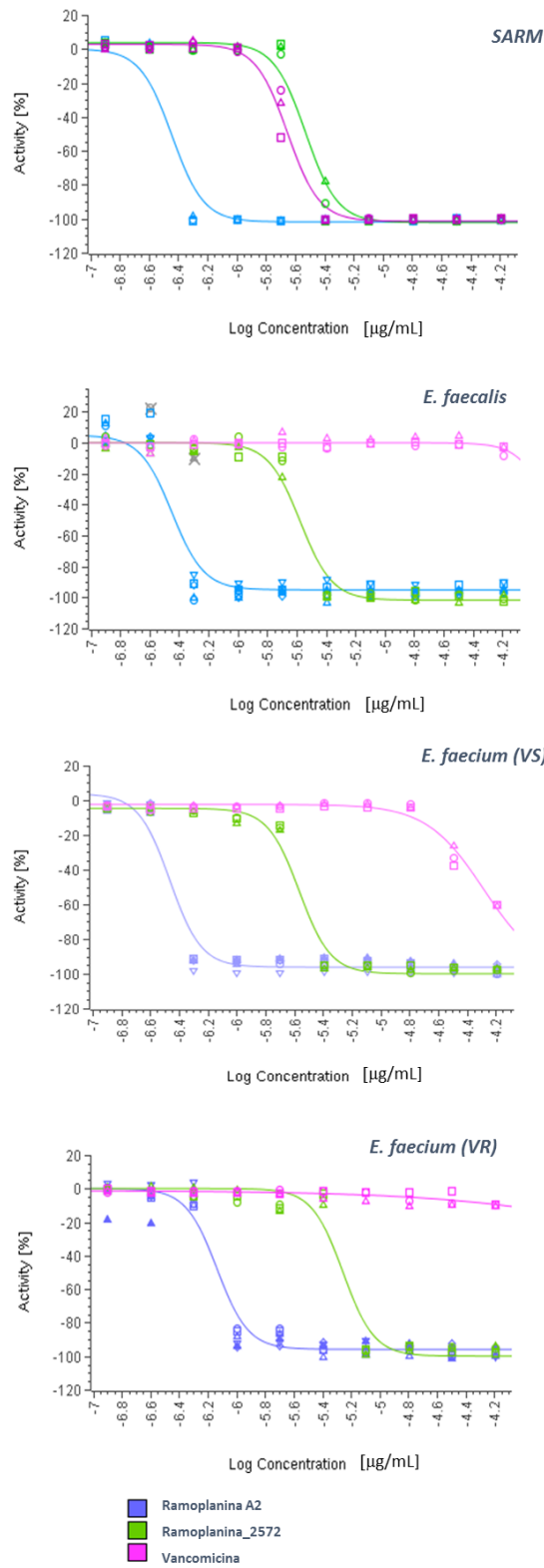


Figura 71. Curvas dosis respuesta de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572 y vancomicina respectivamente, frente a los cuatro patógenos seleccionados en este estudio.

5.10 PERFIL FARMACOLÓGICO DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA A2

5.10.1 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CITOCROMOS

Las interacciones entre medicamentos son procesos derivados de la administración conjunta, de manera simultánea o de manera sucesiva, de diferentes fármacos dando lugar a una modificación cuantitativa o cualitativa del efecto de los mismos y cuyo resultado puede ser una reacción adversa o la pérdida de efecto terapéutico de estos.

La inhibición de la actividad catalítica de las diferentes isoformas del citocromo P450 es de gran importancia clínica ya que este proceso es, en parte, responsable de las interacciones que se producen entre los medicamentos. Por ejemplo, si un fármaco inhibe el metabolismo mediado por CYP450 de otro fármaco, el segundo fármaco puede acumularse dentro del cuerpo a niveles tóxicos lo que en algunos casos puede poner en riesgo la vida de los pacientes. Por eso, el conocimiento previo *in vitro* de las posibles propiedades de inhibición del CYP450 por parte de moléculas candidatas a fármacos se hace relevante. Tanto la FDA (Food and Drug Administration)(FDA Guidelines, 2017) como la EMA (European Medicines Agency) recomiendan evaluar la inhibición del citocromo P450 para estudios de interacción entre medicamentos (EMA Guidelines, 2012).

En nuestro caso, se realizaron los ensayos enzimáticos de tres de las principales isoformas de CYP450 (CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6) incubando con la ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 para determinar la posible pérdida de actividad en el metabolismo del citocromo ocasionada por la presencia de los compuestos de nuestro interés. En relación a los estudios *in vitro* llevados a cabo con CYP3A4 se obtuvo como resultado que ambos compuestos, a las concentraciones más altas ensayadas (87,5µM), producían una disminución en la formación de la forma hidroxilada de la testosterona (sustrato específico de esta isoforma). El mismo comportamiento se observó en los ensayos realizados con CYP2D6 y con CYP2C9, donde a las concentraciones más altas ensayadas de ambas moléculas (87,5µM), la formación del producto de la reacción de desmetilación para el dextrometorfano (sustrato específico de CYP2D6) y de la reacción de hidroxilación para el diclofenaco (sustrato específico de CYP2C9) también se vieron disminuidas respectivamente.

En la Tabla 25 se presentan los valores de la concentración que inhibe la formación del producto específico al 50% (CI₅₀) según la isoforma correspondiente, tanto para la

ramoplanina A2 como para la ramoplanina_2572, así como para los compuestos utilizados como controles de cada ensayo.

Compuesto	CYP3A4 (Testosterona)	CYP2C9 (Diclofenaco)	CYP2D6 (Dextrometorfano)
Ramoplanina_2572	30.7	63.3	48.8
Ramoplanina A2	26.4	27.1	28.2
Ketoconazol	0.03	NA	NA
Sulfafenazol	NA	0.59	NA
Quinidina	NA	NA	0.09

Tabla 25. Valores de CI_{50} obtenidos para Ramoplanina A2, Ramoplanina_2572 e inhibidores conocidos para las isoformas CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6.

La calidad de los experimentos realizados se determinó mediante el parámetro estadístico factor Z' , obteniéndose en los 3 casos valores superiores al 0,8 (en CYP3A4 igual a 0,8325, en CYP2C9 igual a 0,9134 y por último en CYP2D6 igual a 0.8549). Además los compuestos utilizados como controles inhibidores para cada isoforma, ketoconazol (CYP3A4), quinidina (CYP2D6) y sulfafenazol (CYP2C9) mostraron valores similares a los obtenidos en las validaciones previas de los ensayos así como a los datos que se encuentran en la bibliografía (Di Marco *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2008).

Las curvas dosis respuesta obtenidas en los experimentos realizados con ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 y también las de los inhibidores descritos para cada isoforma, se muestran a continuación en la Figura 72 para CPY3A4, en la Figura 73 para CYP2C9 y en la Figura 74 para CYP2D6.

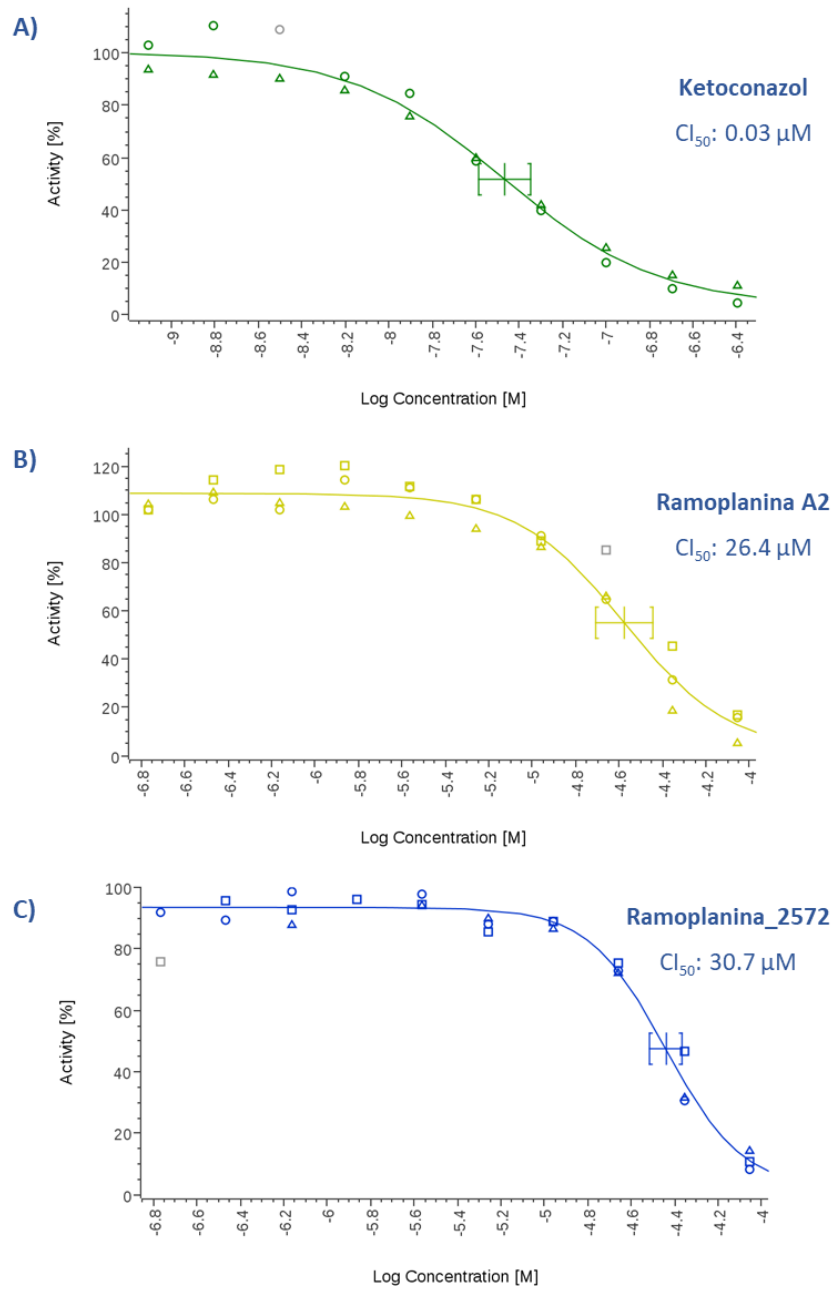


Figura 72. Inhibición CYP3A4. **A)** Curva dosis-respuesta para ketoconazol **B)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina A2. **C)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina_2572.

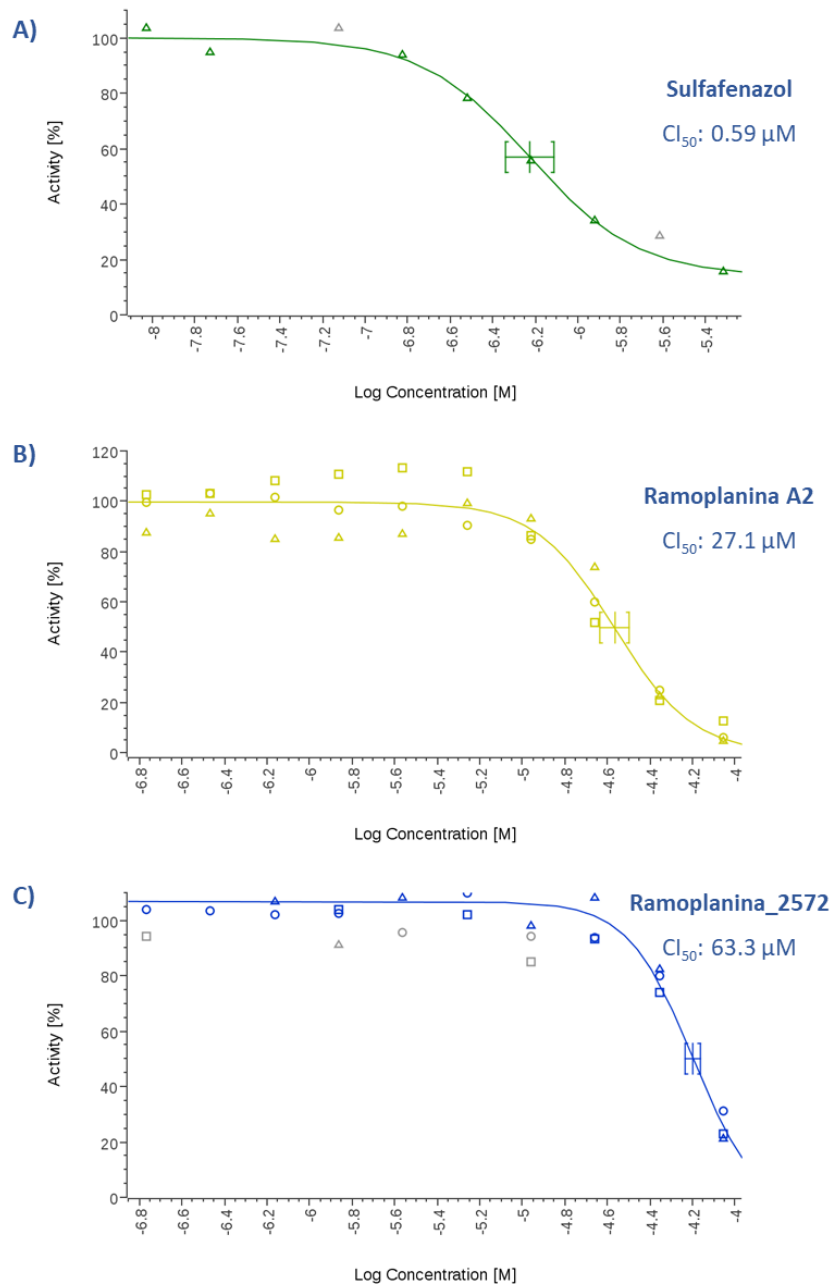


Figura 73. Inhibición CYP2C9. **A)** Curva dosis-respuesta para sulfafenazol **B)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina A2. **C)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina_2572.

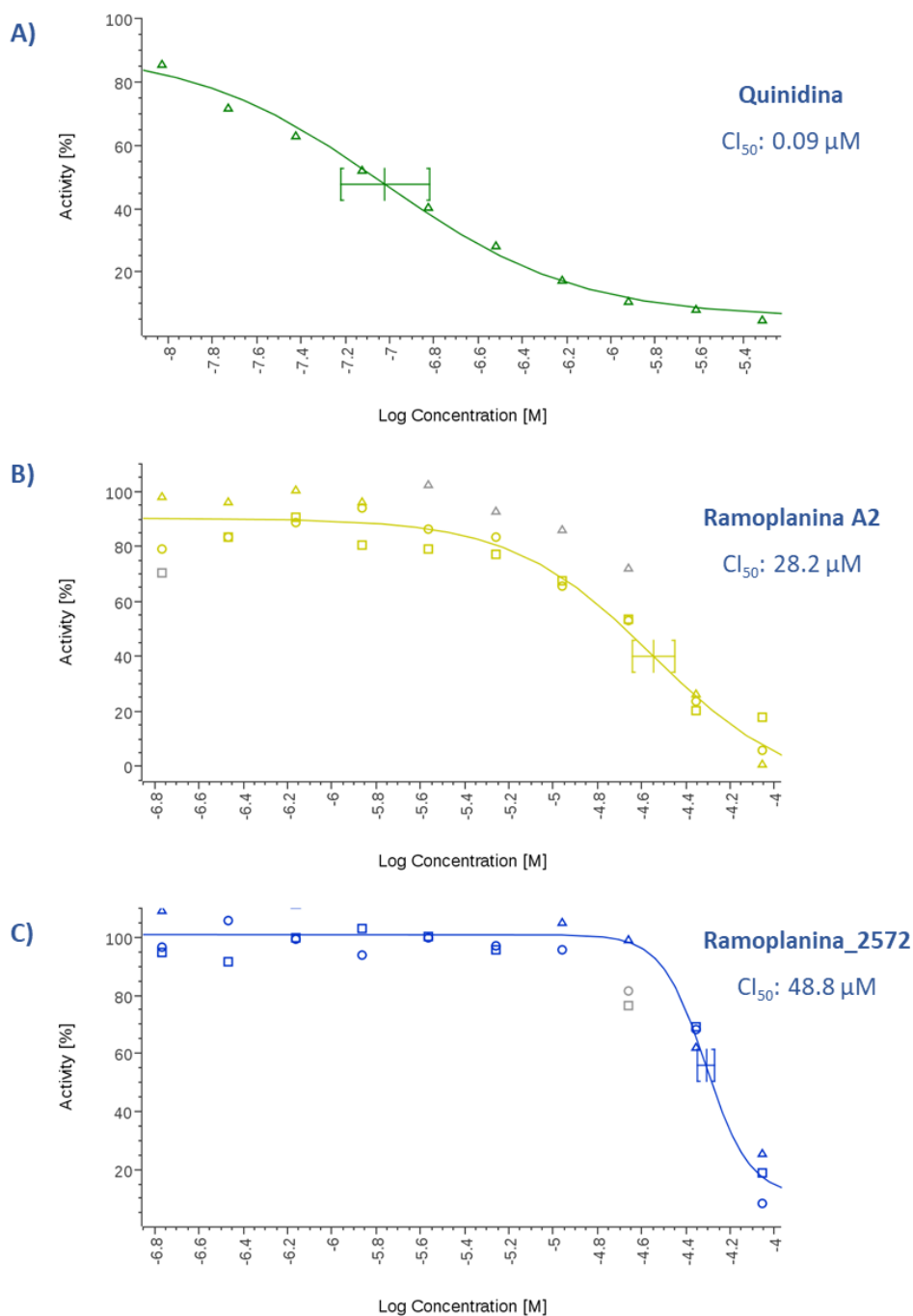


Figura 74. Inhibición CYP2D6. **A)** Curva dosis-respuesta para quinidina **B)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina A2. **C)** Curva dosis-respuesta para ramoplanina_2572.

En las fases tempranas del descubrimiento de fármacos, una clasificación de los candidatos en términos de CI_{50} según su potencial (bajo, medio o alto) para inhibir el CYP450, suele ser suficiente para priorizarlos en las siguientes etapas de estudios preclínicos. Se ha determinado que las moléculas que presenten valores de $CI_{50} < 1 \mu$ M serán clasificados como inhibidores *fuertes*, inhibidores *moderados* los que presenten valores 1μ M $< CI_{50} < 10 \mu$ M, e inhibidores *débiles* aquellos con valores de $CI_{50} > 10 \mu$ M

(Krippendorff *et al.*, 2007). Según estos criterios, con los valores de CI_{50} (Tabla 26) obtenidos para la ramoplanina A2 y la ramoplanina_2572 en las 3 isoformas ensayadas que en todos los casos fueron $> 10 \mu M$, ambas moléculas pueden considerarse inhibidores débiles del CYP450, y por lo tanto podemos considerar que las posibilidades de estos dos compuestos de interactuar con el metabolismo de otros fármacos y producir así interacciones medicamentosas son escasas.

Compuesto	Clasificación inhibidor		
	CYP3A4 (Testosterona)	CYP2C9 (Diclofenaco)	CYP2D6 (Dextrometorfano)
Ramoplanina_2572	Débil	Débil	Débil
Ramoplanina A2	Débil	Débil	Débil

Tabla 26. Tipo de inhibición de ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 producida en las isoformas CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6.

5.10.2 CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* (medición de ATP, MTT y rojo neutro, entre otros) son una técnica ampliamente utilizada para predecir los posibles efectos tóxicos sobre las células que pueden tener las moléculas candidatas a fármacos (Mathew *et al.*, 2018).

En nuestro trabajo la actividad citotóxica *in vitro* de la ramoplanina_2572 en comparación con la ramoplanina A2 se evaluó mediante el método colorimétrico de reducción de MTT utilizando dos líneas celulares: HepG2 (carcinoma hepatocelular, ATCC® CCL-8065) y THLE-2 (hepatocitos ATCC® CRL-2706TM).

La reducción del MTT ocurre principalmente en la mitocondria, debido a la acción de la enzima succinato-deshidrogenasa, y esto proporciona una medida de la función mitocondrial ya que sólo las células que son viables metabolizan el colorante de manera eficiente produciendo formazán, cuya cantidad es proporcional a la viabilidad celular (Verhulst *et al.*, 1998).

En la Tabla 27 se muestran los datos obtenidos de DE_{50} (dosis efectiva para provocar el 50% de muerte celular) en cada línea celular y compuesto, siendo este valor la media entre triplicados, y al lado la desviación estándar para cada caso. Ninguna de las dos ramoplaninas presentó actividad citotóxica frente a la línea celular de hepatocitos tumorales (HepG2) en los dos tiempos de incubación (24 h y 72 h) que se probaron.

Compuesto	DE ₅₀ (μM)			
	HepG2		THLE2	
	24 horas	72 horas	24 horas	72 horas
Ramoplanina_2572	>23.6	>23.6	16.8 ± 0.6	ND
Ramoplanina A2	>50	>50	24.9±2.4	ND

Tabla 27. Actividad citotóxica DE₅₀ (Media ± Stdv) de la ramoplanina_2572 y la ramoplanina A2 respectivamente frente a líneas celulares HepG2 y THLE2.

Esto también se puede observar en las gráficas de las curvas dosis-respuesta de la Figura 75 y la Figura 76. Y, aunque frente a la línea celular inmortalizada de hepatocitos no tumorales (THLE2) ambas moléculas mostraron ligera actividad tanto a 24 h como a 72 h de incubación, tal y como además se puede observar en la Figura 77 y en la Figura 78, esta no es lo suficientemente significativa como para considerarlos compuestos citotóxicos.

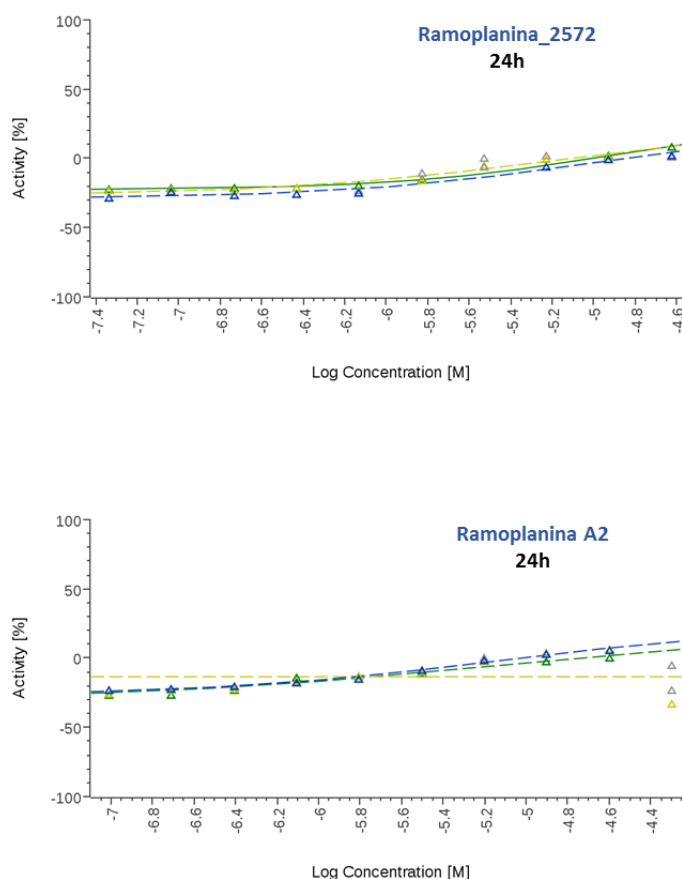


Figura 75. Curvas de HepG2 alas 24 h de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572.

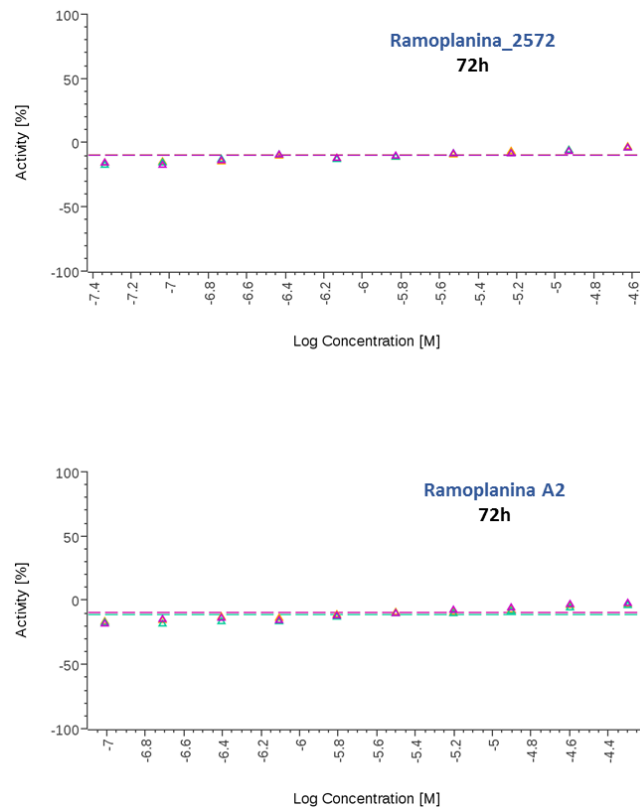


Figura 76. Curvas de HepG2 alas 72 h de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572.

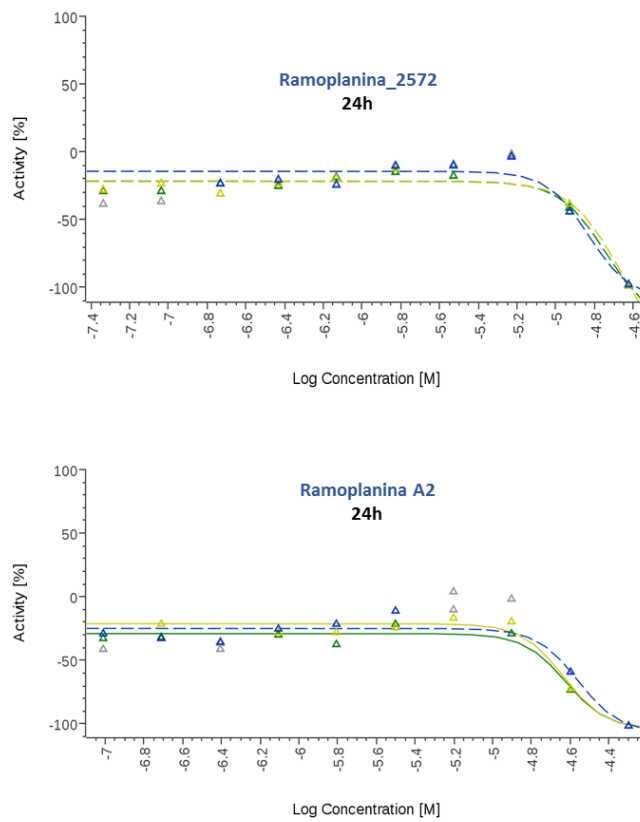


Figura 77. Curvas de THEL2 a las 24 h de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572.

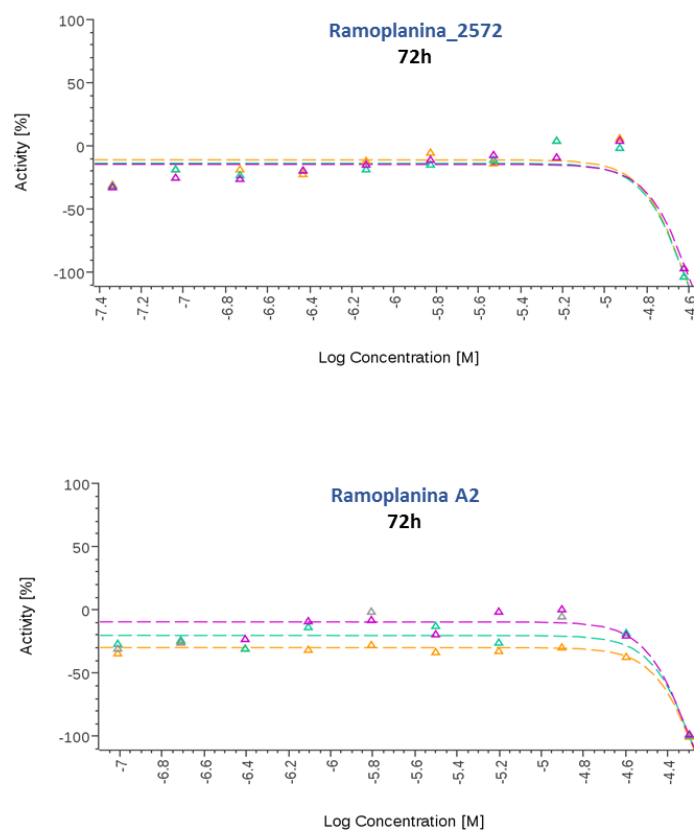


Figura 78. Curvas de THEL2 a las 72 h de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572.

5.11 TOLERABILIDAD LOCAL *IN VITRO*

5.11.1 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Hemólisis es un término utilizado para indicar la descomposición de la membrana de los eritrocitos con la consiguiente liberación de hemoglobina en el plasma (Jeswani *et al.*, 2015). Se estudió la capacidad hemolítica *in vitro* de la ramoplanina_2572 en comparación con la ramoplanina A2 dado que la hemólisis de los eritrocitos se considera un indicador de la tolerabilidad local de los análogos de ramoplanina (Ciabatti *et al.*, 2007).

Con este ensayo se midió mediante espectrofotometría la hemoglobina libre en los sobrenadantes resultantes de la incubación de las diferentes concentraciones (curva con diluciones $\frac{1}{2}$ desde 180 $\mu\text{g/mL}$ a 2,8 $\mu\text{g/mL}$) de cada compuesto con sangre fresca de perro y se determinaron los porcentajes de hemólisis, según la fórmula descrita en el apartado 3.9.1 de materiales y métodos.

En la Figura 79, se muestran las curvas de hemólisis obtenidas para cada una de las ramoplaninas y fácilmente se puede apreciar fácilmente la gran diferencia en la capacidad hemolítica existente entre ambos compuestos sobre todo a las concentraciones de ensayo más elevadas. Así, mientras que la ramoplanina_2572 presenta entre el 15 % y el 10 % de hemólisis en todo el rango de concentraciones ensayadas, la ramoplanina A2 solo alcanza esos porcentajes a partir de 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y muestra valores por encima del 80 % al 30 % a concentraciones comprendidas entre 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El punto de corte hemolítico *in vivo* varía según la especie y es un valor relativo expresado en porcentaje, por ejemplo, para humanos está entorno al 10%, para perros entre el 10% y el 29% y en conejos entre el 0% y el 37%. En general, se consideran no hemolíticos a aquellos compuestos o formulaciones, que *in vitro* presentan valores por debajo del 10%. Los valores superiores al 25% indican riesgo de hemólisis (Amin y Dannenfelser, 2006).

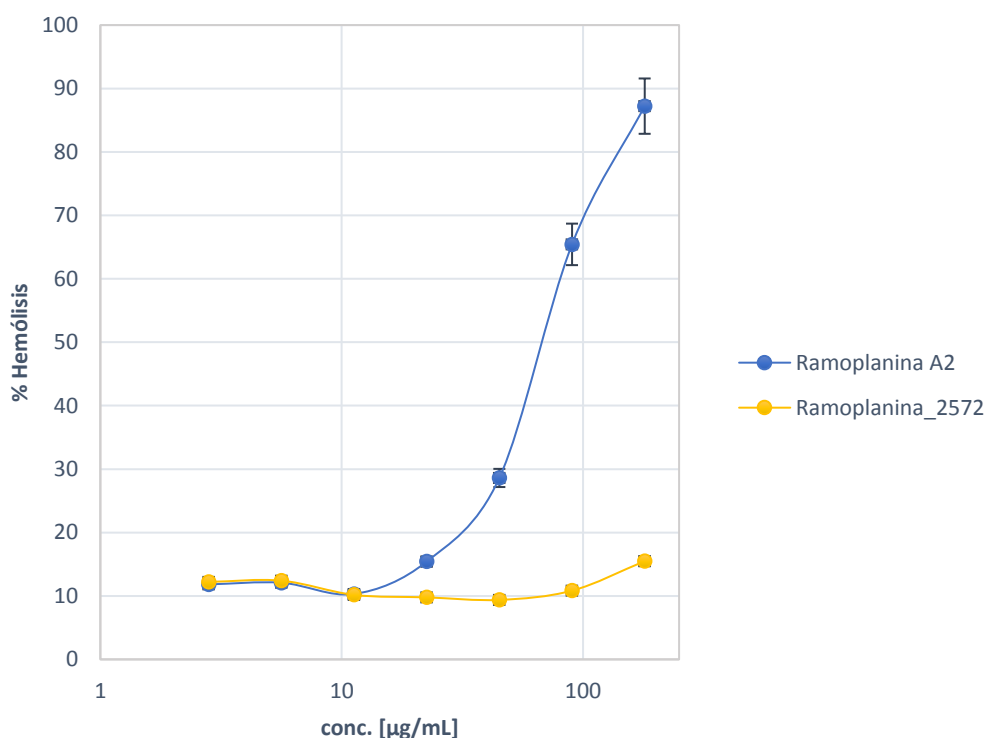


Figura 79. Curvas de hemólisis de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572.

6 DISCUSIÓN

6.1 RAMOPLANINA: ANTIBIÓTICO DE GRAN INTERÉS

La resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias en general, y en particular por parte de las bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Clostridium difficile*, es un grave problema para la salud pública (Tacconelli *et al.*, 2018).

En este contexto, la ramoplanina es un excelente candidato a fármaco ya que presenta una relevante actividad frente a bacterias Gram-positivas aerobias y anaerobias resistentes a antibióticos como glicopéptidos, macrólidos y penicilinas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus epidermidis*, estreptococos, enterococos resistentes a vancomicina (ERV), *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, y *Clostridium difficile* (Cheng *et al.*, 2014).

La ramoplanina inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose al transportador lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, y no es susceptible de los mismos mecanismos de resistencia que la vancomicina ya que el sitio de unión al transportador lipídico de ambos antibióticos es diferente (Donadio and Sosio 2014). Pese a ser un compuesto muy prometedor tanto su aprobación como su uso clínico se han visto obstaculizados por la actividad hemolítica que presenta cuando se administra por vía intravenosa. Como consecuencia de esta limitación, la ramoplanina ha formado parte de estudios de investigación clínica para aplicaciones tópicas, incluyendo también estudios clínicos para su uso como un antibiótico oral, no absorbible para la prevención de infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y para el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (Jabes *et al.*, 2014).

Se han generado análogos de ramoplanina tanto por síntesis total (Chen *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2009) como por semisíntesis a partir del compuesto natural (Ciabatti *et al.*, 2007) con el objetivo de conseguir moléculas con propiedades físicas y químicas mejoradas con respecto a la ramoplanina y también para estudiar el mecanismo de acción de este antibiótico. Sin embargo, debido a la complejidad estructural de la ramoplanina los procesos de síntesis química total o parcial son difíciles. Igualmente, una vez que se aisló y estudió el *cluster* biosintético de este compuesto (McCafferty *et al.*, 2002; Hoertz *et al.*, 2012) se aplicaron estos conocimientos para modificar su biosíntesis por ingeniería genética y producir nuevos análogos, pero hasta la fecha

solo dos derivados con propiedades biológicas similares a la ramoplanina han sido obtenidos mediante este método (Pan *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016).

En nuestro caso, se ha pretendido aprovechar el potencial de los actinomicetos pertenecientes a la colección de microorganismos de la Fundación MEDINA para encontrar, a partir de un ensayo de cribado de alto rendimiento (que llamamos “**LiaRS**”) cuya diana es el transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano (diana de ramoplanina), nuevos análogos de este compuesto y confirmar si estos tenían o no propiedades mejoradas tanto a nivel de actividad antimicrobiana como farmacológicas y de tolerabilidad local, especialmente con respecto a la actividad hemolítica.

6.2 ENSAYO DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

6.2.1 VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO LiaRS

Se ha validado y puesto a punto un ensayo de cribado de alto rendimiento, cuyo nombre procede del sistema de dos componentes **LiaRS** (del inglés “Lipid II cycle Interfering Antibiotic Sensor and response Regulator”) que coordina la respuesta genética a la acción de antibióticos que interfieren con el lípido II de la biosíntesis del peptidoglicano, tales como bacitracina, vancomicina y ramoplanina (Mascher *et al.*, 2004).

El ensayo LiaRS, se realizó frente a dos cepas de *Bacillus subtilis* (HB0950 y HB0953) que tienen el gen *lacZ* unido al promotor *lial* (*P lial*), de manera que la inducción específica de dicho promotor da como resultado la producción de β -galactosidasa. Adicionalmente, una de las cepas (HB0953) es un mutante *knock-out* del gen *liaR*, debido a una inserción de resistencia con kanamicina, con lo que dicho gen queda inactivado.

Se probaron diferentes antibióticos con diferentes modos de acción, y también detergentes como SDS o Tritón, y desacopladores de la fosforilación oxidativa tales como DNP (2,4-dinitrofenol) o CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona). Solo aquellos antibióticos que interfieren específicamente con el ciclo del transportador lipídico de la etapa II de la biosíntesis del peptidoglicano presentaron una inequívoca respuesta positiva, es decir mostraron halo de color azul frente a la cepa HB0950 (ya que indujeron la producción de β -galactosidasa y como consecuencia la hidrólisis de

X-gal) y no mostraron halo de color azul frente a la cepa HB0953. Este hecho fue utilizado como estrategia de ensayo para diferenciar los verdaderos de los falsos inductores del promotor *lial* (*P lial*).

6.3 EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MICROBIANO COMO FUENTE DE NUEVOS ANÁLOGOS DE RAMOPLANINA

El cribado de alto rendimiento consistió en ensayar 37.000 extractos de la colección de Productos Naturales frente a la cepa *B. subtilis* HB0950, y de ellos se seleccionaron 270 extractos activos del grupo de los actinomicetos ya que causaban un halo de inhibición (medido en mm) rodeado por un anillo de color azul (hidrólisis de X-gal por la presencia de β -galactosidasa) siendo la respuesta de color azul calificada del 1 al 3 según su intensidad. Para confirmar la especificidad de la actividad de los 270 extractos seleccionados, se ensayaron al mismo tiempo frente a las cepas *B. subtilis* HB0950 y *B. subtilis* HB0953. Como resultado, 25 de ellos fueron descartados dado que presentaron halo de inhibición rodeado por un anillo de color azul en ambas cepas, es decir eran falsos inductores del operón. De este modo, se consideran activos positivos del programa de cribado 245 extractos, representando un ratio del 0,2%.

Se corroboró que todos estos 245 extractos eran verdaderos inhibidores de la síntesis del peptidoglicano mediante un ensayo de marcaje radiactivo de macromoléculas (*labeling*) con el que monitorizamos la síntesis de la pared celular y pudimos comprobar que todos ellos mostraron actividad específica por encima del 80%.

A su vez, todos fueron analizados por cromatografía líquida y espectrometría de masas de baja resolución y se compararon sus perfiles cromatográficos con los perfiles de metabolitos secundarios archivados en una base de datos propia de la Fundación MEDINA, denominada *GOLD*, que contiene información de alrededor de 1000 moléculas, y que ha sido generada en las mismas condiciones cromatográficas que los extractos fueron analizados. En concreto, con una aplicación informática (desarrollada en la Fundación MEDINA) se compararon mediante algoritmos los valores de UV, tiempo de retención y espectros de masas POS y NEG de los extractos con los de LC-UV-MS de los metabolitos secundarios conocidos y almacenados en la base de datos de la Fundación. De los 245 extractos analizados con esta técnica por baja resolución, 71 de ellos presentaron perfiles que sugirieron la presencia de

compuestos relacionados con la clase estructural de las ramoplaninas, como la ramoplanosa, la ramoplanina A2, y las enduracidinas A y B.

De la combinación de los resultados obtenidos en el cribado de alto rendimiento, en el ensayo de *labeling* y del análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas del perfil químico de los extractos, se consideraron estos 71 extractos como los mejores candidatos a partir de los que tratar de descubrir nuevos compuestos relacionados en actividad biológica o estructura química con las ramoplaninas. Los 71 extractos seleccionados procedían de la fermentación en diferentes medios de cultivo de un total de 49 cepas de actinomicetos.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la idea de que los extractos de productos naturales de origen microbiano son una importante fuente de compuestos con actividad biológica, potencialmente fármacos y particularmente antibióticos (Cragg y Newman, 2013; Genilloud, 2017; Mahajan y Balachandran, 2017; Davison y Brimble 2019).

6.4 ACTINOMICETOS: PRODUCTORES DE RAMOPLANINA Y NUEVOS ANÁLOGOS

Las 49 cepas de actinomicetos seleccionadas en el cribado de alto rendimiento procedían de cultivos aislados que se clasificaron inicialmente en base a la morfología que presentaban teniendo en cuenta tanto aspectos macroscópicos de forma, tamaño y color de las colonias, como características microscópicas relacionadas con el tipo de esporulación y forma de las cadenas de las esporas. En base a las características morfológicas, los cultivos aislados se pudieron clasificar de forma preliminar en cinco grupos taxonómicos diferentes, más un número de cepas que no pudo asignarse a ningún grupo por no mostrar ningún rasgo morfológico, ni macroscópico ni microscópico característico. Se clasificaron 5 cepas dentro de la familia *Micromonosporaceae*, 4 cepas dentro de la familia *Streptomycetaceae*, 3 cepas dentro de la familia *Nocardiaceae* y otras 2 dentro de la familia *Pseudonocardiaceae*. Además, 35 de las cepas no pudieron ser clasificadas dentro de ningún grupo taxonómico, así que se las denominó “no identificados”. Posteriormente, mediante la secuenciación del gen 16S ARNr se determinaron las relaciones filogenéticas entre las cepas, así como su posición taxonómica.

En concreto, de los resultados obtenidos se puede inferir que la producción de ramoplanina y sus análogos está relativamente extendida entre los diversos taxones de actinomicetos como *Streptomyces*, *Nocardia* y *Amycolatopsis*, y sobre todo entre cepas de la familia *Micromonosporaceae*, ya que 39 de las 49 de las cepas seleccionadas en este estudio resultaron estar incluidas en esta familia siendo en su mayoría del género *Micromonospora* (36 cepas) y en su minoría (3 cepas) del género *Actinoplanes*, género al que pertenece la cepa originalmente productora de ramoplanina (ATCC 33076) que recientemente, y en base a un estudio polifásico basado en el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr, ha sido clasificada como una nueva especie y se ha propuesto denominarla *Actinoplanes ramoplaninifer* sp. (Marccone *et al.*, 2017).

Nuestros datos contribuyen con la idea de que los productores de ramoplanina son ubicuos y se encuentran dispersos geográficamente en diversos nichos ecológicos (manglares, rizosferas, etc.). En nuestro estudio, se ha demostrado la diversidad de los orígenes geográficos de los que procedían las diferentes muestras de suelo de las que se aislaron las 49 cepas. Hay cepas productoras del mismo origen que tienen diferente taxonomía y cepas con la misma taxonomía que proceden de orígenes diferentes. El grupo taxonómico identificado más abundante fue la familia *Micromonosporaceae*, lo que es consistente con la taxonomía del organismo productor de ramoplanina, pero otras familias como la familia *Streptomycetaceae*, *Pseudonocardiaceae* y *Nocardiaceae* también fueron identificadas. Este hecho podría contribuir a pensar que genes implicados en la biosíntesis de la ramoplanina hayan sido adquiridos evolutivamente por transferencia horizontal.

6.4.1 DIVERSIDAD DE LAS CEPAS SELECCIONADAS Y POTENCIAL BIOSINTÉTICO

Mediante la secuenciación del gen 16S ARNr se determinaron las relaciones filogenéticas entre las cepas, así como su posición taxonómica. Posteriormente, para evaluar la diversidad y distinguir entre organismos muy relacionados se emplearon dos técnicas de PCR-*fingerprinting*: BOX-PCR y REP-PCR, estableciéndose como punto de corte el 80% de similitud para definir una OTU basándonos tanto en nuestra experiencia como en la de otros autores (Lanoot *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006). Los dendrogramas resultantes de cada método han puesto en evidencia que, en nuestro caso, la técnica BOX-PCR aporta mayor profundidad taxonómica y mayor poder de

discriminación entre las cepas y genera unos perfiles de amplificación más robustos y complejos. En cuanto a los valores de los índices de diversidad de Simpson (**D**) y de Shannon-Weiner (**H'**) calculados para ambos métodos indican que la diversidad del grupo taxonómico mayoritario de cepas seleccionadas en nuestro estudio, la familia *Micromonosporaceae*, es elevada, especialmente resaltado por los valores obtenidos con la técnica de BOX-PCR (**D**: 98,72 % y **H'**: 3,3320).

Los actinomicetos producen metabolitos secundarios de gran diversidad estructural mediante sistemas multifuncionales tales como las sintetasas modulares de policétidos: PKS-I (Hopwood, 1997), las sintetasas iterativas de policétidos: PKS-II (Hopwood, 1997) (Shen, 2003) y las sintetasas de péptidos no-ribosomales: NRPS (Schwarzer *et al.*, 2003). Este hecho hace que esté ampliamente admitido que estudiar las secuencias de genes biosintéticos en los actinomicetos, sea una herramienta muy útil para obtener información sobre su capacidad de producir moléculas con actividad biológica (Courtois *et al.*, 2003; Hodges *et al.*, 2012).

Basándonos en trabajos previamente publicados (Ayuso *et al.*, 2005) (Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005), se ha estudiado la presencia y distribución de sistemas NRPS, PKS-I y PKS-II en las 49 cepas seleccionadas, con los objetivos de caracterizar el potencial metabólico de las mismas y de corroborar la presencia de secuencias de los genes biosintéticos NRPS dado que por la bibliografía sabíamos que el organismo productor de ramoplanina biosintetiza este antibiótico mediante sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS).

Se obtuvieron altas frecuencias de amplificaciones específicas positivas para NRPS (89,6 %) y PKS-I (77,1 %) y significativamente bajas para PKS-II (31,25 %). Estos resultados confirman la amplia distribución de estos *clusters* biosintéticos en nuestro grupo de cepas y sugieren además que estas tienen capacidad para producir metabolitos secundarios con bioactividad, si bien es cierto que en la bibliografía se describe que no existe una relación directa entre la presencia de estos genes y la actividad antimicrobiana (Ayuso *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012).

El alto porcentaje de cepas en las que se detectaron genes asociados a sistemas NRPS es consistente con el hecho de que la ramoplanina es un antibiótico derivado del sistema NRPS y apoya la idea de que en su mayoría estas cepas son potencialmente productoras de ramoplanina o análogos estructurales de este compuesto. Este

razonamiento se ve además reforzado con los datos obtenidos del estudio de los perfiles de los extractos y posteriores fracciones por cromatografía líquida y espectrometría de masas de baja y alta resolución que siempre confirmaron la presencia de este antibiótico o análogos relacionados estructuralmente.

6.5 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS

6.5.1 FERMENTACIONES DE PEQUEÑA ESCALA

Dado el pequeño volumen que de los extractos contiene la colección, se prepararon nuevas fermentaciones a pequeña escala (10 mL en viales EPA) de las 49 cepas en los mismos medios y condiciones de cultivo correspondientes a los 71 extractos seleccionados en el cribado. En este caso, solo se obtuvieron 55 extractos ya que 11 cepas no crecieron lo suficiente en el medio en que se habían sembrado.

El 76.4 % de las muestras ensayadas confirmaron la actividad en el ensayo LiaRS, es decir, 42 extractos mostraron un halo de inhibición rodeado por un anillo de color azul en la cepa HB0950, y halo de inhibición sin anillo de color azul en la cepa HB0953. Sin embargo, 13 de los 55 extractos no repitieron la actividad, porque no mostraron halo de inhibición ni exhibían anillo de color azul en la cepa HB0950.

Para caracterizar el perfil de actividad antimicrobiano de los extractos se ensayaron frente a un panel de microorganismos formado por tres bacterias Gram-positivas (*SASM*, *SARM* y *E. faecalis*), tres bacterias Gram-negativas (*H. influenzae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), una levadura (*C. albicans*) y un hongo (*A. fumigatus*). La mayoría de ellos presentaron actividad frente al grupo de bacterias Gram-positivas (*S. aureus* tanto sensible como resistente a metilina y *E. faecalis*), y los valores de sus CMIs variaron en un rango de 0,06 a 0,0075 WBE/mL en la mayor parte de los casos, destacando algunos extractos en los que se detectaron valores inferiores a 0,00375 WBE/mL incluso alguno con valores por debajo de 0,001875 WBE/mL. Contrariamente, ningún extracto a la máxima concentración ensayada mostró actividad frente a bacterias Gram-negativas (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) ni frente a *C. albicans* ni *A. fumigatus*. Estos resultados confirmaron que la mayor parte de los extractos seleccionados tenían un perfil de actividad antimicrobiano similar al de las ramoplaninas.

También se caracterizó el perfil químico de los 55 extractos mediante espectrometría de masas para corroborar la presencia de ramoplanina o análogos. Con este análisis se confirmó la presencia de ese tipo de moléculas y además se pudo correlacionar la falta de actividad de los 13 extractos en el ensayo de agar LiaRS con perfiles cromatográficos en los que se apreciaba una baja cantidad relativa de los compuestos de nuestro interés.

Los resultados obtenidos con las muestras procedentes de las fermentaciones de pequeña escala confirmaron que los 55 extractos presentaban un perfil de actividad antibacteriano y un perfil químico compatible con compuestos relacionados estructuralmente con las ramoplaninas, aunque no todos ellos repitieron la actividad en el ensayo LiaRS, hecho que podría deberse a que los compuestos de interés en estas fermentaciones (realizada en viales EPA) se hubieran generado en menor cantidad que en la original.

6.5.2 FERMENTACIONES DE MEDIANA ESCALA

En este punto se decidió realizar fermentaciones a media escala (100 mL en matraces) de las 49 cepas seleccionadas en el cribado. Por un lado, porque los 55 extractos procedentes de las fermentaciones de pequeña escala seguían siendo buenos candidatos para poder encontrar nuevos análogos de ramoplanina, por otro lado, porque se necesitaba más material para la identificación química dado que bastantes fermentaciones no habían producido la suficiente cantidad de los compuestos de nuestro interés tal y como habíamos comprobado tanto por los resultados del ensayo en agar LiaRS como por los perfiles cromatográficos, y además, para volver a dar oportunidad a las 11 cepas que no habían crecido lo suficiente anteriormente y de las que no se habían podido preparar los correspondientes extractos.

En esta nueva ocasión, los 49 cultivos de actinomicetos crecieron sin problemas y se pudieron preparar el total de 71 extractos de acetona correspondientes a todas las condiciones inicialmente detectadas como positivas en el cribado de alto rendimiento. Todos los extractos se testaron frente al ensayo de agar LiaRS, y el 83 % de ellos (59 extractos) confirmaron la actividad y la especificidad frente a este ensayo. En este caso, 12 de los 71 extractos no repitieron la actividad, bien porque no mostraron halo de inhibición frente a ninguna de las cepas o si lo mostraban era muy

turbio o bien porque, aunque presentaban halo de inhibición no exhibían anillo de color azul frente a la cepa HB0950.

Asimismo, los 71 extractos se analizaron por LC-MS pero las intensidades de los valores m/z que se obtuvieron eran muy bajas para la mayoría de las muestras. Este hecho nos advertía que la cantidad de los metabolitos de nuestro interés en los extractos era muy baja, y que era necesario utilizar una extracción más específica para ellos.

6.5.2.1 Extracción con butanol

Basándonos principalmente en el trabajo de purificación y aislamiento de la ramoplanina A2 publicado por Bruno Cavalleri en 1984 (Cavalleri *et al.*, 1984), diseñamos un procedimiento de extracción en el que se realizaron particiones líquido/líquido primero con acetato de etilo y posteriormente otra con butanol, ajustando el pH a 3,5 en cada paso.

En este caso, cuando se testaron los extractos de butanol frente al ensayo LiaRS, alrededor del 97 % (69 muestras) confirmaron la actividad y especificidad mostrando un halo de inhibición rodeado por un anillo de color azul en la cepa HB0950, y un halo de inhibición sin anillo de color azul en la cepa HB0953.

Además del análisis por LCMS de estos 71 extractos de butanol se pudo obtener una matriz de datos que permitió comparar la presencia de los diferentes valores de m/z detectados en el rango del m/z de las ramoplaninas (1260-1300). Con estos datos se estimó la similitud o la diferencia en su contenido en moléculas relacionadas con la familia de antibióticos que nos ocupa y se les clasificó en categorías según su actividad frente al ensayo LiaRS y a su intensidad en los iones del rango de las ramoplaninas.

Por otro lado, se evaluó tanto el perfil antimicrobiano como el potencial citotóxico frente a las líneas celulares HepG2 y THLE-2 de estos extractos. En su mayoría presentaron la capacidad de inhibir preferentemente bacterias Gram-positivas en vez de bacterias Gram-negativas o levaduras, y además en su gran mayoría los extractos presentaron una baja probabilidad de ser citotóxicos.

Del total de los 71 extractos de butanol, se eligieron 36 para continuar con el trabajo, que correspondieron a 32 cepas de actinomicetos diferentes.

6.6 PROCESO DE FRACCIONAMIENTO BIOGUÍADO

Para seleccionar estos 36 extractos se tuvo en cuenta la combinación de tres criterios: a) la actividad que dichos extractos presentaron en el ensayo de agar LiaRS (mayor tamaño de halo de inhibición y mayor intensidad del color azul); b) la potencia de los mismos frente a *SARM* y/o a *SASM* y c) los resultados obtenidos del análisis por LC-MS con los que habían sido clasificados por categorías según su relación entre la actividad y los iones detectables. A su vez, se consideró también la taxonomía inicial resultado de la identificación morfológica y secuencia de las cepas, intentando escoger al menos algún representante de cada familia identificada. Dado que el perfil citotóxico de los extractos se consideró bajo, no se incluyó entre los criterios de selección.

Para la identificación química y el aislamiento de los compuestos de interés se siguió una metodología de fraccionamiento bioguiado. En esta metodología los bioensayos (en nuestro caso el ensayo de agar LiaRS) orientan mediante la actividad el proceso. Así, primero se realizaron fraccionamientos semipreparativos de los 36 extractos seleccionados y sus correspondientes 80 fracciones se volvieron a testar sobre el bioensayo. La mayoría de los fraccionamientos presentaron las zonas de actividad en el intervalo comprendido entre las fracciones 40 y 48. Solo en el caso de los fraccionamientos de los extractos de las familias *Pseudonocardiaceae* y *Streptomycetaceae*, las fracciones activas se observaron desplazadas, en el primer caso hacia el intervalo comprendido entre las fracciones 36 y 40, y en el segundo caso entre las fracciones 39 y 44.

Para seguir con el trabajo se seleccionaron los fraccionamientos que en los rangos mencionados de fracciones activas presentaban halos de inhibición de mayor tamaño y mayor intensidad en el color azul del anillo que rodeaba dichos halos. Así se eligieron 10 fraccionamientos que correspondían con los siguientes extractos: CA-117398-a01-MO010-EB04-a03 y CA-117410-a01-MO008-EB04-a03 del grupo de la familia *Pseudonocardiaceae*; CA-142982-a01-MO013-EB04-a03 y CA-179413-a01-MO031-EB04-a03 del grupo de la familia *Micromonosporaceae*; CA-162175-a01-MO007-EB04-a03, CA-178528-a01-MO011-EB0-a03 y CA-179400-a01-MO10-EB04 del grupo de extractos pertenecientes a las cepas cuya taxonomía inicial no había sido identificada inicialmente, (pero que posteriormente se identificaron con la

secuencia); y CA-177328-a01-MO24-EB04-a03, CA-177430-a01-MO25-EB04-a03 y CA-178368-a01-MO007-EB04-a03 del grupo de la familia *Streptomycetaceae*.

Se comparó la presencia de los diferentes valores de m/z en cada una de las fracciones activas de los correspondientes fraccionamientos, en varios intervalos de los m/z de las moléculas relacionadas con las ramoplaninas. Estos intervalos de m/z fueron: 723 a 728; 1132 a 1139 y 1155 a 1291. Asimismo, se asoció la presencia de dichos m/z característicos en las diferentes fracciones activas con los picos de los perfiles cromatográficos de cada fraccionamiento, observándose que los perfiles metabolómicos que se obtenían para las fracciones activas de los 3 extractos pertenecientes al grupo de la familia *Streptomycetaceae* eran muy parecidos entre sí y al mismo tiempo se diferenciaban fácilmente de los obtenidos para las fracciones activas del resto de extractos. También se observaron similitudes entre los perfiles obtenidos para el grupo de la familia *Micromonosporaceae* y *Pseudonocardiaceae*.

El perfil metabolómico más sencillo de los 10 fraccionamientos elegidos, y en donde de manera sobresaliente en las fracciones 43 y 44 podíamos detectar cantidades abundantes de los iones m/z 1287 y 1288 que además se correspondían con un pico mayoritario en el cromatograma era el del fraccionamiento de la cepa CA-178528, perteneciente al grupo de la familia *Micromonosporaceae* e identificada como una *Micromonospora inositola*. Por esta razón se decidió purificar y aislar nuevas moléculas relacionadas con la ramoplanina a partir de esta cepa.

6.7 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL NUEVO ANÁLOGO

Se preparó una fermentación a mayor escala (1,5 L) de dicha cepa CA-178528 (*Micromonospora inositola*) y se realizó un fraccionamiento bioguiado, en el que las fracciones activas se fraccionaron y ensayaron a su vez tantas veces como fue necesario, confirmando en todo caso mediante análisis por HRMS la presencia de los compuestos de nuestro interés. Finalmente se consiguió una fracción que se correspondía con un máximo de un pico del perfil cromatográfico y que al ser analizada por LCMS se detectaron en ella dos compuestos de peso molecular 2572 y 2556, respectivamente. El compuesto con peso molecular 2572 pudo ser purificado y aislado, y mediante la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvo información sobre su peso y su fórmula molecular, así como de los fragmentos clave

de la molécula, y la estructura plana y la estereoquímica relativa se obtuvieron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) monodimensional y bidimensional. Por comparación con un patrón de ramoplanina A2, se realizó la hipótesis estructural de la nueva molécula. Este nuevo análogo de la ramoplanina A2 fue denominado “ramoplanina_2572” en referencia a su peso molecular.

La ramoplanina es un lipoglicodepsipéptido, que forma un macrociclo de 49 miembros, y que contiene 17 aminoácidos, nueve de los cuales son L-aminoácidos, siete D-aminoácidos y uno es glicina, siendo varios de los aminoácidos que forman parte de su estructura no proteínogénicos: hidroxifenilglicina (Hpg), β-hidroxiasparagina (β-OH-Asn, HAsn), D-ornitina (Orn) y clorohidroxifenilglicina (Chp) (Figura 80).

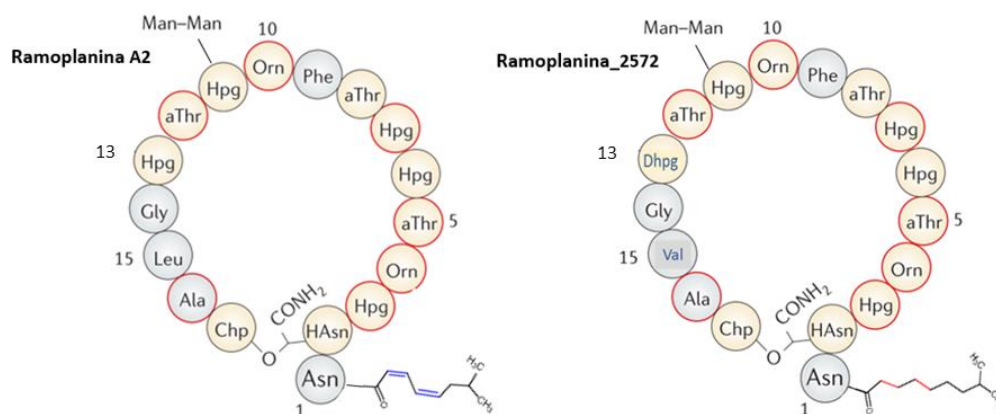


Figura 80. Estructuras simplificadas donde se pueden observar fácilmente las diferencias entre la ramoplanina A2 y la ramoplanina_2572. Los D-aminoácidos están señalados con círculos de color rojo. Las diferencias entre las dos moléculas se encuentran en los aminoácidos que ocupan las posiciones 13 y 15. Las diferencias en la cadena lipídica están señaladas en azul y rojo.

El macrociclo peptídico está cerrado mediante enlace tipo éster (como en los depsipéptidos) entre el grupo carboxilo del aminoácido 17 (L-Chp¹⁷) y el grupo β-hidroxilo presente en el aminoácido 2 (HAsn²). A su vez este residuo está conectado al aminoácido 1 (Asn¹), que está acilado en su N-terminal con un ácido carboxílico insaturado que según su longitud y estructura diferencia las ramoplaninas A1, A2 y A3 entre sí. Además, en la estructura destaca un resto disacárido (un grupo α-1,2-dimanosil) que está unido al fenol del aminoácido 11 (Hpg¹¹).

El nuevo análogo aislado en este trabajo, la ramoplanina_2572, comparte las características estructurales descritas para la ramoplanina A2, salvo el aminoácido de la posición 13 que en vez de ser hidroxifenilglicina (Hpg¹³) es dihidroxifenilglicina (Dhpg¹³) y el aminoácido de la posición 15 que en vez de ser leucina (Leu¹⁵) es valina (Val¹⁵) (Figura 78). También se diferencian en la cadena alifática lateral, que es saturada y más larga en un metileno en el caso de la ramoplanina_2572.

Se ha demostrado que los residuos Orn¹⁰, Hpg³, Hpg⁷ y Orn⁴ (nombrados de mayor a menor importancia) son necesarios para que la ramoplanina A2 conserve su actividad antimicrobiana (Nam *et al.*, 2007) y dado que todos ellos están presentes en la ramoplanina_2572 no es de extrañar que ambas muestren propiedades antibióticas similares como se describe a continuación.

6.8 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y FARMACOLÓGICAS DEL NUEVO ANÁLOGO DE RAMOPLANINA

6.8.1 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Como se ha comentado anteriormente, la ramoplanina A2 presenta una excelente actividad específica frente a bacterias Gram-positivas aeróbicas y anaeróbicas abarcando especies de los géneros tales como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* y *C. difficile*, e incluyendo cepas resistentes a diversos antibióticos, como los enterococos resistentes a vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y cepas de *C. difficile* con resistencia a metronidazol o sensibilidad reducida frente a vancomicina.

Para comparar las propiedades antimicrobianas de la ramoplanina_2572 respecto a la ramoplanina A2 y a otros antibióticos conocidos se determinó la actividad antimicrobiana de la nueva molécula frente a los patógenos más relevantes anteriormente mencionados, en paralelo a la ramoplanina A2 y a otros antibióticos actualmente de primera línea en uso por recomendación en la clínica.

Frente a la cepa de referencia *C. difficile* ATCC700057 y frente a 6 diferentes aislados clínicos de *C. difficile* cedidos por el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, ambas ramoplaninas presentaron actividades similares, y en ambos casos mejores que las de la vancomicina y el metronidazol frente a *C. difficile* ATCC700057, hecho por otro lado descrito con anterioridad para la ramoplanina A2 (Peláez *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2013).

Las propiedades antibacterianas frente a *SARM*, *E. faecalis*, *E. faecium* (VS) y *E. faecium* (VR) de la ramoplanina A2 y de la ramoplanina_2572 fueron también muy similares y mucho mejores que las de antibióticos como bacitracina, eritromicina, metilicina, tunicamicina e incluso vancomicina que venía siendo el tratamiento antimicrobiano convencional, hecho que apoyaría el uso de estas ramoplaninas como nueva alternativa terapéutica.

Como habíamos anticipado, estos resultados confirmaron que las diferencias en la estructura del nuevo análogo con respecto a la ramoplanina A2 no influyen en el perfil antimicrobiano que presenta.

6.8.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

6.8.2.1 Inhibición del citocromo P450

La inhibición de la actividad catalítica de las diferentes isoformas del citocromo P450 es de gran importancia clínica ya que este proceso es, en parte, responsable de las interacciones que se producen entre los medicamentos. Si, por ejemplo, un fármaco inhibe el metabolismo mediado por CYP450 de otro fármaco, el segundo fármaco puede acumularse dentro del cuerpo a niveles tóxicos lo que podría poner en riesgo la vida de los pacientes. Por eso, el conocimiento previo *in vitro* de las posibles propiedades de inhibición del CYP450 por parte de moléculas candidatas a fármacos se hace relevante.

En las fases tempranas del descubrimiento de fármacos, una clasificación de los candidatos en términos de CI_{50} según su potencial (bajo, medio o alto) para inhibir el CYP450, suele ser suficiente para priorizarlos en las siguientes etapas de estudios preclínicos. Se ha determinado que las moléculas que presenten valores de $CI_{50} < 1 \mu\text{M}$ serán clasificados como inhibidores *fuertes*, inhibidores *moderados* los que presenten valores $1 \mu\text{M} < CI_{50} < 10 \mu\text{M}$, e inhibidores *débiles* aquellos con valores de $CI_{50} > 10 \mu\text{M}$ (Krippendorff *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, se realizaron ensayos enzimáticos de tres de las principales isoformas de CYP450 (CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6) incubando con la ramoplanina A2 y ramoplanina_2572 para determinar la posible pérdida de actividad en el metabolismo del citocromo ocasionada por la presencia de estos compuestos. No se conocían valores de referencia de la ramoplanina A2, ya que en las búsquedas bibliográficas

realizadas no se ha encontrado ningún artículo en donde se describan, pero suponíamos que no podría ser un inhibidor dado que en la actualidad este antibiótico está en fases de desarrollo preclínico.

Los valores de CI_{50} que obtuvimos para ambas moléculas en las 3 isoformas ensayadas fueron superiores a 10 μ M, con lo que los dos compuestos pueden considerarse inhibidores débiles del CYP450. Por tanto, podemos considerar que las posibilidades de que estos dos antibióticos puedan interactuar con el metabolismo de otros fármacos y producir así interacciones medicamentosas son escasas.

6.8.2.2 Citotoxicidad *in vitro*

Para predecir los posibles efectos tóxicos sobre las células que pueden tener las moléculas candidatas a fármacos se realizan ensayos de citotoxicidad *in vitro*. En nuestro trabajo, la actividad citotóxica *in vitro* de la ramoplanina_2572 en comparación con la ramoplanina A2 se evaluó mediante el método colorimétrico de reducción de MTT utilizando dos líneas celulares: HepG2 (carcinoma hepatocelular, ATCC® CCL-8065) y THLE-2 (hepatocitos ATCC® CRL-2706TM). Ninguna de las dos moléculas presentó perfil citotóxico frente a las dos líneas celulares probadas.

6.8.2.3 Actividad hemolítica *in vitro*

La actividad hemolítica *in vitro* de los candidatos a fármacos es otra propiedad interesante para estudiar, ya que la hemólisis de los eritrocitos se considera un indicador de la tolerabilidad local.

La ramoplanina A2 presenta una alta actividad hemolítica cuando se administra por vía intravenosa. Como consecuencia de esta limitación se han hecho diferentes esfuerzos por generar análogos por síntesis total o semisíntesis que sortearan este obstáculo. La eliminación del residuo dimanosilo y la guanilación de los grupos amino de las dos ornitinas mediante modificaciones de semisíntesis, no consiguieron mejorar la tolerabilidad de la ramoplanina, si bien es cierto que la actividad antimicrobiana se mantuvo. Por el contrario, modificaciones en la cadena de ácidos grasos influyeron tanto en las propiedades antibióticas como en las hemolíticas (Ciabatti *et al.*, 2007). De este estudio realizado por Ciabatti y colegas, la molécula más prometedora fue aquella en la que el ácido graso insaturado de la ramoplanina se reemplazó por un ácido 2-metil-fenilacético. Actualmente NAICONS Laboratories

(<http://www.naicons.com/>) está desarrollando más estudios con dicha molécula, a la que ha denominado NAI-603, y de la que se han publicado sus propiedades farmacológicas y de tolerabilidad en ensayos con ratones (Jabes et al. 2014)

Una de las diferencias estructurales de la ramoplanina_2572 con respecto a la ramoplanina A2 es la cadena alifática lateral, que es saturada y más larga en un metileno en el caso del nuevo análogo. Este hecho nos hacía sospechar que las propiedades hemolíticas de ambos compuestos pudieran ser diferentes basándonos en los resultados de Ciabatti y colegas, en los que los análogos de cadena saturada (C9 a C12) presentaban menor hemólisis que la propia ramoplanina A2.

Con los resultados obtenidos del ensayo de hemólisis en paralelo con ambas moléculas, pudimos corroborar esta hipótesis. Se confirmaron los altos valores hemolíticos descritos en la bibliografía para la ramoplanina A2 que oscilan entre el 80 % y el 30 % para concentraciones comprendidas entre 180 µg/mL y 45 µg/mL, y sin embargo, para este mismo rango de concentraciones, los valores que se obtuvieron para la ramoplanina_2572 oscilaron entre 15 % y el 10 %.

Ante estos resultados en el ensayo de hemólisis y teniendo en cuenta los obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana, podemos decir que estamos ante una nueva molécula de propiedades prometedoras y con la que merece la pena, científica y éticamente, seguir realizando investigaciones y estudios adicionales.

7 CONCLUSIONES

1. El ensayo de cribado de alto rendimiento LiaRS que se ha puesto a punto, frente a *B. subtilis* HB0950 y *B. subtilis* HB0953, permite detectar extractos de productos naturales de origen microbiano en los que se encuentren compuestos que interfirieran específicamente con el ciclo del transportador lipídico de la biosíntesis del peptidoglicano.
2. La estrategia de combinar los resultados obtenidos del ensayo de cribado LiaRS, del ensayo de marcaje de macromoléculas (*labeling*), del análisis por cromatografía y espectrometría de masas (LCMS) y del estudio del perfil de actividad antimicrobiano de los extractos, permite seleccionar aquellos en los que se encuentran compuestos análogos a las ramoplaninas.
3. La extracción realizada mediante partición líquido/líquido primero con acetato de etilo y posteriormente con n-butanol, ajustando el pH a 3,5 en cada paso, fue más efectiva que la extracción con acetona y proporcionó mayor contenido de moléculas relacionadas con la ramoplanina en los extractos.
4. La producción de ramoplanina y de compuestos análogos a las ramoplaninas está relativamente extendida entre los diversos taxones de actinomicetos como *Streptomyces*, *Nocardia* y *Amycolatopsis*, aunque se han detectado mayoritariamente en géneros de la familia *Micromonosporaceae*, como *Actinoplanes* y *Micromonospora*.
5. Los actinomicetos productores de compuestos análogos a la ramoplanina son ubicuos y se encuentran dispersos geográficamente en diversos nichos ecológicos.
6. Del fraccionamiento bioguiado del extracto un cultivo de la cepa CA-178528 se ha aislado un nuevo producto natural estructuralmente relacionado con la familia de las ramoplaninas que se ha denominado ramoplanina_2572.

7. El compuesto aislado es un nuevo análogo de la ramoplanina y sus diferencias estructurales no varían las propiedades antibióticas ni citotóxicas que presenta la ramoplanina A2. Tampoco influyen dichas diferencias en las posibilidades de interacción con el metabolismo de otros fármacos.
8. Las diferencias estructurales en la cadena alifática lateral entre el nuevo análogo aislado (ramoplanina_2572) y la ramoplanina A2 influyen positivamente en la tolerabilidad local del nuevo compuesto que presenta valores de actividad hemolítica mucho menores que los de la ramoplanina A2.
9. Los extractos de productos naturales de origen microbiano son una importante fuente de compuestos con actividad biológica, potencialmente fármacos y particularmente antibióticos.

8 BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

- Adachi, M., Zhang, Y., Leimkuhler, C., Sun, B., LaTour, J. V. and Kahne, D. E. 2006.** “Degradation and Reconstruction of Moenomycin A and Derivatives: Dissecting the Function of the Isoprenoid Chain.” *Journal of the American Chemical Society* 128 (43). American Chemical Society: 14012–13. doi:10.1021/ja065905c.
- Allen, N.E. and Thalia I Nicas. 2003.** “Mechanism of Action of Oritavancin and Related Glycopeptide Antibiotics.” *FEMS Microbiology Reviews* 26 (5). Blackwell Publishing Ltd: 511–32. doi:10.1111/j.1574-6976.2003.tb00628.x.
- Altschul, S F, W Gish, W Miller, E W Myers, and D J Lipman. 1990.** “Basic Local Alignment Search Tool.” *Journal of Molecular Biology* 215 (3). ENGLAND: 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Altschul, S F, T L Madden, A A Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman. 1997.** “Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs.” *Nucleic Acids Research* 25 (17). ENGLAND: 3389–3402.
- Álvarez-Hernández, D A, A M González-Chávez, D González-Hermosillo-Cornejo, G A Franyuti-Kelly, A Díaz-Girón-Gidi, and R Vázquez-López. 2018.** “Perspectivas Históricas y Vigentes Sobre La Infección Por Clostridium Difficile.” *Revista de Gastroenterología de México* 83 (1): 41–50. doi:https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2017.03.004.
- Amin, Ketan, and Rose-Marie Dannenfelser. 2006.** “In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (6). United States: 1173–76. doi:10.1002/jps.20627.
- Andres, Charles J., Joanne J. Bronson, Stanley V. D’Andrea, Milind S. Deshpande, Paul J. Falk, Katharine A. Grant-Young, William E. Harte, et al. 2000.** “4-Thiazolidinones: Novel Inhibitors of the Bacterial Enzyme MurB.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 10 (8): 715–17doi:10.1016/S0960-894X(00)00073-1
- Arias, Cesar a, and Barbara E Murray. 2009.** “Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge.Pdf.” *The New England Journal of Medicine*, 439–43. doi:10.1056/NEJMp0804651.
- Asbel, L E, and M E Levison. 2000.** “Cephalosporins, Carbapenems, and Monobactams.” *Infectious Disease Clinics of North America* 14 (2): 435–447, ix. doi:10.1016/S0891-5520(05)70256-7.

- Attari**, Abbas, Fatemeh Rajabi, and Mohammad Reza Maracy. **2014**. "D-Cycloserine for Treatment of Numbing and Avoidance in Chronic Post Traumatic Stress Disorder: A Randomized, Double Blind, Clinical Trial." *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 19 (7). India: 592–98.
- Audoin**, Coralie, Dominique Bonhomme, Julijana Ivanisevic, Mercedes de la Cruz, Bastien Cautain, C Maria Monteiro, Fernando Reyes, Laurent Rios, Thierry Perez, and P Olivier Thomas. **2013**. "Balibalosides, an Original Family of Glucosylated Sesterterpenes Produced by the Mediterranean Sponge *Oscarella Balibalo*." *Marine Drugs*. doi:10.3390/md11051477.
- Ayuso-Sacido**, A., and O. Genilloud. **2005**. "New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups." *Microbial Ecology* 49 (1): 10–24. doi:10.1007/s00248-004-0249-6.
- Ayuso**, Angel, Desmond Clark, Ignacio González, Oscar Salazar, Annaliesa Anderson, and Olga Genilloud. **2005**. "A Novel Actinomycete Strain De-Replication Approach Based on the Diversity of Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthetase Biosynthetic Pathways." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (6): 795–806. doi:10.1007/s00253-004-1828-7.
- Barba-Ostria**, Carlos A. **2014**. "Los Sistemas de Dos Componentes: Circuitos Moleculares Versátiles." *TIP* 17(1): 62–76. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70320-1.
- Barcelona**, Laura, Marcelo Marin, and Daniel Stambouliau. **2008**. "Betalactámicos Con Inhibidores de Betalactamasas: Amoxicilina-Sulbactam." *Medicina (Buenos Aires)*. scieloar.
- Barreteau**, Hélène, Andreja Kovač, Audrey Boniface, Matej Sova, Stanislav Gobec, and Didier Blanot. **2008**. "Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis." *FEMS Microbiology Reviews* 32 (2): 168–207. <http://femsre.oxfordjournals.org/content/32/2/168.abstract>.
- Barry**, A. L., M. A. Pfaller, and P. C. Fuchs. **1993**. "Ramoplanin Susceptibility Testing Criteria." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (7): 1932–35.

- Basseres**, Eugenie, Bradley T Endres, Kierra M Dotson, M Jahangir Alam, and Kevin W Garey. **2017**. “Novel Antibiotics in Development to Treat Clostridium Difficile Infection.” *Current Opinion in Gastroenterology* 33 (1). United States: 1–7. doi:10.1097/MOG.0000000000000332.
- Bathe**, Stephan, Wafa Achouak, Anton Hartmann, Thierry Heulin, Michael Schloter, and Michael Lebuhn. **2006**. “Genetic and Phenotypic Microdiversity of Ochrobactrum Spp.” *FEMS Microbiology Ecology* 56 (2). England: 272–80. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00029.x.
- Behie**, Scott W, Bailey Bonet, Vineetha M Zacharia, Dylan J McClung, and Matthew F Traxler. **2017**. “Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In Situ.” *Frontiers in Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02149>.
- Beier**, Dagmar, and Roy Gross. **2006**. “Regulation of Bacterial Virulence by Two-Component Systems.” *Current Opinion in Microbiology* 9 (2). England: 143–52. doi:10.1016/j.mib.2006.01.005.
- Bell**, Leslie, Shari Bickford, Phong Hung Nguyen, Jianling Wang, Timothy He, Bailin Zhang, Yannick Friche, Alfred Zimmerlin, Laszlo Urban, and Dejan Bojanic. **2008**. “Evaluation of Fluorescence- and Mass Spectrometry-Based CYP Inhibition Assays for Use in Drug Discovery.” *Journal of Biomolecular Screening* 13 (5). United States: 343–53. doi:10.1177/1087057108317480.
- Benson**, T E, C T Walsh, and J M Hogle. **1996**. “The Structure of the Substrate-Free Form of MurB, an Essential Enzyme for the Synthesis of Bacterial Cell Walls.” *Structure (London, England: 1993)* 4 (1): 47–54. doi:10.1016/S0969-2126(96)00008-1.
- Berdy**, Janos. **2005**. “Bioactive Microbial Metabolites.” *The Journal of Antibiotics* 58 (1). Japan: 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1.
- Bérdy**, János. **2005**. “Bioactive Microbial Metabolites.” *The Journal of Antibiotics* 58 (1): 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1.
- Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology** **2012**. Second Edition. Volume Five: The Actinobacteria, Part A. Editado por Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hansjürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig y William B. Whitman. Springer

- Bertrand**, Jay A., Geneviève Auger, Eric Fanchon, Lydie Martin, Didier Blanot, Jean Van Heijenoort, and Otto Dideberg. **1997**. "Crystal Structure of UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanine:D-Glutamate Ligase from Escherichia Coli." *EMBO Journal* 16 (12): 3416–25. doi:10.1093/emboj/16.12.3416.
- Biavasco**, F., E. Manso, and P. E. Varaldo. **1991**. "In Vitro Activities of Ramoplanin and Four Glycopeptide Antibiotics against Clinical Isolates of Clostridium Difficile." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (1): 195–97. doi:10.1128/AAC.35.1.195.
- Bionda**, Nina, Jean-Philippe Pitteloud, and Predrag Cudic. **2013**. "Cyclic Lipodepsipeptides: A New Class of Antibacterial Agents in the Battle against Resistant Bacteria." *Future Medicinal Chemistry* 5 (11): 1311–30. doi:10.4155/fmc.13.86.
- Bogatcheva**, Elena, Tia Dubuisson, Marina Protopopova, Leo Einck, Carol A Nacy, and Venkata M Reddy. **2011**. "Chemical Modification of Capuramycins to Enhance Antibacterial Activity." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (3). Oxford University Press: 578–87. doi:10.1093/jac/dkq495.
- Bouhss**, Ahmed, Amy E Trunkfield, Timothy D H Bugg, and Dominique Mengin-Lecreulx. **2008**. "The Biosynthesis of Peptidoglycan Lipid-Linked Intermediates." *FEMS Microbiology Reviews* 32 (2): 208–33. <http://femsre.oxfordjournals.org/content/32/2/208.abstract>.
- Brakhage**, Axel A., Qusai Al-Abdallah, André Tüncher, and Petra Spröte. **2005**. "Evolution of β -Lactam Biosynthesis Genes and Recruitment of Trans-Acting Factors." *Phytochemistry*. doi:10.1016/j.phytochem.2005.02.030.
- Brandish**, P E, K I Kimura, M Inukai, R Southgate, J T Lonsdale, and T D Bugg. **1996**. "Modes of Action of Tunicamycin, Liposidomycin B, and Mureidomycin A: Inhibition of Phospho-N-Acetylmuramyl-Pentapeptide Translocase from Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (7). United States: 1640–44.
- Breukink**, Eefjan, and Ben de Kruijff. **2006**. "Lipid II as a Target for Antibiotics." *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (4): 321–32. doi:10.1038/nrd2004.

- Brotz, H, M Josten, I Wiedemann, U Schneider, F Gotz, G Bierbaum, and H G Sahl. 1998.** "Role of Lipid-Bound Peptidoglycan Precursors in the Formation of Pores by Nisin, Epidermin and Other Lantibiotics." *Molecular Microbiology* 30 (2). ENGLAND: 317–27.
- Brown, E. D., E. I. Vivas, C. T. Walsh, and R. Kolter. 1995.** "MurA (MurZ), the Enzyme That Catalyzes the First Committed Step in Peptidoglycan Biosynthesis, Is Essential in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology*.
- Brown, Lisa, Julie M Wolf, Rafael Prados-Rosales, and Arturo Casadevall. 2015.** "Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi." *Nature Reviews. Microbiology* 13 (10). England: 620–30. doi:10.1038/nrmicro3480.
- Bush, Matthew J, Maureen J Bibb, Govind Chandra, Kim C Findlay, and Mark J Buttner. 2013.** "Genes Required for Aerial Growth, Cell Division, and Chromosome Segregation Are Targets of WhiA before Sporulation in Streptomyces Venezuelae." *MBio* 4 (5). American Society for Microbiology: e00684-13. doi:10.1128/mBio.00684-13.
- Butaye, Patrick, Luc A. Devriese, and Freddy Haesebrouck. 2003.** "Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria." *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.16.2.175-188.2003.
- Butler, Mark S, Mark A Blaskovich, and Matthew A Cooper. 2013.** "Antibiotics in the Clinical Pipeline in 2013." *J Antibiot* 66 (10). Japan Antibiotics Research Association: 571–91. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2013.86>.
- Butler, Mark S, Avril A B Robertson, and Matthew A Cooper. 2014.** "Natural Product and Natural Product Derived Drugs in Clinical Trials." *Natural Product Reports* 31 (11). The Royal Society of Chemistry: 1612–61. doi:10.1039/C4NP00064A.
- Calvo, Jorge, and Luis Martínez-Martínez. 2009.** "Mecanismos de Acción de Los Antimicrobianos." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (1): 44–52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001.
- Cao, Min, Tao Wang, Rick Ye, and John D Helmann. 2002.** "Antibiotics That Inhibit Cell Wall Biosynthesis Induce Expression of the Bacillus Subtilis Sigma(W) and Sigma(M) Regulons." *Molecular Microbiology* 45 (5): 1267–76.

doi:papers2://publication/uuid/DFAB4E11-2A39-4580-922D-28C991BAB0E1.

- Carvalho**, Luis, Juan C Morales, Jose M Perez-Victoria, and Ignacio Perez-Victoria. **2015**. "Hemolytic Activity and Solubilizing Capacity of Raffinose and Melezitose Fatty Acid Monoesters Prepared by Enzymatic Synthesis." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 92 (May). Netherlands: 139–45. doi:10.1016/j.ejpb.2015.02.023.
- Cavalleri**, B, H Pagani, G Volpe, E Selva, and F Parenti. **1984**. "A-16686, a New Antibiotic from Actinoplanes. I. Fermentation, Isolation and Preliminary Physico-Chemical Characteristics." *The Journal of Antibiotics* 37 (4). JAPAN: 309–17.
- Cercenado**, E. **2016**. "Epidemiology of the infection by resistant Gram-positive microorganisms." *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* 29 Suppl 1 (September). Spain: 6–9.
- Chakradhar**, Shraddha. **2016**. "Reservoirs of Resistance: To Understand Why Antibiotics Fail, Geneticists Chase the 'Resistome'." *Nature Medicine*. United States. doi:10.1038/nm1016-1069.
- Chater** K. F., Merrick M. J. **1979**. Streptomycetes. En *Developmental biology of prokaryotes*, pp. 93–114. Editado por Parish J. H. (Blackwell, Oxford, England).
- Chatterjee**, S, S R Nadkarni, E K Vijayakumar, M V Patel, B N Ganguli, H W Fehlhaber, and L Vertesy. **1994**. "Napsamycins, New Pseudomonas Active Antibiotics of the Mureidomycin Family from Streptomyces Sp. HIL Y-82,11372." *The Journal of Antibiotics* 47 (5). Japan: 595–98.
- Chellat**, Mathieu F., and Rainer Riedl. **2017**. "Pseudouridimycin: The First Nucleoside Analogue That Selectively Inhibits Bacterial RNA Polymerase." *Angewandte Chemie - International Edition* 56 (43): 13184–86. doi:10.1002/anie.201708133.
- Chellat**, Mathieu, Luka Raguž, and Rainer Riedl. **2016**. *Targeting Antibiotic Resistance. Angewandte Chemie International Edition*. Vol. 55. doi:10.1002/anie.201506818.
- Chen**, Lan, Yanqiu Yuan, Jeremiah S Helm, Yanan Hu, Yosup Rew, Dongwoo Shin, Dale L Boger, and Suzanne Walker. **2004**. "Dissecting Ramoplanin: Mechanistic Analysis of Synthetic Ramoplanin Analogues as a Guide to the Design of Improved Antibiotics." *Journal of the American Chemical Society* 126 (24). United

States: 7462–63. doi:10.1021/ja047879t.

- Cheng, M., J. X. Huang, S. Ramu, M. S. Butler, and M. a. Cooper. 2014.** “Ramoplanin at Bactericidal Concentrations Induces Bacterial Membrane Depolarization in *Staphylococcus Aureus*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (11): 6819–27. doi:10.1128/AAC.00061-14.
- Chilton, C H, D S Pickering, and J Freeman. 2017.** “Microbiologic Factors Affecting *Clostridium Difficile* Recurrence.” *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, December. England. doi:10.1016/j.cmi.2017.11.017.
- Chun, Jongsik, Jae-Hak Lee, Yoonyoung Jung, Myungjin Kim, Seil Kim, Byung Kwon Kim, and Young-Woon Lim. 2007.** “EzTaxon: A Web-Based Tool for the Identification of Prokaryotes Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequences.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 10): 2259–61. doi:10.1099/ijs.0.64915-0.
- Ciabatti, R, S I Maffioli, G Panzone, a Canavesi, E Michelucci, P S Tiseni, E Marzorati, et al. 2007.** “Synth & Preliminary Biological Characterization New Semisynthetic Ramoplanin.” *J. Med. Chem.* 50 (13): 3077–85. http://pubs3.acs.org/acs/journals/doi/lookup?in_doi=10.1021/jm070042z.
- Collins, L. a., G. M. Eliopoulos, C. B. Wennersten, M. J. Ferraro, and R. C. Moellering. 1993.** “In Vitro Activity of Ramoplanin against Vancomycin-Resistant Gram-Positive Organisms.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (6): 1364–66. doi:10.1128/AAC.37.6.1364.
- Courtois, Sophie, Carmela M Cappellano, Maria Ball, Francois-Xavier Francou, Philippe Normand, Gerard Helynck, Asuncion Martinez, et al. 2003.** “Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1). United States: 49–55.
- Cragg, Gordon M., and David J. Newman. 2013.** “Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830 (6). Elsevier B.V.: 3670–95. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Cudic, Predrag, Douglas C. Behenna, James K. Kranz, Ryan G. Kruger, a. Joshua Wand, Yuri I. Veklich, John W. Weisel, and Dewey G. McCafferty. 2002.** “Functional

- Analysis of the Lipoglycopeptide Antibiotic Ramoplanin." *Chemistry and Biology* 9 (8): 897–906. doi:10.1016/S1074-5521(02)00191-6.
- D'Costa**, Vanessa M, Christine E King, Lindsay Kalan, Mariya Morar, Wilson W L Sung, Carsten Schwarz, Duane Froese, et al. **2011**. "Antibiotic Resistance Is Ancient." *Nature* 477 (7365). England: 457–61. doi:10.1038/nature10388.
- Davies**, Julian, and Katherine S Ryan. **2012**. "Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World." *ACS Chemical Biology* 7 (2). United States: 252–59. doi:10.1021/cb200337h.
- Davies**, Julian, George B Spiegelman, and Grace Yim. **2006**. "The World of Subinhibitory Antibiotic Concentrations." *Current Opinion in Microbiology* 9 (5). England: 445–53. doi:10.1016/j.mib.2006.08.006.
- Davison**, Emma K, and Margaret A Brimble. **2019**. "Natural Product Derived Privileged Scaffolds in Drug Discovery." *Current Opinion in Chemical Biology* 52: 1–8. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.12.007.
- de Kruijff**, Ben, Vincent van Dam, and Eefjan Breukink. **2008**. "Lipid II: A Central Component in Bacterial Cell Wall Synthesis and a Target for Antibiotics." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 79 (3–5): 117–21. doi:10.1016/j.plefa.2008.09.020.
- Demain**, ArnoldL. **2014**. "Importance of Microbial Natural Products and the Need to Revitalize Their Discovery." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41 (2). Springer Berlin Heidelberg: 185–201. doi:10.1007/s10295-013-1325-z.
- Dhar**, Neeraj, and John D. McKinney. **2007**. "Microbial Phenotypic Heterogeneity and Antibiotic Tolerance." *Current Opinion in Microbiology* 10 (1): 30–38. doi:10.1016/j.mib.2006.12.007.
- Di Marco**, Annalise, Isabella Marcucci, Maria Verdirame, Jose Perez, Manuel Sanchez, Fernando Pelaez, Ashok Chaudhary, and Ralph Laufer. **2005**. "Development and Validation of a High-Throughput Radiometric CYP3A4/5 Inhibition Assay Using Tritiated Testosterone." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 33 (3). United States: 349–58. doi:10.1124/dmd.104.002873.
- Dini**, Christophe. **2005**. "MraY Inhibitors as Novel Antibacterial Agents." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5 (13): 1221–36. doi:10.2174/156802605774463042.

- Donadio**, Stefano, and Margherita Sosio. **2014**. "Inhibitors of Cell-Wall Synthesis," no. January: 133–49. doi:10.1002/9783527659685.ch6.
- Drawz**, Sarah M, and Robert A Bonomo. **2010**. "Three Decades of β -Lactamase Inhibitors." *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1). American Society for Microbiology (ASM): 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
- Dresser**, G K, J D Spence, and D G Bailey. **2000**. "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Consequences and Clinical Relevance of Cytochrome P450 3A4 Inhibition." *Clinical Pharmacokinetics* 38 (1). Switzerland: 41–57. doi:10.2165/00003088-200038010-00003.
- Dubos**, R J. **1939**. "Studies On A Bactericidal Agent Extracted From A Soil Bacillus : li. Protective Effect Of The Bactericidal Agent Against Experimental Pneumococcus Infections In Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 70 (1): 11–17. doi:10.1084/jem.70.1.11.
- Eckardt**, K. **1983**. "Tunicamycins, Streptovirudins, and Corynetoxins, a Special Subclass of Nucleoside Antibiotics." *Journal of Natural Products* 46 (4). UNITED STATES: 544–50.
- El Zoeiby**, Ahmed, François Sanschagrín, and Roger C. Levesque. **2003**. "Structure and Function of the Mur Enzymes: Development of Novel Inhibitors." *Molecular Microbiology*. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03289.x.
- EMA Guidelines**, The European Medicines Agency Guidelines. **2012**. *Guideline on the Investigation of Drug Interactions*. Vol. 21. doi:10.1002/ejoc.201200111.
- Embley**, T M, and E Stackebrandt. **1994**. "The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes." *Annual Review of Microbiology* 48. United States: 257–89. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.001353.
- Fang**, Xiao, Joonwoo Nam, Dongwoo Shin, Yosup Rew, Dale L. Boger, and Suzanne Walker. **2009**. "Functional and Biochemical Analysis of a Key Series of Ramoplanin Analogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (21). Elsevier Ltd: 6189–91. doi:10.1016/j.bmcl.2009.09.001.
- Fang**, Xiao, Kittichoat Tiyanont, Yi Zhang, Jutta Wanner, Dale Boger, and Suzanne Walker. **2006**. "The Mechanism of Action of Ramoplanin and Enduracidin." *Molecular BioSystems* 2 (1): 69–76. doi:10.1039/b515328j.

- Farver**, Debra K., Dennis D. Hedge, and Steven C. Lee. **2005**. "Ramoplanin: A Lipoglycopeptide Antibiotic." *Annals of Pharmacotherapy*. doi:10.1345/aph.1E397.
- FDA Guidelines**. **2017**. "Clinical Drug Interaction Studies — Study Design , Data Analysis , and Clinical Implications Guidance for Industry Clinical Drug Interaction Studies — Study Design , Data Analysis , and Clinical Implications Guidance for Industry." *Guidelines FDA*, no. October.
- Fiers**, William D, Mark Craighead, and Ishwar Singh. **2017**. "Teixobactin and Its Analogues: A New Hope in Antibiotic Discovery." *ACS Infectious Diseases* 3 (10). United States: 688–90. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00108.
- Finegold**, Sydney M, Shahera St John, Ann W Vu, Calida M Li, Denise Molitoris, Yuli Song, Chengxu Liu, and Hannah M Wexler. **2004**. "In Vitro Activity of Ramoplanin and Comparator Drugs against Anaerobic Intestinal Bacteria from the Perspective of Potential Utility in Pathology Involving Bowel Flora." *Anaerobe* 10 (4): 205–11. doi:10.1016/j.anaerobe.2004.04.003.
- Fletcher**, Steven, Wenbo Yu, Jing Huang, Steven M Kwasny, Jay Chauhan, Timothy J Opperman, Alexander D Jr MacKerell, and Erik P H de Leeuw. **2015**. "Structure-Activity Exploration of a Small-Molecule Lipid II Inhibitor." *Drug Design, Development and Therapy* 9. New Zealand: 2383–94. doi:10.2147/DDDT.S79504.
- Freeman**, Jane, Simon D. Baines, Daniela Jabes, and Mark H. Wilcox. **2005**. "Comparison of the Efficacy of Ramoplanin and Vancomycin in Both in Vitro and in Vivo Models of Clindamycin-Induced Clostridium Difficile Infection." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (4): 717–25. doi:10.1093/jac/dki321.
- Fronko**, R M, J C Lee, J G Galazzo, S Chamberland, F Malouin, and M D Lee. **2000**. "New Pacidamycins Produced by Streptomyces Coeruleorubidus, NRRL 18370." *The Journal of Antibiotics* 53 (12). Japan: 1405–10.
- Furuya**, E Yoko, and Franklin D Lowy. **2006**. "Antimicrobial-Resistant Bacteria in the Community Setting." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (1). England: 36–45. doi:10.1038/nrmicro1325.
- Galley**, Nicola F, Amy M O'Reilly, and David I Roper. **2014**. "Prospects for Novel Inhibitors of Peptidoglycan Transglycosylases." *Bioorganic Chemistry* 55 (100).

Elsevier: 16–26. doi:10.1016/j.bioorg.2014.05.007.

- Galperin**, Michael Y, and Anastasia N Nikolskaya. **2007**. “Identification of Sensory and Signal-Transducing Domains in Two-Component Signaling Systems.” *Methods in Enzymology* 422. United States: 47–74. doi:10.1016/S0076-6879(06)22003-2.
- Gao**, Rong, and Ann M Stock. **2009**. “Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins.” *Annual Review of Microbiology* 63: 133–54. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073214.
- Geneva: World Health Organization; WHO/EMP/IAU/2018.06. 2018**. “Update of Antibacterial Agents in Clinical Development,” no. July: 1–4.
- Genilloud**, Olga. **2017**. “Actinomycetes: Still a Source of Novel Antibiotics.” *Natural Product Reports* 34 (10). England: 1203–32. doi:10.1039/c7np00026j.
- Genilloud**, Olga, Ignacio Gonzalez, Oscar Salazar, Jesus Martin, Jose Ruben Tormo, and Francisca Vicente. **2011**. “Current Approaches to Exploit Actinomycetes as a Source of Novel Natural Products.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (3). England: 375–89. doi:10.1007/s10295-010-0882-7.
- González**, Ignacio, Angel Ayuso-Sacido, Annaliesa Anderson, and Olga Genilloud. **2005**. “Actinomycetes Isolated from Lichens: Evaluation of Their Diversity and Detection of Biosynthetic Gene Sequences.” *FEMS Microbiology Ecology* 54 (3): 401–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2005.05.004>.
- Gotoh**, Yasuhiro, Yoko Eguchi, Takafumi Watanabe, Sho Okamoto, Akihiro Doi, and Ryutaro Utsumi. **2010**. “Two-Component Signal Transduction as Potential Drug Targets in Pathogenic Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 13 (2). England: 232–39. doi:10.1016/j.mib.2010.01.008.
- Hamburger**, James B, Amanda J Hoertz, Amy Lee, Rachel J Senturia, Dewey G McCafferty, and Patrick J Loll. **2009**. “A Crystal Structure of a Dimer of the Antibiotic Ramoplanin Illustrates Membrane Positioning and a Potential Lipid II Docking Interface.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33): 13759–64. doi:10.1073/pnas.0904686106.
- Han**, Jungang, Junsheng Chen, Lei Shao, Junliang Zhang, Xiaojing Dong, Pengyu Liu, and Daijie Chen. **2016**. “Production of the Ramoplanin Activity Analogue by Double Gene Inactivation.” *Plos One* 11 (5): e0154121. doi:10.1371/journal.pone.0154121.

- Hane**, B G, K Jager, and H G Drexler. **1993**. "The Pearson Product-Moment Correlation Coefficient Is Better Suited for Identification of DNA Fingerprint Profiles than Band Matching Algorithms." *Electrophoresis* 14 (10). GERMANY: 967–72.
- Harvey**, Alan. **2000**. "Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products." *Drug Discovery Today* 5 (7): 294–300. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01511-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01511-7).
- Harvey**, Alan L. **2009**. "THE CONTINUING VALUE OF NATURALPRODUCTS FOR DRUG DISCOVERY." *Revista de Salud Animal*. scielocu.
- Harvey**, Alan L, RuAngelie Edrada-Ebel, and Ronald J Quinn. **2015**. "The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era." *Nat Rev Drug Discov* 14 (2). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 111–29. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4510>.
- Hassan**, Syed Shams Ul, and Abdul Lateef Shaikh. **2017**. "Marine Actinobacteria as a Drug Treasure House." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 87 (March). France: 46–57. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.086.
- Heifetz**, A, R W Keenan, and A D Elbein. **1979**. "Mechanism of Action of Tunicamycin on the UDP-GlcNAc:Dolichyl-Phosphate Glc-NAc-1-Phosphate Transferase." *Biochemistry* 18 (11). UNITED STATES: 2186–92.
- Helm**, Jeremiah S, Lan Chen, and Suzanne Walker. **2002**. "Rethinking Ramoplanin: The Role of Substrate Binding in Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis." *Journal of the American Chemical Society* 124 (47). United States: 13970–71.
- Hendlin**, D, E O Stapley, M Jackson, H Wallick, A K Miller, F J Wolf, T W Miller, et al. **1969**. "Phosphonomycin, a New Antibiotic Produced by Strains of *Streptomyces*." *Science (New York, N.Y.)* 166 (3901). United States: 122–23.
- Higgins**, Luke J, Feng Yan, Pinghua Liu, Hung-wen Liu, and Catherine L Drennan. **2005**. "Structural Insight into Antibiotic Fosfomycin Biosynthesis by a Mononuclear Iron Enzyme." *Nature* 437 (7060): 838–44. doi:10.1038/nature03924.
- Hirano**, Shinpei, Satoshi Ichikawa, and Akira Matsuda. **2007**. "Total Synthesis of (+)-FR-900493 and Establishment of Its Absolute Stereochemistry." *Tetrahedron* 63 (13): 2798–2804. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.01.055>.

- Hodges**, Tyler W, Marc Slattery, and Julie B Olson. **2012**. "Unique Actinomycetes from Marine Caves and Coral Reef Sediments Provide Novel PKS and NRPS Biosynthetic Gene Clusters." *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)* 14 (3). United States: 270–80. doi:10.1007/s10126-011-9410-7.
- Hoertz**, Amanda J., James B. Hamburger, David M. Gooden, Maria M. Bednar, and Dewey G. McCafferty. **2012**. "Studies on the Biosynthesis of the Lipodepsipeptide Antibiotic Ramoplanin A2." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20 (2). Elsevier Ltd: 859–65. doi:10.1016/j.bmc.2011.11.062.
- Homma**, Tomoyuki, Austin Nuxoll, Autumn Brown Gandt, Patrick Ebner, Ina Engels, Tanja Schneider, Friedrich Gotz, Kim Lewis, and Brian P Conlon. **2016**. "Dual Targeting of Cell Wall Precursors by Teixobactin Leads to Cell Lysis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (11). United States: 6510–17. doi:10.1128/AAC.01050-16.
- Hopwood**, David A. **1997**. "Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases." *Chemical Reviews* 97 (7). American Chemical Society: 2465–98. doi:10.1021/cr960034i.
- Hu**, Yanan, Lan Chen, Sha Ha, Ben Gross, Brian Falcone, Deborah Walker, Maryam Mokhtarzadeh, and Suzanne Walker. **2003a**. "Crystal Structure of the MurG:UDP-GlcNAc Complex Reveals Common Structural Principles of a Superfamily of Glycosyltransferases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (3): 845 LP-849. <http://www.pnas.org/content/100/3/845.abstract>.
- Hu**, Yanan, Jeremiah S. Helm, Lan Chen, Xiang Yang Ye, and Suzanne Walker. **2003b**. "Ramoplanin Inhibits Bacterial Transglycosylases by Binding as a Dimer to Lipid II." *Journal of the American Chemical Society* 125 (29): 8736–37. doi:10.1021/ja035217i.
- Huang**, Tingting, and Shuangjun Lin. **2017**. "Microbial Natural Products: A Promising Source for Drug Discovery." *Journal of Applied Microbiology and Biochemistry* 1 (2). iMedPub: 3–5. doi:10.21767/2576-1412.100005.
- Hughes**, J B, J J Hellmann, T H Ricketts, and B J Bohannan. **2001**. "Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10). United States: 4399–4406.

- Hyrylainen**, Hanne-Leena, Matti Sarvas, and Vesa P Kontinen. **2005**. "Transcriptome Analysis of the Secretion Stress Response of *Bacillus Subtilis*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (3). Germany: 389–96. doi:10.1007/s00253-005-1898-1.
- Ichikawa**, Satoshi. **2008**. "Fine Synthetic Nucleoside Chemistry Based on Nucleoside Natural Products Synthesis." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 56 (8): 1059–72. doi:10.1248/cpb.56.1059.
- Innis**, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. **1990**. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplifications*. Edited by Academic Press. San Diego, CA.
- Isono**, K, M Uramoto, H Kusakabe, K Kimura, K Isaki, C C Nelson, and J A McCloskey. **1985**. "Liposidomycins: Novel Nucleoside Antibiotics Which Inhibit Bacterial Peptidoglycan Synthesis." *The Journal of Antibiotics* 38 (11). Japan: 1617–21.
- Miller**, J David, Stephen M. Hammond, Daniela Anderluzzi, and Timothy D. H. Bugg. **1998**. "Aminoalkylphosphinate Inhibitors of D-Ala-D-Ala Adding Enzyme." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, no. 1. The Royal Society of Chemistry: 131–42. doi:10.1039/A704097K.
- Jabes**, D., C. Brunati, G. Candiani, S. Riva, G. Romano, S. Maffioli, R. Rossi, M. Simone, E. Gaspari, and S. Donadio. **2014**. "Pharmacological Properties of NAI-603, a Well-Tolerated Semisynthetic Derivative of Ramoplanin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 1922–29. doi:10.1128/AAC.01620-13.
- Jeswani**, Gunjan, Amit Alexander, Shailendra Saraf, Swarnlata Saraf, Azra Qureshi, and Ajazuddin. **2015**. "Recent Approaches for Reducing Hemolytic Activity of Chemotherapeutic Agents." *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 211 (August). Netherlands: 10–21. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.001.
- Johnson**, C. C., S. Taylor, P. Pitsakis, P. May, and M. E. Levison. **1992**. "Bactericidal Activity of Ramoplanin against Antibiotic-Resistant Enterococci." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (10): 2342–45. doi:10.1128/AAC.36.10.2342.
- Jones**, R N, and A L Barry. **1989**. "In Vitro Evaluation of Ramoplanin (A16686 or MDL62198). A New Depsipeptide Complex for Potential Topical Use." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 12 (3). UNITED STATES: 279–82.

- Jordan, S., a. Junker, J. D. Helmann, and T. Mascher. 2006.** "Regulation of LiaRS-Dependent Gene Expression in *Bacillus Subtilis*: Identification of Inhibitor Proteins, Regulator Binding Sites, and Target Genes of a Conserved Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System." *Journal of Bacteriology* 188 (14): 5153–66. doi:10.1128/JB.00310-06.
- Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969.** "Evolution of Protein Molecules." *Mammalian Protein Metabolism*, 21–123. doi:citeulike-article-id:768582.
- Kahne, Dan, Catherine Leimkuhler, Wei Lu, and Christopher Walsh. 2005.** "Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics." *Chemical Reviews*. doi:10.1021/cr030103a.
- Kapoor, Garima, Saurabh Saigal, and Ashok Elongavan. 2017.** "Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians." *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 33 (3). India: Medknow Publications & Media Pvt Ltd: 300–305. doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Kenny, M. T., and M. A. Brackman. 1994.** "Comparison of Agar Dilution, Tube Dilution, and Broth Microdilution Susceptibility Tests for Determination of Ramoplanin MICs." *Journal of Clinical Microbiology*.
- Kesel, Sara, Andreas Mader, Carolin Höfler, Thorsten Mascher, and Madeleine Leisner. 2013.** "Immediate and Heterogeneous Response of the LiaFSR Two-Component System of *Bacillus Subtilis* to the Peptide Antibiotic Bacitracin." *PLoS One* 8 (1): e53457. doi:10.1371/journal.pone.0053457.
- Kim, Mincheol, Hyun-Seok Oh, Sang-Cheol Park, and Jongsik Chun. 2014.** "Towards a Taxonomic Coherence between Average Nucleotide Identity and 16S rRNA Gene Sequence Similarity for Species Demarcation of Prokaryotes." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 2). England: 346–51. doi:10.1099/ijs.0.059774-0.
- Kim, Ok Sun, Yong Joon Cho, Kihyun Lee, Seok Hwan Yoon, Mincheol Kim, Hyunsoo Na, Sang Cheol Park, et al. 2012.** "Introducing EzTaxon-e: A Prokaryotic 16s rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes That Represent Uncultured Species." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (PART 3): 716–21. doi:10.1099/ijs.0.038075-0.

- Kimura**, Ken-ichi, and Timothy D H Bugg. **2003**. "Recent Advances in Antimicrobial Nucleoside Antibiotics Targeting Cell Wall Biosynthesis." *Natural Product Reports* 20 (2). England: 252–73.
- Kraus**, Carl N., Matthew W. Lyerly, and Robert J. Carman. **2015**. "Ambush of Clostridium Difficile Spores by Ramoplanin: Activity in an In Vitro Model." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (5): AAC.04853-14. doi:10.1128/AAC.04853-14.
- Krause**, Juergen, and Gailene Tobin. **2013**. "Discovery, Development, and Regulation of Natural Products." In , edited by Marianna B T - Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century Kulka, Ch. 01. Rijeka: InTech. doi:10.5772/56424.
- Krippendorff**, Ben-Fillippo, Philip Lienau, Andreas Reichel, and Wilhelm Huisinga. **2007**. "Optimizing Classification of Drug-Drug Interaction Potential for CYP450 Isoenzyme Inhibition Assays in Early Drug Discovery." *Journal of Biomolecular Screening* 12 (1). United States: 92–99. doi:10.1177/1087057106295897.
- Kurz**, M, and W Guba. **1996**. "3D Structure of Ramoplanin: A Potent Inhibitor of Bacterial Cell Wall Synthesis." *Biochemistry* 35 (38). UNITED STATES: 12570–75. doi:10.1021/bi961017q.
- Lam**, Kin S. **2007**. "New Aspects of Natural Products in Drug Discovery." *Trends in Microbiology* 15 (6): 279–89. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.001.
- Lambert**, M. P., and F. C. Neuhaus. **1972**. "Mechanism of D-Cycloserine Action: Alanine Racemase from Escherichia Coli W." *Journal of Bacteriology* 110 (3): 978–87.
- Lane**, D. **1991**. "16S/23S rRNA Sequencing." In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, edited by E Stackebrandt and M Goodfellow, 115–75. Wiley, New York.
- Lanoot**, Benjamin, Marc Vancanneyt, Peter Dawyndt, Margo Cnockaert, Jianli Zhang, Ying Huang, Zhiheng Liu, and Jean Swings. **2004**. "BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus Streptomyces. Emended Descriptions Are Proposed for the Species Streptomyces Cinereorectus, S. Fradiae, S. Tricolor, S. Colombiensis, S. Filamentosus, S. Vinaceus and S. Pha." *Systematic and Applied Microbiology* 27 (1). Germany: 84–

92. doi:10.1078/0723-2020-00257.

- Lawrence**, T., C. Rotstein, T. R. Beam, E. a. Gorzynski, and D. Amsterdam. **1993**. "In Vitro Activities of Ramoplanin, Selected Glycopeptides, Fluoroquinolones, and Other Antibiotics against Clinical Bloodstream Isolates of Gram-Positive Cocci." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (4): 896–900. doi:10.1128/AAC.37.4.896.
- Laxminarayan**, Ramanan, Anup Malani, David Howard, and David L Smith. **2007**. "Extending the Cure: Policy Responses to the Growing Threat of Antibiotic Resistance." *Prevention*. doi:10.4324/9781936331086.
- Lecerclé**, Delphine, Anthony Clouet, Bayan Al-Dabbagh, Muriel Crouvoisier, Ahmed Bouhss, Christine Gravier-Pelletier, and Yves Le Merrer. **2010**. "Bacterial Transferase MraY Inhibitors: Synthesis and Biological Evaluation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18 (12): 4560–69. doi:10.1016/j.bmc.2010.04.023.
- Lee**, Wonsik, Kaitlin Schaefer, Yuan Qiao, Veerasak Srisuknimit, Heinrich Steinmetz, Rolf Müller, Daniel Kahne, and Suzanne Walker. **2016**. "The Mechanism of Action of Lysobactin." *Journal of the American Chemical Society* 138 (1). American Chemical Society: 100–103. doi:10.1021/jacs.5b11807.
- Leiva P**, Sergio, Marisa Yáñez S, Luis Zaror C, Héctor Rodríguez S, and Héctor García-Quintana. **2004**. "Actividad Antimicrobiana de Actinomycetes Aislados Desde Ambientes Acuáticos Del Sur de Chile." *Revista Médica de Chile* 132 (2). Sociedad Médica de Santiago: 151–59. doi:10.4067/S0034-98872004000200003.
- Levine**, Donald P. **2006**. "Vancomycin: A History." *Clinical Infectious Diseases* 42 (Supplement 1): S5–12. doi:10.1086/491709.
- Li**, Jie, Guo-Zhen Zhao, Hai-Yu Huang, Sheng Qin, Wen-Yong Zhu, Li-Xing Zhao, Li-Hua Xu, Si Zhang, Wen-Jun Li, and Gary Strobel. **2012**. "Isolation and Characterization of Culturable Endophytic Actinobacteria Associated with *Artemisia Annu* L." *Antonie van Leeuwenhoek* 101 (3). Netherlands: 515–27. doi:10.1007/s10482-011-9661-3.
- Lin**, Yang-I, Zhong Li, Gerardo D Francisco, Leonard A McDonald, Rachel A Davis, Guy Singh, Youjun Yang, and Tarek S Mansour. **2002**. "Muraymycins, Novel Peptidoglycan Biosynthesis Inhibitors: Semisynthesis and SAR of Their Derivatives." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 (17). England: 2341–44.

- Ling**, Losee L, Tanja Schneider, Aaron J Peoples, Amy L Spoering, Ina Engels, Brian P Conlon, Anna Mueller, et al. **2015**. "A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance." *Nature* 517 (7535). England: 455–59. doi:10.1038/nature14098.
- Lo**, Mei-Chu, Hongbin Men, Arthur Branstrom, Jeremiah Helm, Nan Yao, Robert Goldman, and Suzanne Walker. **2000**. "A New Mechanism of Action Proposed for Ramoplanin." *Journal of the American Chemical Society* 122 (14). American Chemical Society: 3540–41. doi:10.1021/ja000182x.
- Louws**, F, Schneider, and de Bruijn. **1995**. "Assessing Genetic Diversity of Microbes Using Repetitive Sequence-Based PCR (Rep-PCR)." In *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples*, edited by G. Toranzos. Technomic Publishing Co.
- Lovering**, Andrew L., Susan S. Safadi, and Natalie C.J. Strynadka. **2012**. "Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly." *Annual Review of Biochemistry*. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-112742.
- Lovering**, Andrew L, Liza H de Castro, Daniel Lim, and Natalie C J Strynadka. **2007**. "Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis." *Science (New York, N.Y.)* 315 (5817): 1402–5. doi:10.1126/science.1136611.
- Lubelski**, J., R. Rink, R. Khusainov, G. N. Moll, and O. P. Kuipers. **2008**. "Biosynthesis, Immunity, Regulation, Mode of Action and Engineering of the Model Lantibiotic Nisin." *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-007-7171-2.
- Ma**, B, T Prueksaritanont, and J H Lin. **2000**. "Drug Interactions with Calcium Channel Blockers: Possible Involvement of Metabolite-Intermediate Complexation with CYP3A." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 28 (2). UNITED STATES: 125–30.
- Madigan**, Michael T, John M Martinko, Paul V Dunlap, and David P Clark. **2008**. *Brock Biology of Microorganisms (12th Edition)*. Cell. Vol. 2. doi:10.1016/B978-1-4832-3136-5.50010-3.
- Maffioli**, Sonia I, Yu Zhang, David Degen, Thomas Carzaniga, Giancarlo Del Gatto, Stefania Serina, Paolo Monciardini, et al. **2017**. "Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase." *Cell* 169 (7). Elsevier: 1240–1248.e23.

doi:10.1016/j.cell.2017.05.042.

- Mahajan**, Girish B, and Lakshmi Balachandran. **2017**. "Sources of Antibiotics: Hot Springs." *Biochemical Pharmacology* 134 (June). England: 35–41. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.021.
- Maki**, Hideki, Kenji Miura, and Yoshinori Yamano. **2001**. "Katanosin B and Plusbacin A(3), Inhibitors of Peptidoglycan Synthesis in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (6). American Society for Microbiology: 1823–27. doi:10.1128/AAC.45.6.1823-1827.2001.
- Marcone**, Giorgia Letizia, Elisa Binda, Marcella Reguzzoni, Luciano Gastaldo, Claudia Dalmastrì, and Flavia Marinelli. **2017**. "Classification of Actinoplanes Sp. ATCC 33076, an Actinomycete That Produces the Glycolipodepsipeptide Antibiotic Ramoplanin, as Actinoplanes Ramoplaninifer Sp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (10). England: 4181–88. doi:10.1099/ijsem.0.002281.
- Marmor**, S., C. P. Petersen, F. Reck, W. Yang, N. Gao, and S. L. Fisher. **2001**. "Biochemical Characterization of a Phosphinate Inhibitor of Escherichia Coli MurC." *Biochemistry* 40 (40): 12207–14. doi:10.1021/bi015567m.
- Martin**, Jesus, Gloria Crespo, Victor Gonzalez-Menendez, Guiomar Perez-Moreno, Paula Sanchez-Carrasco, Ignacio Perez-Victoria, Luis M Ruiz-Perez, et al. **2014**. "MDN-0104, an Antiplasmodial Betaine Lipid from Heterospora Chenopodii." *Journal of Natural Products* 77 (9). United States: 2118–23. doi:10.1021/np500577v.
- Martínez-Martínez**, Luis, and Jorge Calvo. **2010**. "Desarrollo de Las Resistencias a Los Antibióticos: Causas, Consecuencias y Su Importancia Para La Salud Pública." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28 (Supl 4). Elsevier: 4–9. doi:10.1016/S0213-005X(10)70035-5.
- Martínez**, Jose L, Fernando Baquero, and Dan I Andersson. **2007**. "Predicting Antibiotic Resistance." *Nature Reviews. Microbiology* 5 (12). England: 958–65. doi:10.1038/nrmicro1796.

- Martínez Rivera M.E., González González A. Betancourt Núñez A. Rodríguez Morales C.M. 2006.** “Vancomicina. Un Vencedor Vencido.” *MEDICRIT. Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica* 3 (6): 136–38.
- Mascher, Thorsten. 2006.** “Intramembrane-Sensing Histidine Kinases: A New Family of Cell Envelope Stress Sensors in Firmicutes Bacteria.” *FEMS Microbiology Letters* 264 (2). Netherlands: 133–44. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00444.x.
- Mascher, Thorsten, Neil G. Margulis, Tao Wang, Rick W. Ye, and John D. Helmann. 2003.** “Cell Wall Stress Responses in *Bacillus Subtilis*: The Regulatory Network of the Bacitracin Stimulon.” *Molecular Microbiology* 50 (5): 1591–1604. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03786.x.
- Mascher, Thorsten, Sara L. Zimmer, Terry Ann Smith, and John D. Helmann. 2004.** “Antibiotic-Inducible Promoter Regulated by the Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System LiaRS of *Bacillus Subtilis*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (8): 2888–96. doi:10.1128/AAC.48.8.2888-2896.2004.
- Mathew, Betty Titus, Shaima Raji, Sawsan Dagher, Ali Hilal-Alnaqbi, Abdel-Hamid Ismail Mourad, Sulaiman Al-Zuhair, Mahmoud Al Ahmad, Khaled Abbas El-Tarabily, and Amr Amin. 2018.** “Bilirubin Detoxification Using Different Phytomaterials: Characterization and in Vitro Studies.” *International Journal of Nanomedicine* 13 (May). Dove Medical Press: 2997–3010. doi:10.2147/IJN.S160968.
- Mathur, Harsh, Paula M. O’Connor, Colin Hill, Paul D. Cotter, and R. Paul Ross. 2013.** “Analysis of Anti-*Clostridium Difficile* Activity of Thuricin CD, Vancomycin, Metronidazole, Ramoplanin, and Actagardine, Both Singly and in Paired Combinations.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (6): 2882–86. doi:10.1128/AAC.00261-13.
- McAuliffe, O, R P Ross, and C Hill. 2001.** “Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action.” *FEMS Microbiology Reviews* 25 (3). England: 285–308.
- McCafferty, Dewey G, Predrag Cudic, Brenda A Frankel, Salim Barkallah, Ryan G Kruger, and Wenkai Li. 2002.** “Chemistry and Biology of the Ramoplanin Family of Peptide Antibiotics.” *Biopolymers* 66 (4). United States: 261–84. doi:10.1002/bip.10296.

- McDonald**, Leonard A, Laurel R Barbieri, Guy T Carter, Eileen Lenoy, Jason Lotvin, Peter J Petersen, Marshall M Siegel, Guy Singh, and R Thomas Williamson. **2002**. "Structures of the Muraymycins, Novel Peptidoglycan Biosynthesis Inhibitors." *Journal of the American Chemical Society* 124 (35). United States: 10260–61.
- McGinnity**, Dermot F, Nigel J Waters, James Tucker, and Robert J Riley. **2008**. "Integrated in Vitro Analysis for the in Vivo Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug-Drug Interactions." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36 (6). United States: 1126–34. doi:10.1124/dmd.108.020446.
- Meier-Kolthoff**, Jan P, Hans-Peter Klenk, and Markus Goker. **2014**. "Taxonomic Use of DNA G+C Content and DNA-DNA Hybridization in the Genomic Age." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 2). England: 352–56. doi:10.1099/ijms.0.056994-0.
- Mengin-Lecreulx**, Dominique, Tim Falla, Didier Blanot, Jean Van Heijenoort, David J. Adams, and Ian Chopra. **1999**. "Expression of the Staphylococcus aureus UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamate:L-Lysine Ligase in Escherichia coli and Effects on Peptidoglycan Biosynthesis and Cell Growth." *Journal of Bacteriology* 181 (19): 5909–14.
- Meroueh**, Samy O, Krisztina Z Bencze, Dusan Heseck, Mijoon Lee, Jed F Fisher, Timothy L Stemmler, and Shahriar Mobashery. **2006**. "Three-Dimensional Structure of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4404–9. doi:10.1073/pnas.0510182103.
- Mitra**, R, M Satpathy, and S P Srinivas. **2002**. "Tunicamycin Induced Unfolded Protein Response (UPR) In Cultured Bovine Trabecular Meshwork (TM) Cells." *ARVO Meeting Abstracts* 43 (12): 4086. <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/43/12/4086>.
- Mohammadi**, Tamimount, Vincent van Dam, Robert Sijbrandi, Thierry Vernet, André Zapun, Ahmed Bouhss, Marlies Diepeveen-de Bruin, Martine Nguyen-Distèche, Ben de Kruijff, and Eefjan Breukink. **2011**. "Identification of FtsW as a Transporter of Lipid-linked Cell Wall Precursors across the Membrane." *The EMBO Journal* 30 (8): 1425–32. <http://emboj.embopress.org/content/30/8/1425.abstract>.

- Mohammadipanah**, Fatemeh, and Joachim Wink. **2015**. "Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity." *Frontiers in Microbiology* 6. Switzerland: 1541. doi:10.3389/fmicb.2015.01541.
- Mol**, Clifford D., Alexei Brooun, Douglas R. Dougan, Mark T. Hilgers, Leslie W. Tari, Robert A. Wijnands, Mark W. Knuth, Duncan E. McRee, and Ronald V. Swanson. **2003**. "Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate- and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid:L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus Influenzae*." *Journal of Bacteriology* 185 (14): 4152–62. doi:10.1128/JB.185.14.4152-4162.2003.
- Montecalvo**, Marisa A. 2003. "Ramoplanin: A Novel Antimicrobial Agent with the Potential to Prevent Vancomycin-Resistant Enterococcal Infection in High-Risk Patients." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 Suppl 3: iii31-i35. doi:10.1093/jac/dkg274.
- Muller**, Anna, Anna Klockner, and Tanja Schneider. **2017**. "Targeting a Cell Wall Biosynthesis Hot Spot." *Natural Product Reports* 34 (7). The Royal Society of Chemistry: 909–32. doi:10.1039/C7NP00012J.
- Münch**, Daniela, and Hans-Georg Sahl. **2015**. "Structural Variations of the Cell Wall Precursor Lipid II in Gram-Positive Bacteria — Impact on Binding and Efficacy of Antimicrobial Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbamem.2015.04.014.
- M11-A8**. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Eight Edition. CLSI-**2012**
- Nam**, Joonwoo, Dongwoo Shin, Yosup Rew, and Dale L Boger. **2007**. "Alanine Scan of [L-Dap(2)]Ramoplanin A2 Aglycon: Assessment of the Importance of Each Residue." *Journal of the American Chemical Society* 129 (28):8747–55. doi:10.1021/ja068573k.
- NCCLS**. **2007** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS, 27(1), 1–182. <http://doi.org/1-56238-525-5>
- Newman**, David J, and Gordon M Cragg. **2012**. "Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *Journal of Natural Products* 75 (3): 311–35. doi:10.1021/np200906s.

- Newman**, David, and Gordon M. Cragg. **2016**. "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014." *Journal of Natural Products*. Vol. 79. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- Nichols**, D, N Cahoon, E M Trakhtenberg, L Pham, A Mehta, A Belanger, T Kanigan, K Lewis, and S S Epstein. **2010**. "Use of Ichip for High-Throughput in Situ Cultivation of "Uncultivable" Microbial Species." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (8). American Society for Microbiology: 2445–50. doi:10.1128/AEM.01754-09.
- O'Daniel**, Peter I, Jaroslav Zajicek, Weilie Zhang, Qicun Shi, Jed F Fisher, and Shahriar Mobashery. **2010**. "Elucidation of the Structure of the Membrane Anchor of Penicillin-Binding Protein 5 of *Escherichia Coli*." *Journal of the American Chemical Society* 132 (12): 4110–18. doi:10.1021/ja9094445.
- O'Hare**, M D, D Felmingham, and R N Gruneberg. **1988**. "The in Vitro Activity of Ramoplanin (A-16686/MDL 62,198), Vancomycin and Teicoplanin against Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Spp.*" *Drugs under Experimental and Clinical Research* 14 (10). SWITZERLAND: 617–19.
- O'Hare**, M D, G Ghosh, D Felmingham, and R N Gruneberg. **1990**. "In-Vitro Studies with Ramoplanin (MDL 62,198): A Novel Lipoglycopeptide Antimicrobial." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 25 (2). ENGLAND: 217–20.
- Obach**, R Scott, Robert L Walsky, Karthik Venkatakrisnan, Emily A Gaman, J Brian Houston, and Larry M Tremaine. **2006**. "The Utility of in Vitro Cytochrome P450 Inhibition Data in the Prediction of Drug-Drug Interactions." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316 (1). United States: 336–48. doi:10.1124/jpet.105.093229.
- Onishi**, H R, B A Pelak, L S Gerckens, L L Silver, F M Kahan, M H Chen, A A Patchett, et al. **1996**. "Antibacterial Agents That Inhibit Lipid A Biosynthesis." *Science (New York, N.Y.)* 274 (5289). United States: 980–82.
- Ostash**, Bohdan, and Suzanne Walker. **2010**. "Moenomycin Family Antibiotics: Chemical Synthesis, Biosynthesis, Biological Activity." *Natural Product Reports* 27 (11): 1594–1617. doi:10.1039/c001461n.

- Pan**, Hai Xue, Zhou Zhou Chen, Lei Shao, Ji An Li, Jun Sheng Chen, Chun Bao Zhu, Gong Li Tang, and Dai Jie Chen. **2013**. "Production of Ramoplanin Analogues by Genetic Engineering of *Actinoplanes* Sp." *Biotechnology Letters* 35 (10): 1685–92. doi:10.1007/s10529-013-1261-z.
- Paterson**, Ian, and Edward A Anderson. **2005**. "Chemistry. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates." *Science (New York, N.Y.)* 310 (5747). United States: 451–53. doi:10.1126/science.1116364.
- Payne**, David J, Michael N Gwynn, David J Holmes, and David L Pompliano. **2007**. "Drugs for Bad Bugs: Confronting the Challenges of Antibacterial Discovery." *Nature Reviews. Drug Discovery* 6 (1): 29–40. doi:10.1038/nrd2201.
- Pearson**, Karl. **1926**. "On the Coefficient of Racial Likeness." *Biometrika* 18 (1–2): 105–17. doi:10.1093/biomet/18.1-2.105.
- Peláez**, Fernando. 2006. "The Historical Delivery of Antibiotics from Microbial Natural Products - Can History Repeat?" *Biochemical Pharmacology*. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.010.
- Peláez**, T., L. Alcalá, R. Alonso, a. Martín-López, V. García-Arias, M. Marín, and E. Bouza. **2005**. "In Vitro Activity of Ramoplanin against *Clostridium Difficile*, Including Strains with Reduced Susceptibility to Vancomycin or with Resistance to Metronidazole." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (3): 1157–59. doi:10.1128/AAC.49.3.1157-1159.2005.
- Pérez-Victoria**, Ignacio, Jesus Martin, and Fernando Reyes. 2016. "Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products." *Planta Medica* 82 (9–10). Germany: 857–71. doi:10.1055/s-0042-101763.
- Pérez**, José, Caridad Díaz, Francisco Asensio, Alexandra Palafox, Olga Genilloud, and Francisca Vicente. **2015**. "A Novel In Vitro Approach for Simultaneous Evaluation of CYP3A4 Inhibition and Kinetic Aqueous Solubility." *Journal of Biomolecular Screening* 20 (2): 254–64. doi:10.1177/1087057114552796.
- Petrosillo**, Nicola, Guido Granata, and Maria Adriana Cataldo. **2018**. "Novel Antimicrobials for the Treatment of *Clostridium Difficile* Infection." *Frontiers in Medicine*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2018.00096>.

- Pinho**, Mariana G, Morten Kjos, and Jan-Willem Veening. **2013**. "How to Get (a)Round: Mechanisms Controlling Growth and Division of Cocoid Bacteria." *Nat Rev Micro* 11 (9). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 601–14. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3088>.
- Rademaker**, J. L. W. y De Bruijn, F. J. **1997**. "Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis". En *DNA markers: Protocols, applications, and overviews*, pp. 151-171. Editado por G. Caetano-Anollés y P. M. Gresshoff. John Wiley.
- Raetz**, Christian R H, and Chris Whitfield. **2002**. "Lipopolysaccharide Endotoxins." *Annual Review of Biochemistry* 71: 635–700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Rateb**, Mostafa E, Rainer Ebel, and Marcel Jaspars. **2018**. "Natural Product Diversity of Actinobacteria in the Atacama Desert." *Antonie van Leeuwenhoek*, February. Netherlands. doi:10.1007/s10482-018-1030-z.
- Rausch**, Saskia, Anne Hänchen, Alexander Denisiuk, Marius Löhken, Tanja Schneider, and Roderich D Süßmuth. **2011**. "Feglymycin Is an Inhibitor of the Enzymes MurA and MurC of the Peptidoglycan Biosynthesis Pathway." *ChemBioChem* 12 (8). WILEY-VCH Verlag: 1171–73. doi:10.1002/cbic.201100120.
- Ravelo**, Ángel Gutiérrez, and Ana Estévez Braun. **2009**. "Relevancia de los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos en el S. XXI." *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* 103 (2): 409–19.
- Reynolds**, P E, and E A Somner. **1990**. "Comparison of the Target Sites and Mechanisms of Action of Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics." *Drugs under Experimental and Clinical Research* 16 (8). SWITZERLAND: 385–89.
- Riedlinger**, Julia, Andreas Reicke, Hans Zähner, Bernhard Krismer, Alan T Bull, Luis A Maldonado, Alan C Ward, et al. **2004**. "Abyssomicins, Inhibitors of the Para-Aminobenzoic Acid Pathway Produced by the Marine *Verrucospora* Strain AB-18-032." *The Journal of Antibiotics* 57 (4): 271–79. doi:10.7164/antibiotics.57.271.
- Rincón**, Sandra, Diana Panesso, Lorena Díaz, Lina P Carvajal, Jinnethe Reyes, José M Munita, and César A Arias. **2014**. "Resistencia a Antibióticos de Última Línea En Cocos Gram Positivos: La Era Posterior a La Vancomicina." *Biomedica : Revista*

Del Instituto Nacional de Salud 34 (0 1): 191–208. doi:10.1590/S0120-41572014000500022.

Rojas, Jose Luis, Jesus Martin, Jose Ruben Tormo, Francisca Vicente, Mara Brunati, Ismaela Ciciliato, Daniele Losi, et al. **2009**. “Bacterial Diversity from Benthic Mats of Antarctic Lakes as a Source of New Bioactive Metabolites.” *Marine Genomics* 2 (1). Netherlands: 33–41. doi:10.1016/j.margen.2009.03.005.

Rolston, K V, N Dholakia, D H Ho, B LeBlanc, T Dvorak, and H Streeter. **1996**. “In-Vitro Activity of Ramoplanin (a Novel Lipoglycopeptide), Vancomycin, and Teicoplanin against Gram-Positive Clinical Isolates from Cancer Patients.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 38 (2): 265–69.

Ruzin, Alexey, Guy Singh, Anatoly Severin, Youjun Yang, Russell G. Dushin, Alan G. Sutherland, Albert Minnick, et al. **2004**. “Mechanism of Action of the Mannopeptimycins, a Novel Class of Glycopeptide Antibiotics Active against Vancomycin-Resistant Gram-Positive Bacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (3): 728–38. doi:10.1128/AAC.48.3.728-738.2004.

Saitou, N, and M Nei. **1987**. “The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees.” *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406–25. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.abstract>.

Salazar, Oscar, Aranzazu Valverde, and Olga Genilloud. **2006**. “Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Geodermatophilaceae from Stone Samples and Identification of New Members of the Genus *Blastococcus*.” *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1). United States: 346–52. doi:10.1128/AEM.72.1.346-352.2006.

Sauvage, Eric, Frédéric Kerff, Mohammed Terrak, Juan a Ayala, and Paulette Charlier. **2008**. “The Penicillin-Binding Proteins: Structure and Role in Peptidoglycan Biosynthesis.” *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2): 234–58. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.

Schmidt, John W. **2010**. “Generation of Ramoplanin-Resistant *Staphylococcus Aureus*” 310 (2): 104–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02051.x.

Schneider, Tanja, Thomas Kruse, Reinhard Wimmer, Imke Wiedemann, Vera Sass, Ulrike Pag, Andrea Jansen, et al. **2010**. “Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II.” *Science (New York, N.Y.)* 328 (5982). United

States: 1168–72. doi:10.1126/science.1185723.

- Schrecke**, Karen, Sina Jordan, and Thorsten Mascher. **2013**. “Stoichiometry and Perturbation Studies of the LiaFSR System of *Bacillus Subtilis*.” *Molecular Microbiology* 87 (4): 769–88. doi:10.1111/mmi.12130.
- Schwarzer**, Dirk, Robert Finking, and Mohamed A Marahiel. **2003**. “Nonribosomal Peptides: From Genes to Products.” *Natural Product Reports* 20 (3). England: 275–87.
- Scotti**, Roberto, Jacqueline K Dulworth, Michael T Kenny, and Beth P Goldstein. **1993**. “Effect of Protein on Ramoplanin Broth Microdilution Minimum Inhibitory Concentrations.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 17 (3): 209–11. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0732-8893(93)90098-R.
- Sengupta**, Saswati, Madhab K Chattopadhyay, and Hans-Peter Grossart. **2013**. “The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature.” *Frontiers in Microbiology* 4. Switzerland: 47. doi:10.3389/fmicb.2013.00047.
- Shaabani**, Namir, Nadine Honke, Philipp A. Lang, Boris Görg, Peter Proksch, Nicole Gailus, Tomomi Gotoh, Dieter Häussinger, and Karl S. Lang. **2012**. “Tunicamycin Inhibits Diabetes.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 29 (3–4): 595–602. doi:10.1159/000338513.
- Sharma**, Bhawna, Rahul Handa, Kadam Nagpal, Swayam Prakash, Pankaj Kumar Gupta, and Rakesh Agrawal. **2015**. “Cycloserine-Induced Psychosis in a Young Female with Drug-Resistant Tuberculosis.” *General Hospital Psychiatry* 36 (4). Elsevier: 451.e3-451.e4. doi:10.1016/j.genhosppsych.2014.03.009.
- Shen**, Ben. **2003**. “Polyketide Biosynthesis beyond the Type I, II and III Polyketide Synthase Paradigms.” *Current Opinion in Chemical Biology* 7 (2). England: 285–95.
- Shin**, Dongwoo, Yosup Rew, and Dale L Boger. **2004**. “Total Synthesis and Structure of the Ramoplanin A1 and A3 Aglycons: Two Minor Components of the Ramoplanin Complex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33): 11977–79. doi:10.1073/pnas.0401419101.
- Shonekan**, D, D Mildvan, and S Handwerger. **1992**. “Comparative in Vitro Activities of Teicoplanin, Daptomycin, Ramoplanin, Vancomycin, and PD127,391 against Blood Isolates of Gram-Positive Cocci.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

36 (7): 1570–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191623/>.

- Simpson, E H. 1949.** “Measurement of Diversity.” *Nature* 163 (4148): 688. doi:10.1038/163688a0.
- Skarzynski, T, D H Kim, W J Lees, C T Walsh, and K Duncan. 1998.** “Stereochemical Course of Enzymatic Enolpyruvyl Transfer and Catalytic Conformation of the Active Site Revealed by the Crystal Structure of the Fluorinated Analogue of the Reaction Tetrahedral Intermediate Bound to the Active Site of the C115A Mutant of Mu.” *Biochemistry* 37 (8). UNITED STATES: 2572–77. doi:10.1021/bi9722608.
- Skwish, Stephen, Francisco Asensio, Greg King, Glenn Clarke, Gary Kath, Michael J Salvatore, and Claude Dufresne. 2004.** “FIZICS: Fluorescent Imaging Zone Identification System, a Novel Macro Imaging System.” *Journal of Biomolecular Screening* 9 (8). United States: 663–70. doi:10.1177/1087057104265289.
- Somner, E A, and P E Reynolds. 1990.** “Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis by Ramoplanin.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (3). UNITED STATES: 413–19.
- Stackebrandt, E., and J. Ebers. 2006.** “Taxonomic Parameters Revisited: Tarnished Gold Standards.” *Microbiology Today*.
- Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994.** “Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S RRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44 (4). Microbiology Society: 846–49. doi:10.1099/00207713-44-4-846.
- Stern, M J, G F Ames, N H Smith, E C Robinson, and C F Higgins. 1984.** “Repetitive Extragenic Palindromic Sequences: A Major Component of the Bacterial Genome.” *Cell* 37 (3). United States: 1015–26.
- Stone, K. John, and Jack L. Strominger. 1971.** “Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (12): 3223–27. doi:10.1073/pnas.68.12.3223.
- Suárez, Cristina, and Francesc Gudiol. 2009.** “Antibióticos Betalactámicos.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (02): 116–29. <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia->

clinica-28-articulo-antibioticos-betalactamicos-13133636.

- Tacconelli**, Evelina, Elena Carrara, Alessia Savoldi, Stephan Harbarth, Marc Mendelson, Dominique L Monnet, Celine Pulcini, et al. **2018**. "Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis." *The Lancet. Infectious Diseases* 18 (3). United States: 318–27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Tamura**, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar. **2013**. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–29. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tanner**, Martin E., Sabine Vaganay, Jean Van Heijenoort, and Didier Blanot. **1996**. "Phosphinate Inhibitors of the D-Glutamic Acid-Adding Enzyme of Peptidoglycan Biosynthesis." *Journal of Organic Chemistry* 61 (5): 1756–60. doi:10.1021/jo951780a.
- Thompson**, Julie D., Toby J. Gibson, Frédéric Plewniak, François Jeanmougin, and Desmond G. Higgins. **1997**. "The CLUSTAL X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools." *Nucleic Acids Research* 25 (24): 4876–82. doi:10.1093/nar/25.24.4876.
- Tindall**, Brian J., R. Rosselló-Móra, H. J. Busse, W. Ludwig, and P. Kämpfer. **2010**. "Notes on the Characterization of Prokaryote Strains for Taxonomic Purposes." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (1): 249–66. doi:10.1099/ijs.0.016949-0.
- Tomašić**, Tihomir, Nace Zidar, Andreja Kovač, Samo Turk, Mihael Simčič, Didier Blanot, Manica Müller-Premru, et al. **2010**. "5-Benzylidenethiazolidin-4-Ones as Multitarget Inhibitors of Bacterial Mur Ligases." *ChemMedChem* 5 (2): 286–95. doi:10.1002/cmdc.200900449.
- Torikata**, A, H Yoshikawa, T Katayama, M Arai, M Nakahara, and N Kitano. **1977**. "Pholipomycin, a New Member of Phosphoglycolipid Antibiotics. III. Biological Properties." *The Journal of Antibiotics* 30 (12): 1060–63.
- Tormo**, José R, Juan B. García, Mar DeAntonio, Julia Feliz, Aurora Mira, M.Teresa Díez, Pilar Hernández, and Fernando Peláez. **2003**. "A Method for the Selection of Production Media for Actinomycete Strains Based on Their Metabolite HPLC Profiles." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (10). Springer-

Verlag: 582–88. doi:10.1007/s10295-003-0084-7.

- Toussaint**, Kimberly A, and Jason C Gallagher. **2015**. “ β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations: From Then to Now .” *Annals of Pharmacotherapy* 49 (1): 86–98. doi:10.1177/1060028014556652.
- Trautman**, Eric P., and Jason M. Crawford. **2017**. “A New Nucleoside Antibiotic Chokes Bacterial RNA Polymerase.” *Biochemistry* 56 (37): 4923–24. doi:10.1021/acs.biochem.7b00680.
- Trunkfield**, Amy E, Sudagar S Gurcha, Gurdyal S Besra, and Timothy D H Bugg. **2010**. “Inhibition of Escherichia coli Glycosyltransferase MurG and Mycobacterium tuberculosis Gal Transferase by Uridine-Linked Transition State Mimics.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (7). England: 2651–63. doi:10.1016/j.bmc.2010.02.026.
- Urbano**, Maria, Leonore Okwara, Paul Manser, Kathrin Hartmann, Amy Herndon, and Stephen I Deutsch. **2014**. “A Trial of D-Cycloserine to Treat Stereotypies in Older Adolescents and Young Adults With Autism Spectrum Disorder.” *Clinical Neuropharmacology*. doi:10.1097/WNF.000000000000033.
- van Heijenoort**, Jean. **2001**. “Formation of the Glycan Chains in the Synthesis of Bacterial Peptidoglycan.” *Glycobiology* 11 (3): 25R–36R. doi:10.1093/glycob/11.3.25R.
- van Heijenoort**, Jean. **2007**. “Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. doi:10.1128/MMBR.00016-07.
- Vaneechoutte**, Mario, Luc Vauterin, Barbara Van Harselaar, Lenie Dijkshoorn, and Paul De Vos. **1999**. “Considerations in Evaluation of the Applicability of DNA Fingerprinting Techniques for Species Differentiation Letters to the Editor Considerations in Evaluation of the Applicability of DNA Fingerprinting Techniques for Species Differentiation” 37 (10): 3428–30.
- Verhulst**, Corinne, Céline Coiffard, Laurence J M Coiffard, Pierre Rivalland, and Yannick De Roeck-Holtzhauer. **1998**. “In Vitro Correlation between Two Colorimetric Assays and the Pyruvic Acid Consumption by Fibroblasts Cultured to Determine the Sodium Laurylsulfate Cytotoxicity.” *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 39 (3): 143–46.

doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719\(98\)00016-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719(98)00016-1).

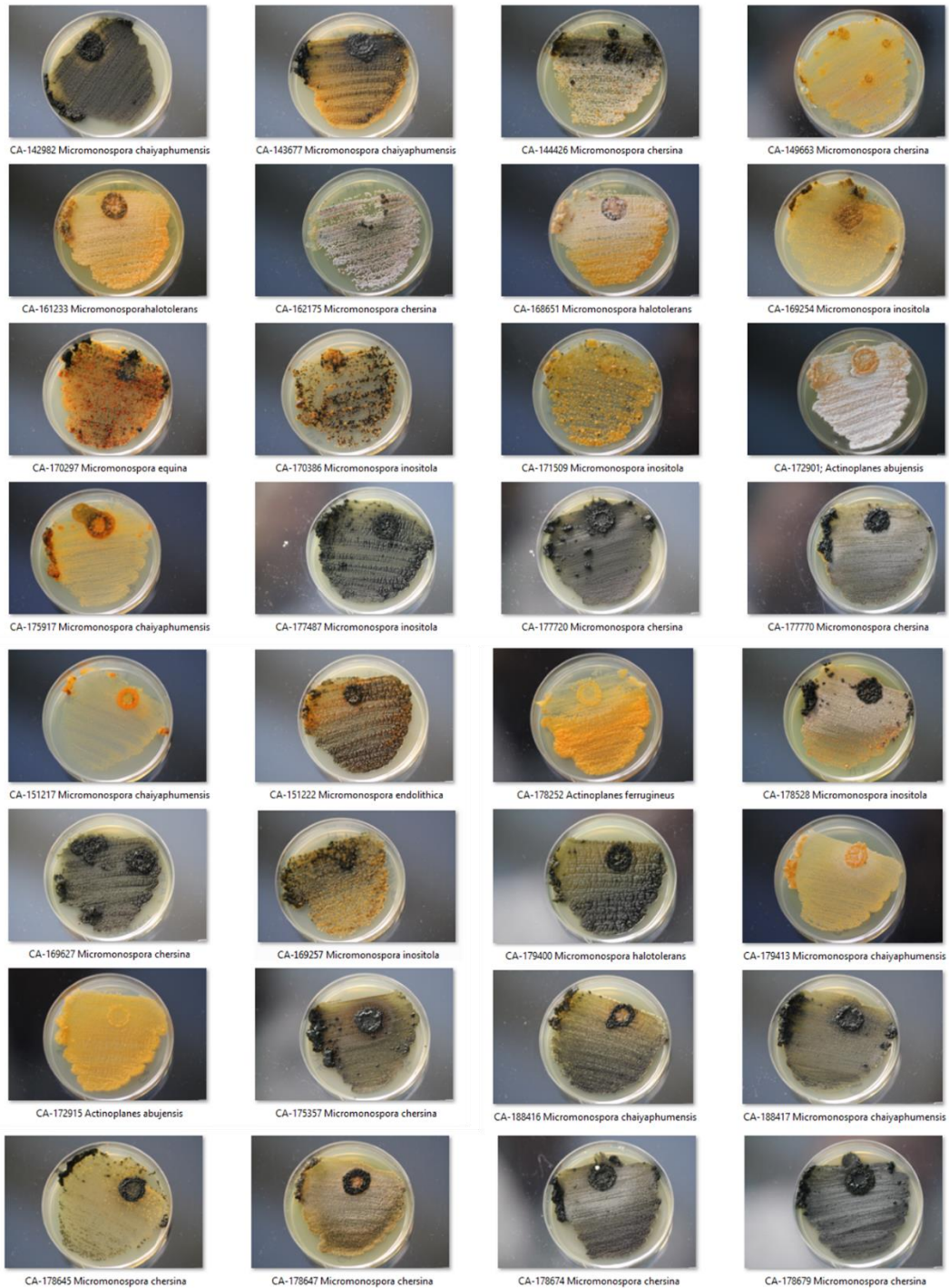
- Versalovic, J, T Koeth, and J R Lupski. 1991.** "Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes." *Nucleic Acids Research* 19 (24): 6823–31. doi:10.1093/nar/19.24.6823.
- Versalovic, J, Maria Schneider, FJ De Bruijn, and J.R. Lupski. 1994.** "Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction." *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25–40. doi:n.a.
- Versalovic, J., de Bruijn, F. J. y Lupski, J. R. 1998.** Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. En *Bacterial Genomes*, pp. 437-454. Editado por de Bruijn, F. J.; Lupski, J. R.; Weinstock, G. M. Kluwer Academic Publishers.
- Vicente, M F, A Cabello, G Platas, A Basilio, M T Diez, S Dreikorn, R A Giacobbe, et al. 2001.** "Antimicrobial Activity of Ergokonin A from *Trichoderma Longibrachiatum*." *Journal of Applied Microbiology* 91 (5). England: 806–13.
- Von Döhren, Hans. 2004.** "Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 Pp. \$99.95 (Hardcover)." *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. doi:10.1110/ps.041032204.
- Walker, Suzanne, Lan Chen, Yanan Hu, Yosup Rew, Dongwoo Shin, and Dale L. Boger. 2005.** "Chemistry and Biology of Ramoplanin: A Lipoglycopeptide with Potent Antibiotic Activity." *Chemical Reviews* 105 (2): 449–75. doi:10.1021/cr030106n.
- Walsh, C T, T E Benson, D H Kim, and W J Lees. 1996.** "The Versatility of Phosphoenolpyruvate and Its Vinyl Ether Products in Biosynthesis." *Chemistry & Biology* 3 (2). ENGLAND: 83–91.
- Waxman, D J, and J L Strominger. 1983.** "Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics1." *Annual Review of Biochemistry* 52 (1). Annual Reviews: 825–69. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.004141.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. a. Pelletier, and D. J. Lane. 1991.** "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study." *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697–703. doi:n.a.

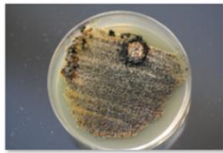
- West**, A H, and A M Stock. **2001**. "Histidine Kinases and Response Regulator Proteins in Two-Component Signaling Systems." *Trends in Biochemical Sciences* 26 (6). England: 369–76.
- Williams**, Dudley H, and Ben Bardsley. **1999**. "The Vancomycin Group of Antibiotics and the Fight against Resistant Bacteria." *Angewandte Chemie International Edition* 38 (9). WILEY-VCH Verlag GmbH: 1172–93. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990503)38:9<1172::AID-ANIE1172>3.0.CO;2-C.
- Williams**, S.T., Lanning, S. and Wellington, E.M.H. **1983**. "Ecology of actinomycetes. En *The Biology of Actinomycetes*", pp. 481–528. Editado por Goodfellow, M., Mordarski, M. y Williams, S.T. Academic Press, London, UK.
- Wolf**, D., F. Kalamorz, T. Wecke, a. Juszczak, U. Mader, G. Homuth, S. Jordan, et al. **2010**. "In-Depth Profiling of the LiaR Response of *Bacillus Subtilis*." *Journal of Bacteriology* 192 (18): 4680–93. doi:10.1128/JB.00543-10.
- Yamaguchi**, H, S Sato, S Yoshida, K Takada, M Itoh, H Seto, and N Otake. **1986**. "Capuramycin, a New Nucleoside Antibiotic. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Characterization." *The Journal of Antibiotics* 39 (8). Japan: 1047–53.
- Zak**, J. C y Willig, M. R. **2004**. *Analysis and Interpretation of Fungal Biodiversity Patterns. Biodiversity of Fungi : Inventory and Monitoring Methods*. Boston,MA: Elsevier Academic Press. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/5200284>.
- Zhang**, Weiwen, and Liang Shi. **2005**. "Distribution and Evolution of Multiple-Step Phosphorelay in Prokaryotes: Lateral Domain Recruitment Involved in the Formation of Hybrid-Type Histidine Kinases." *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 7). England: 2159–73. doi:10.1099/mic.0.27987-0.
- Zhang**, Z, S Schwartz, L Wagner, and W Miller. **2000**. "A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences." *Journal of Computational Biology : A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 7 (1–2). UNITED STATES: 203–14. doi:10.1089/10665270050081478.

9 ANEXOS

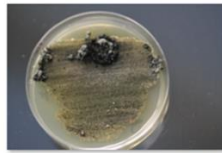
Anexo 1: Fotos de las 49 cepas de actinomicetos ordenadas por familias.

Micromonosporaceae

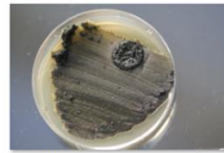




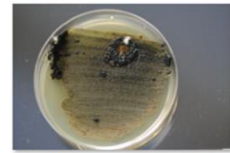
CA-179454 *Micromonospora chersina*



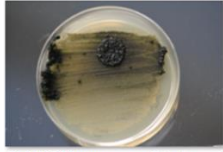
CA-182202 *Micromonospora chaiyaphumensis*



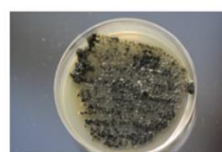
CA-182239 *Micromonospora chaiyaphumensis*



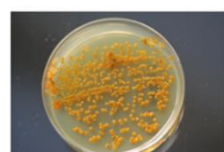
CA-182241 *Micromonospora chaiyaphumensis*



CA-188442 *Micromonospora chaiyaphumensis*

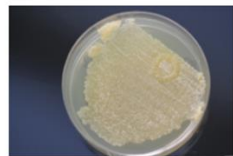


CA-177777 *Micromonospora chersina*

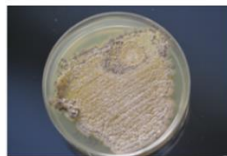


CA-178247 *Micromonospora fulviviridis*

Streptomycetaceae



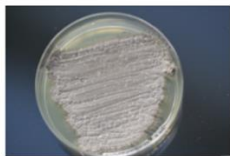
CA-152578 *Streptomyces mirabilis*



CA-177328 *Streptomyces atrovirens*



CA-177430 *Streptomyces atrovirens*

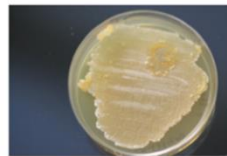


CA-178368 *Streptomyces* sp.

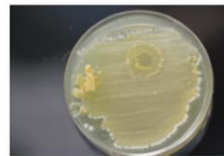
Pseudonocardiaceae



CA-117398 *Amycolatopsis umgeniensis*



CA-117410 *Amycolatopsis umgeniensis*

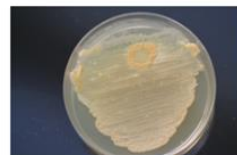


CA-178253 *Lechevalieria atacamensis*

Nocardiaceae



CA-146703 *Nocardia niigatensis*



CA-161197 *Nocardia testacea*

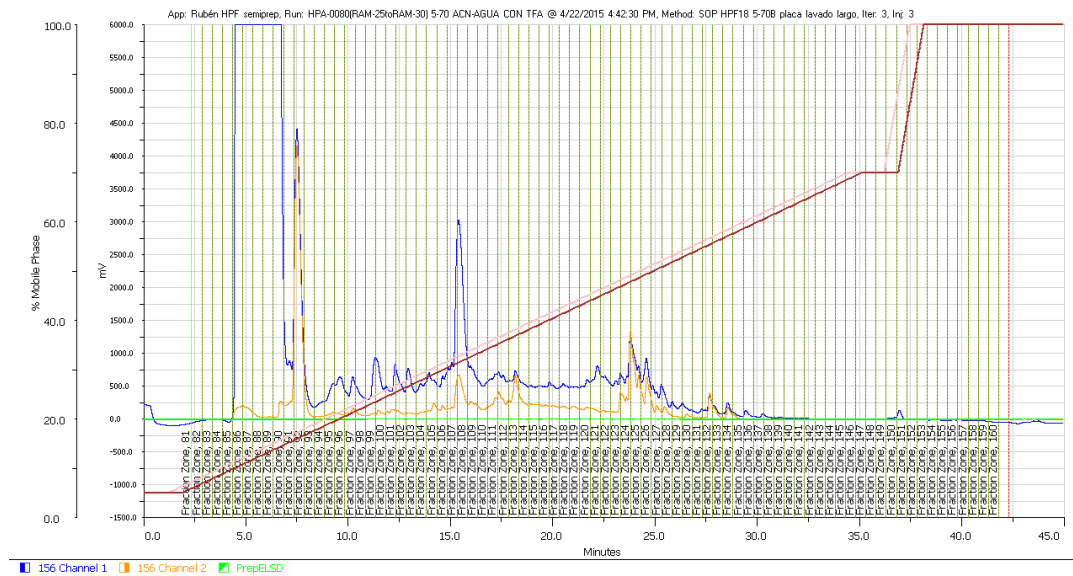
No identificado



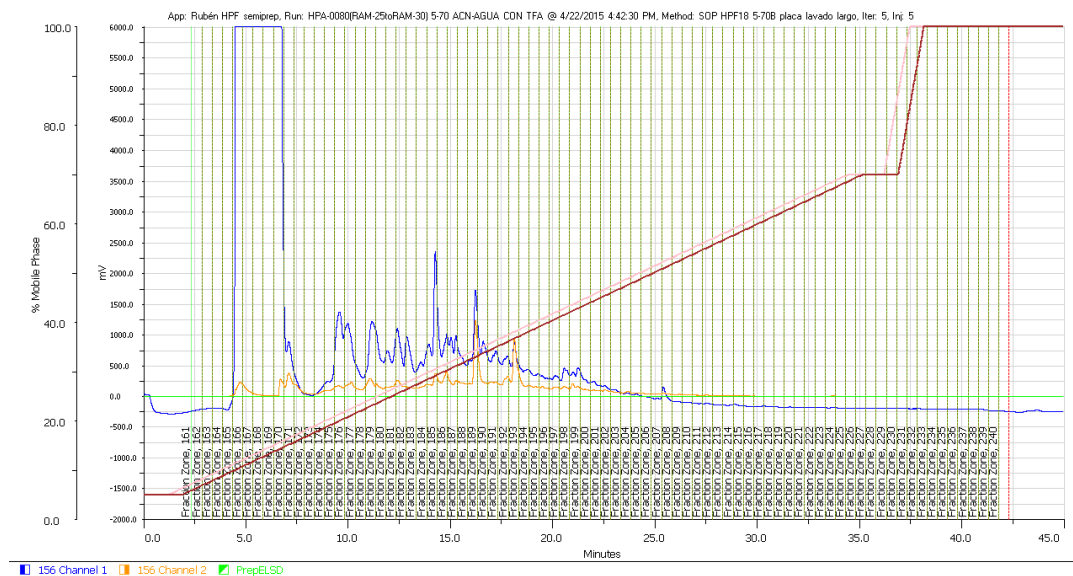
CA-179434 No Identificado

Anexo 2: Perfiles cromatográficos del fraccionamiento semipreparativo de los 36 extractos seleccionados para identificación química.

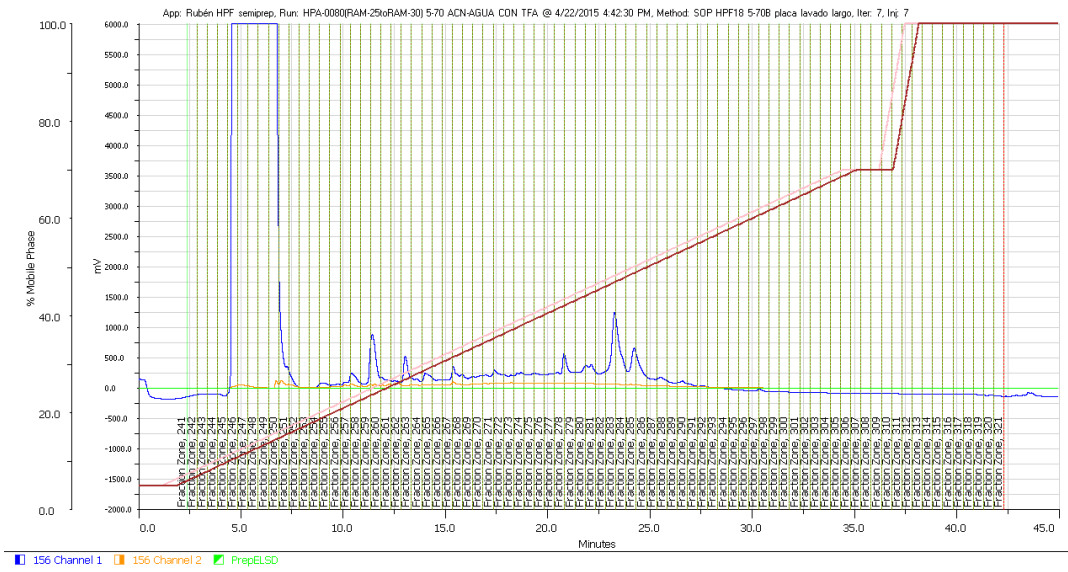
1. CA-117398-MO010-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



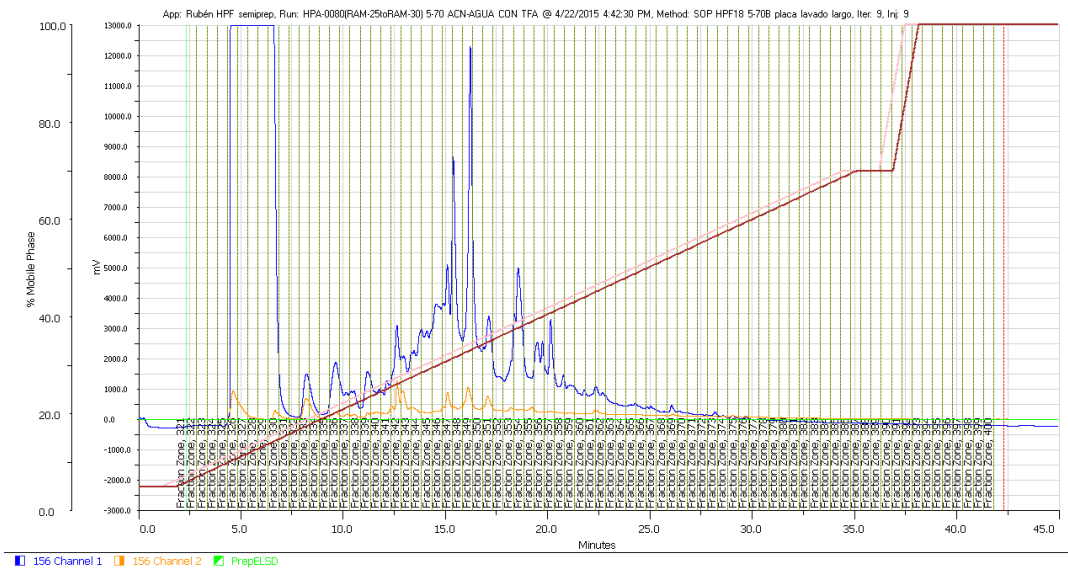
2. CA-117410-MO008-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



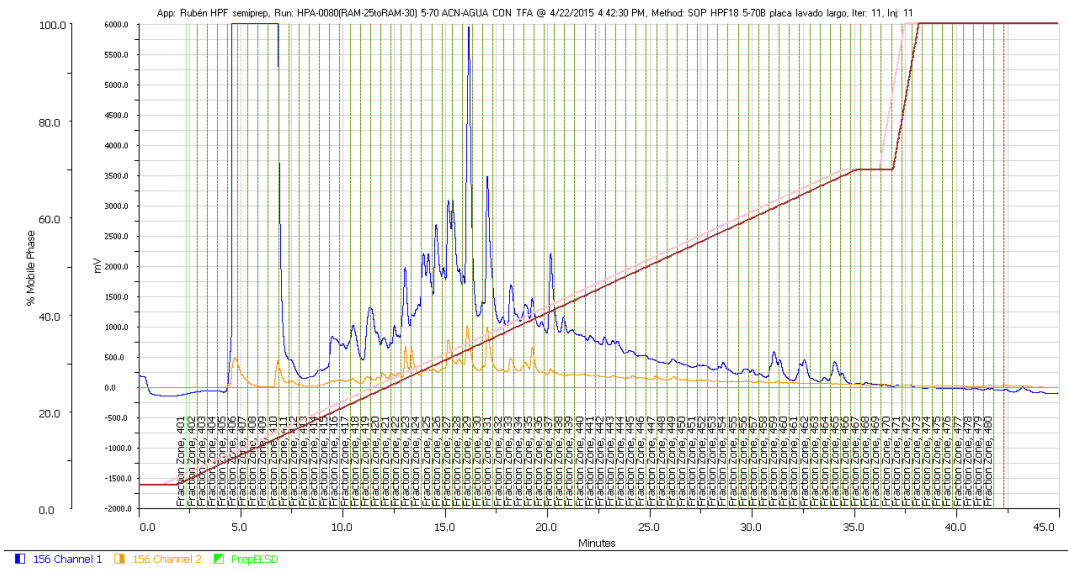
3. CA-161197-MO010-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



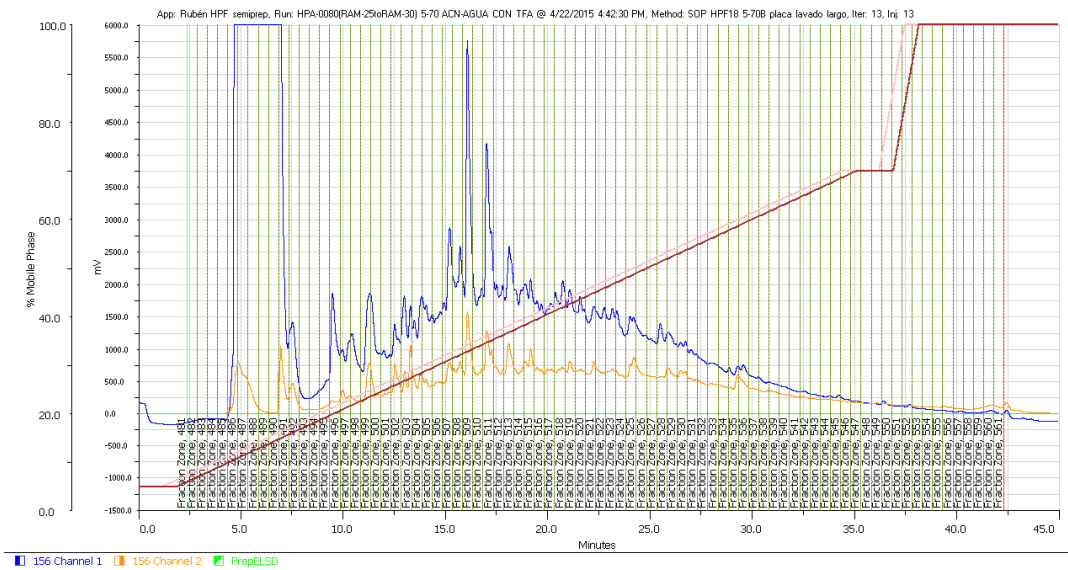
4. CA-168651-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



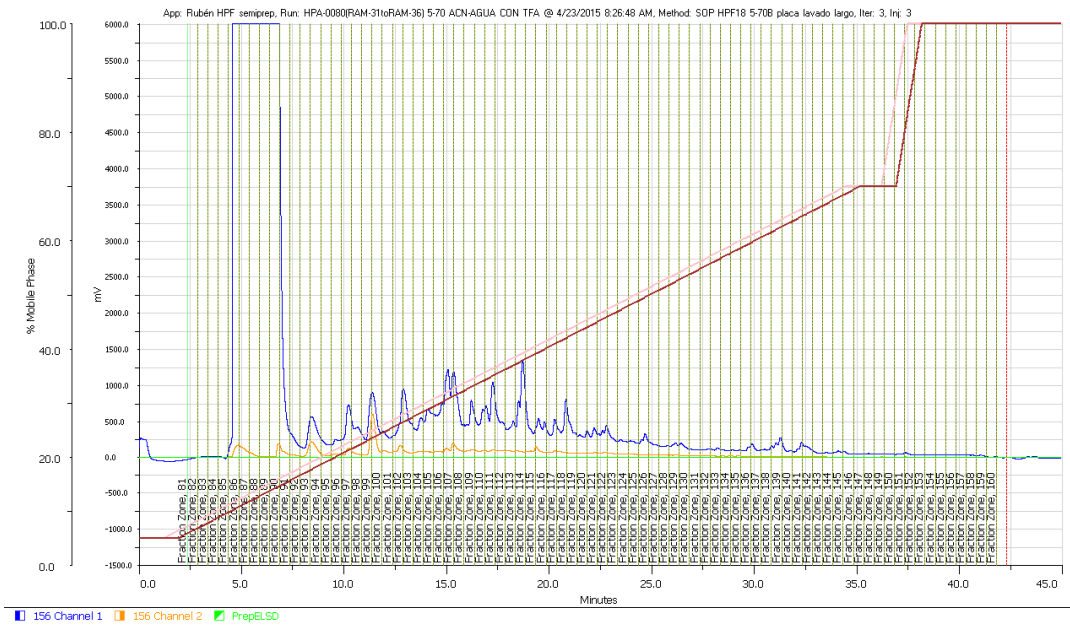
5. CA-169254-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



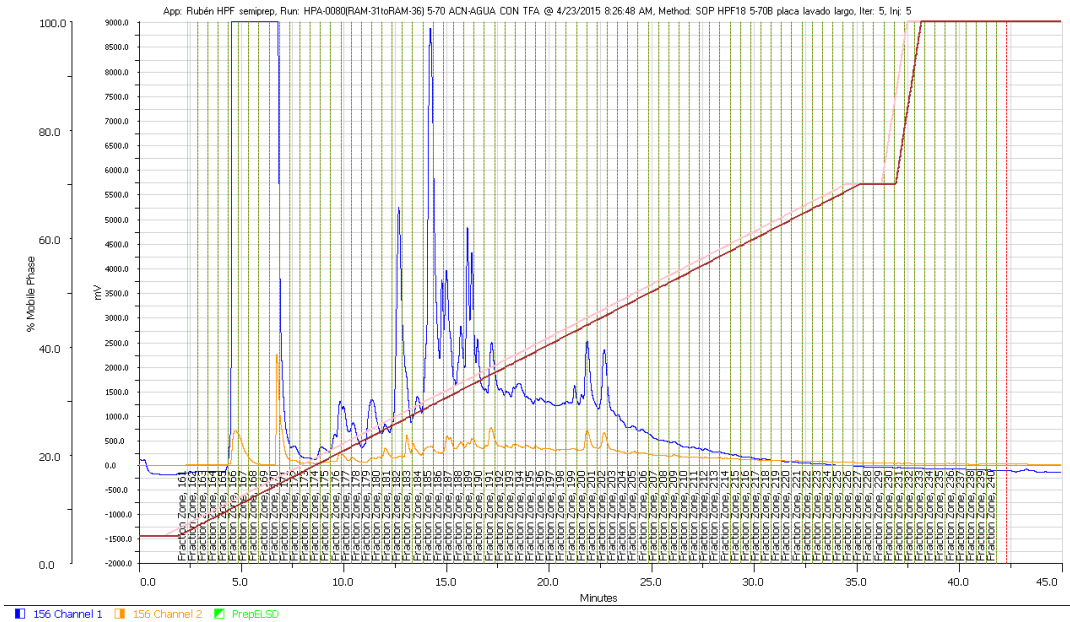
6. CA-169627-MO008-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



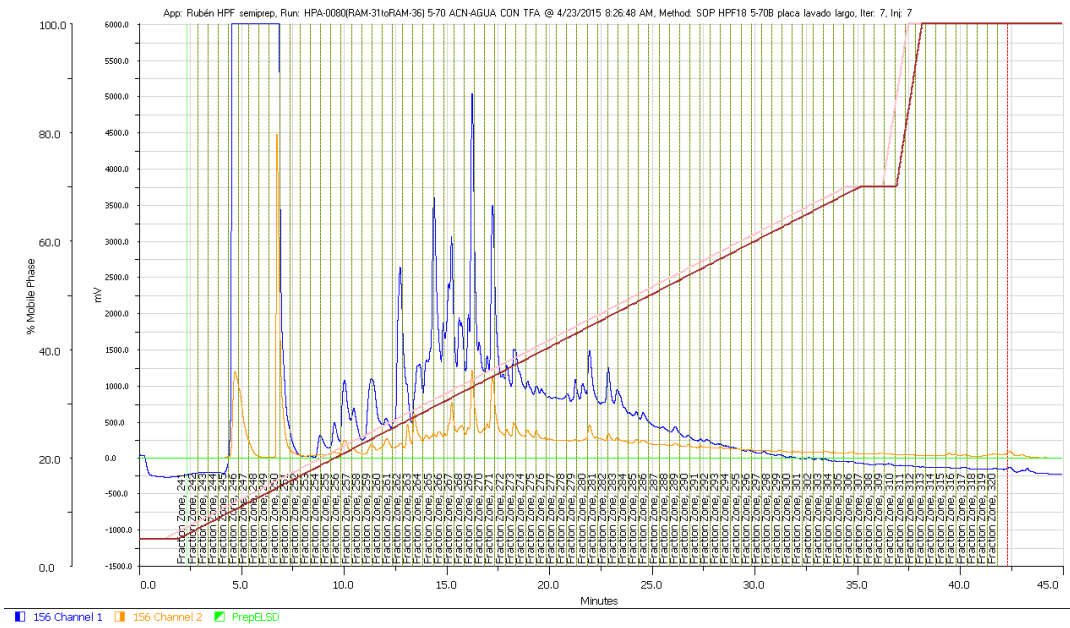
7. CA-175357-MO009-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



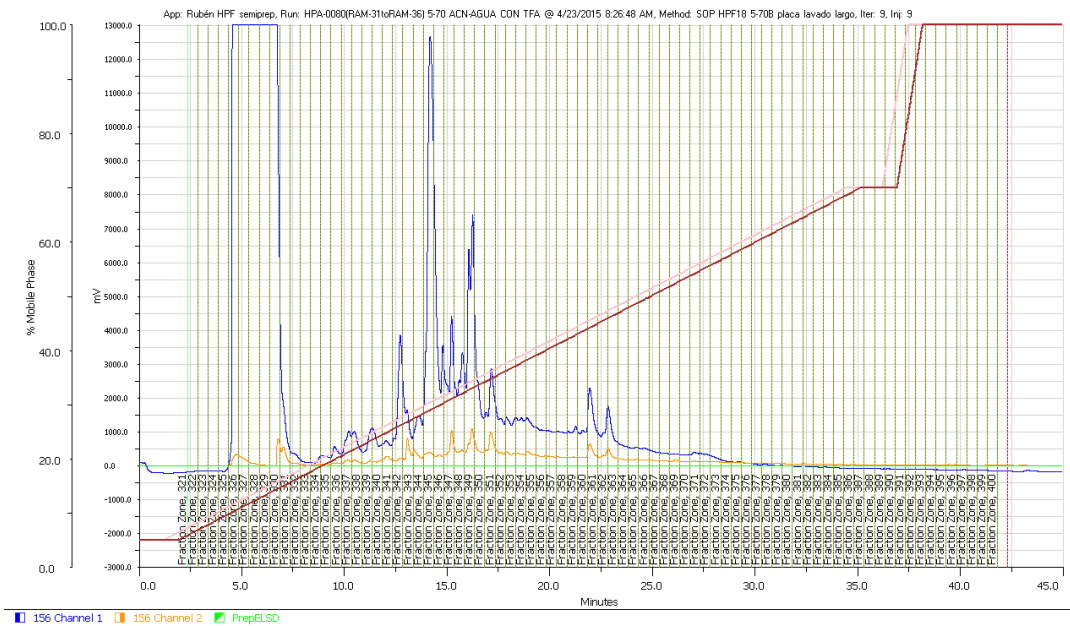
8. CA-177328-MO024-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



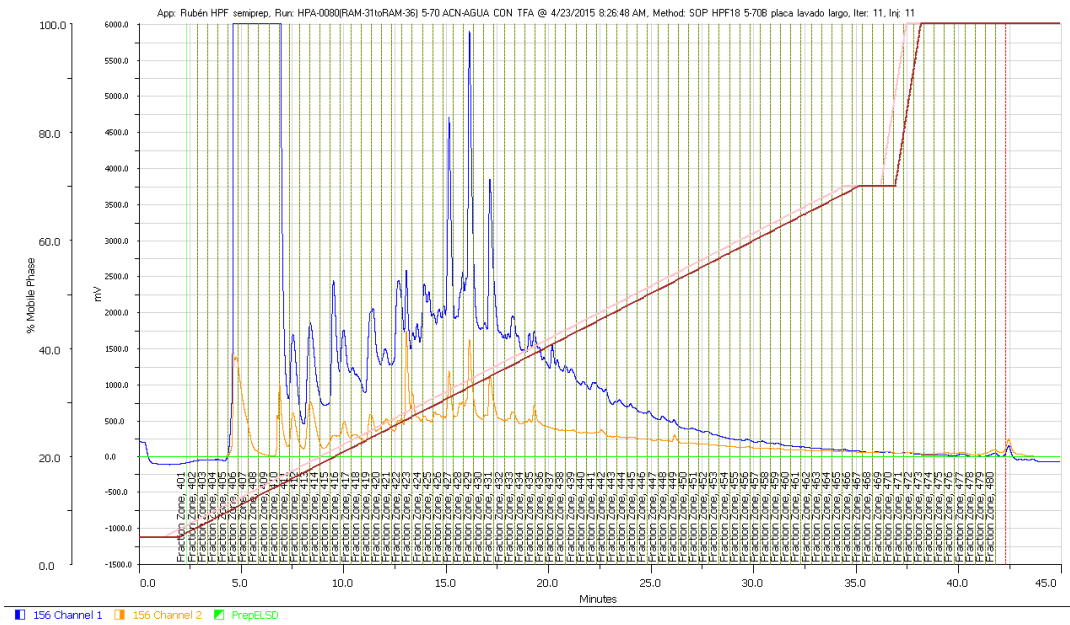
9. CA-177430-MO025-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



10. CA-178368-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



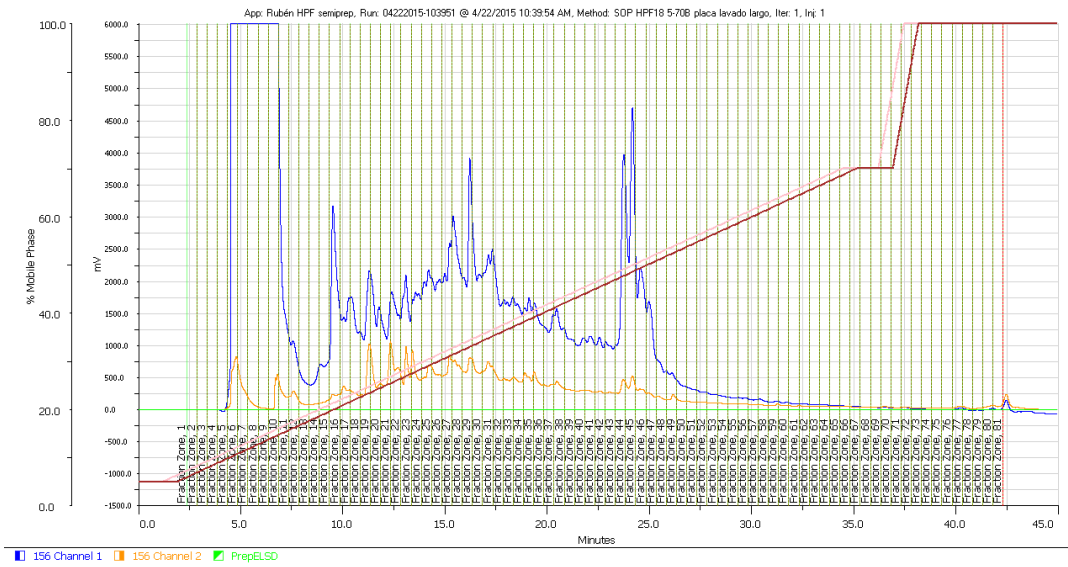
11. CA-179454-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



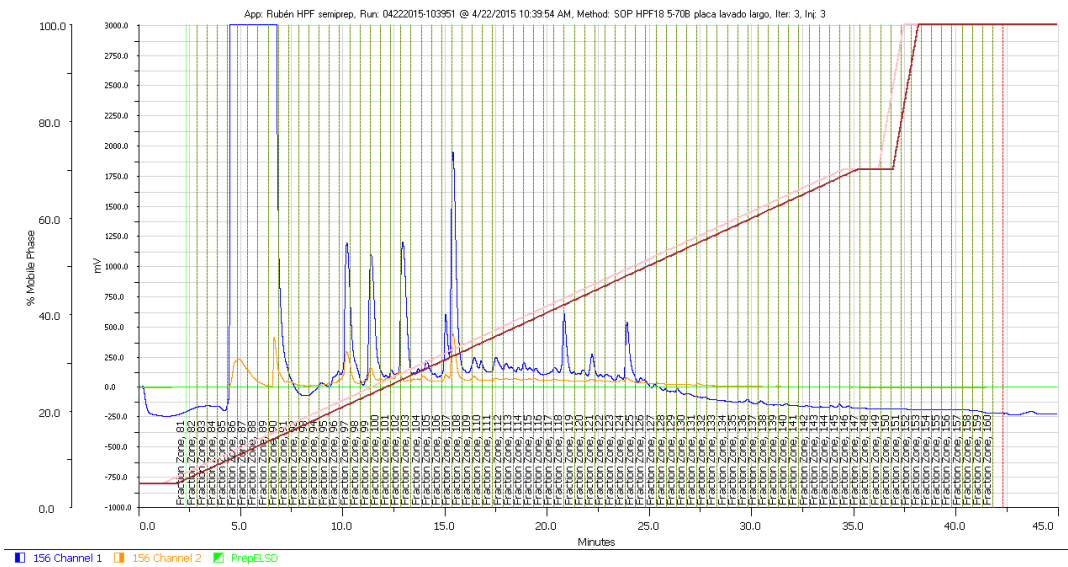
12. CA-182202-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



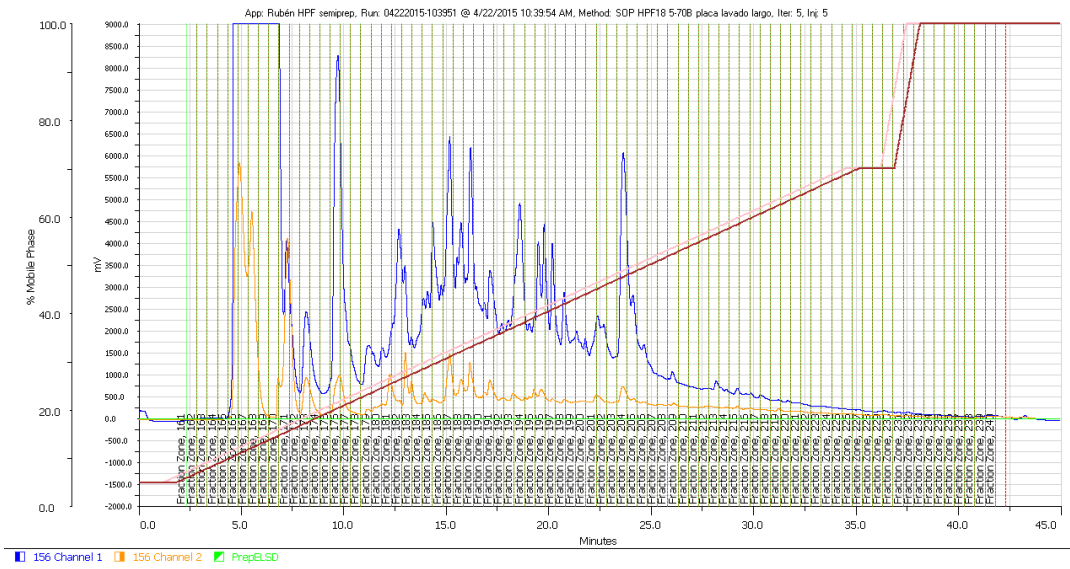
13. CA-142982-MO013-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



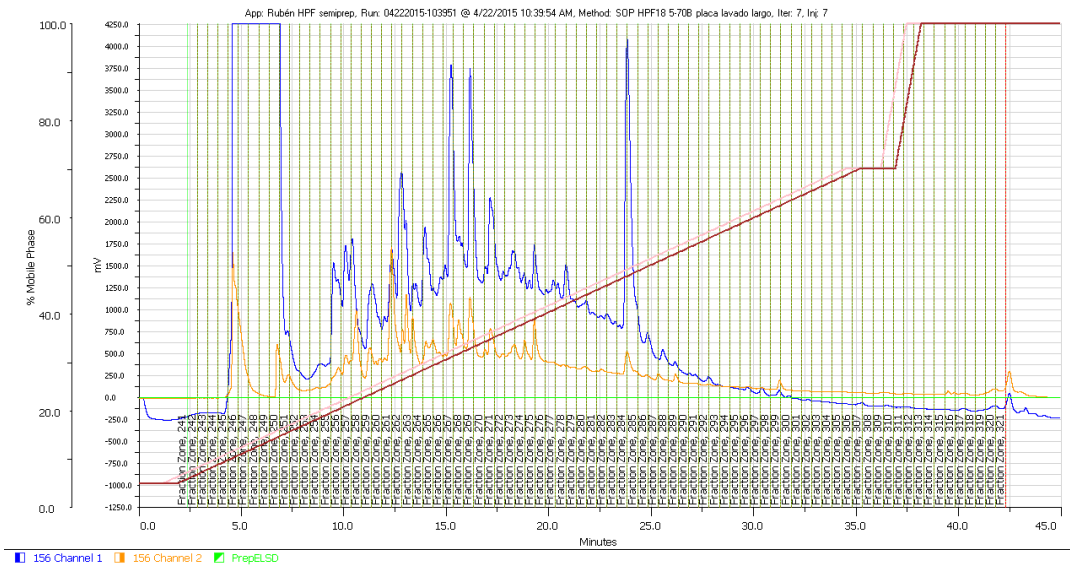
14. CA-143677-MO008-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



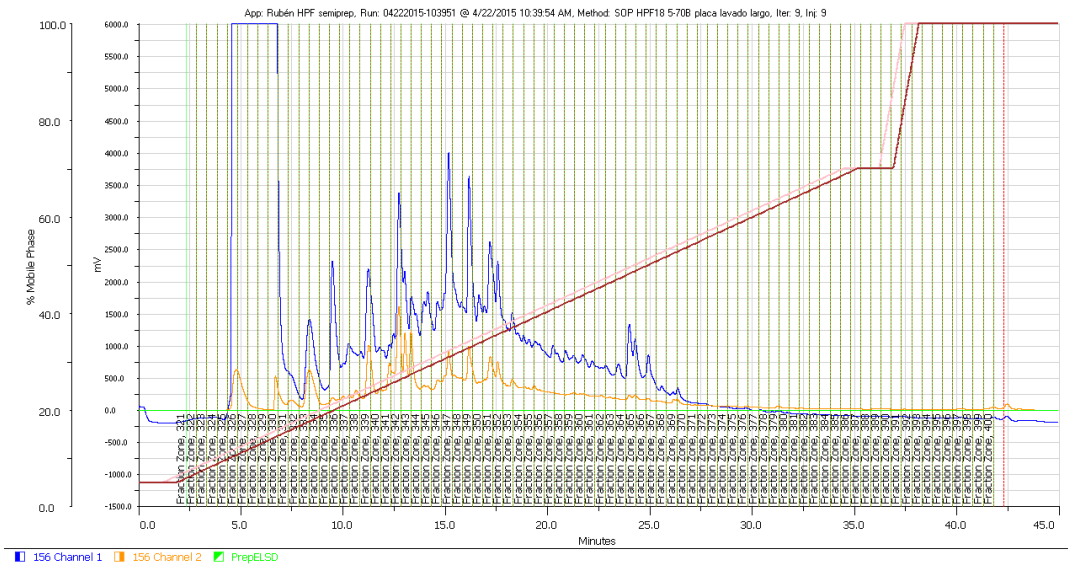
15. CA-162175-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



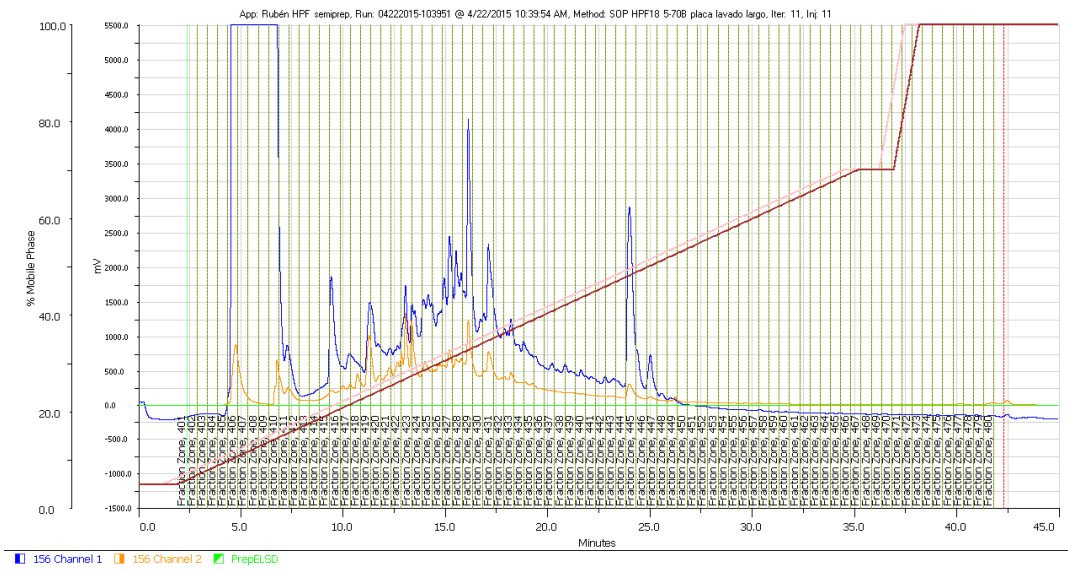
16. CA-178528-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



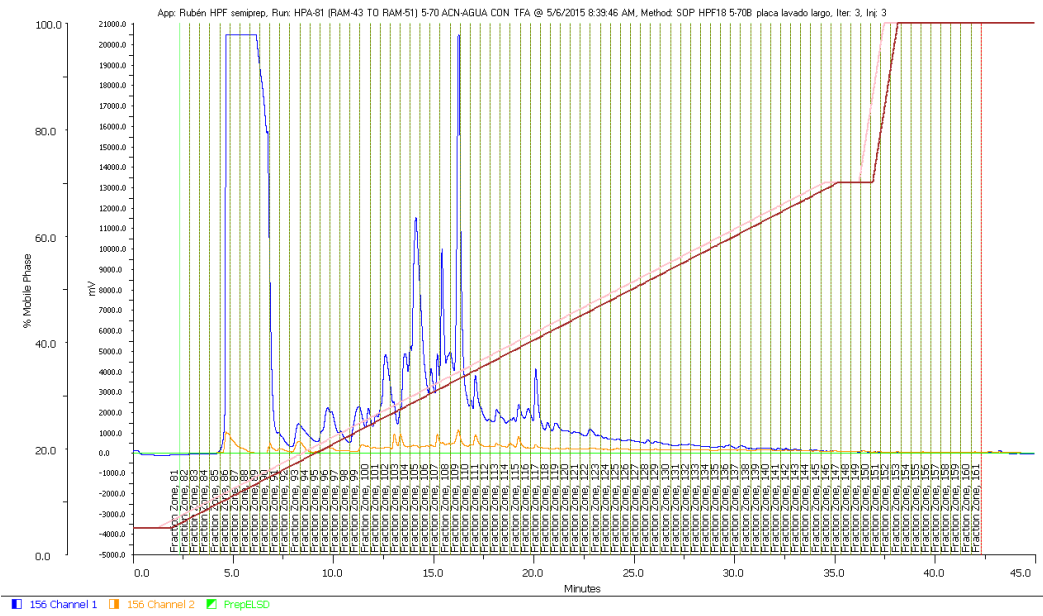
17. CA-179400-MO010-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



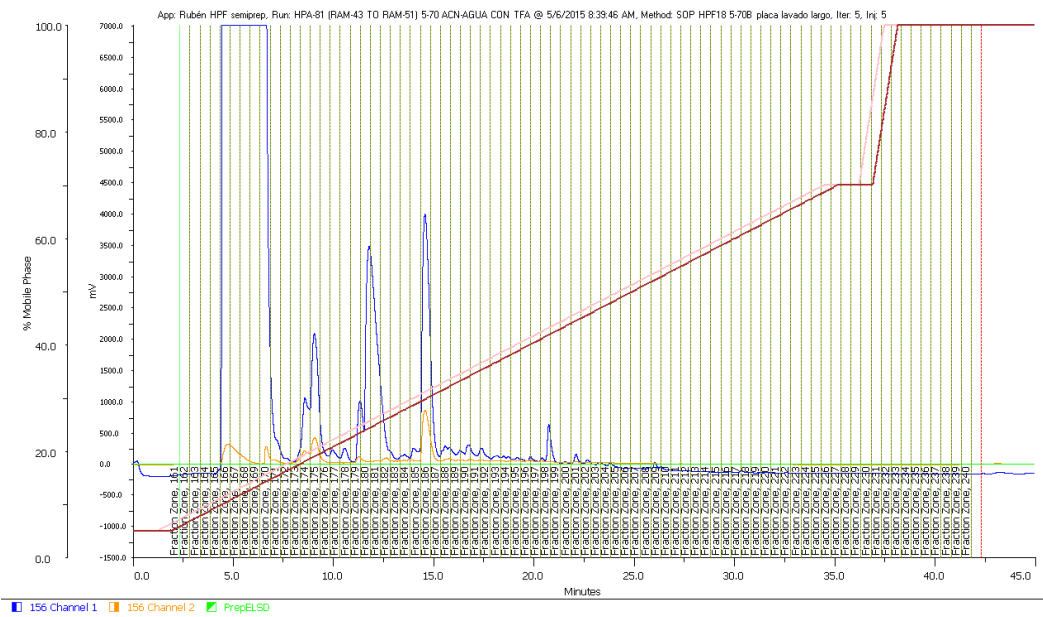
18. CA-179413-MO031-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



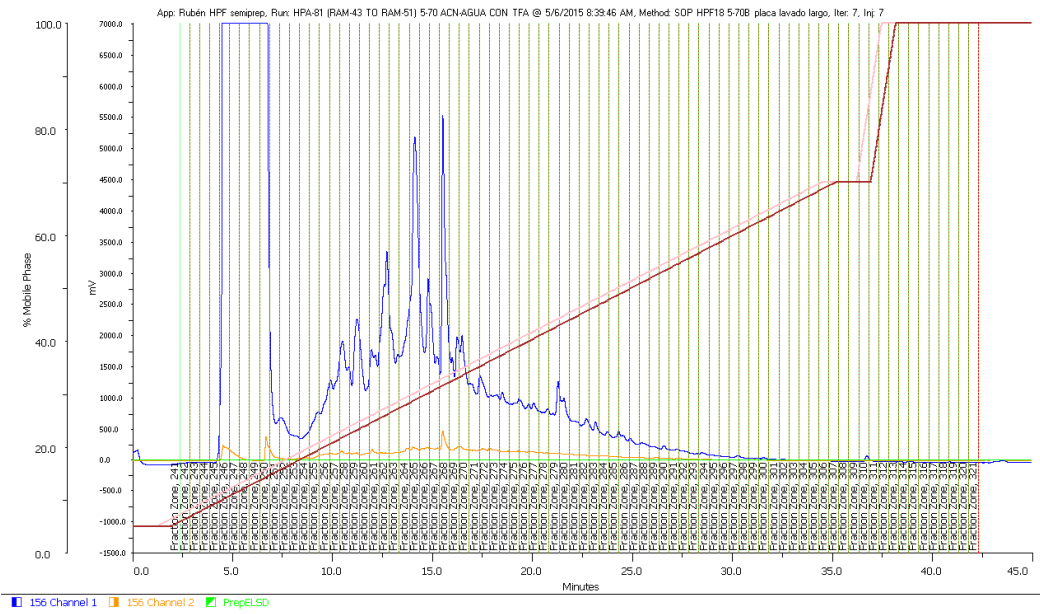
19. CA-149663-MO040-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



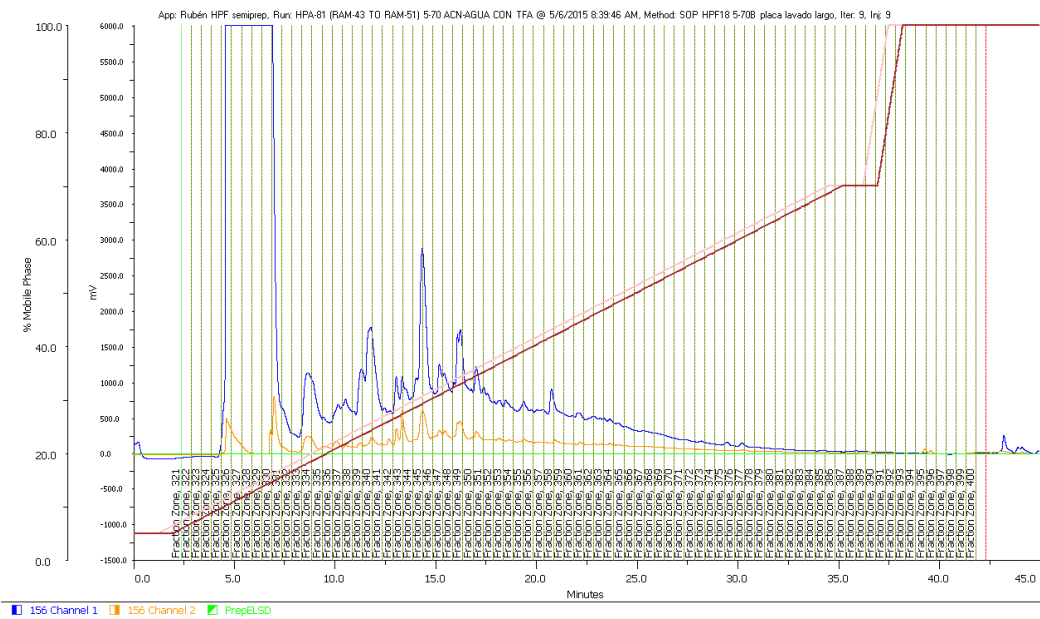
20. CA-151217-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



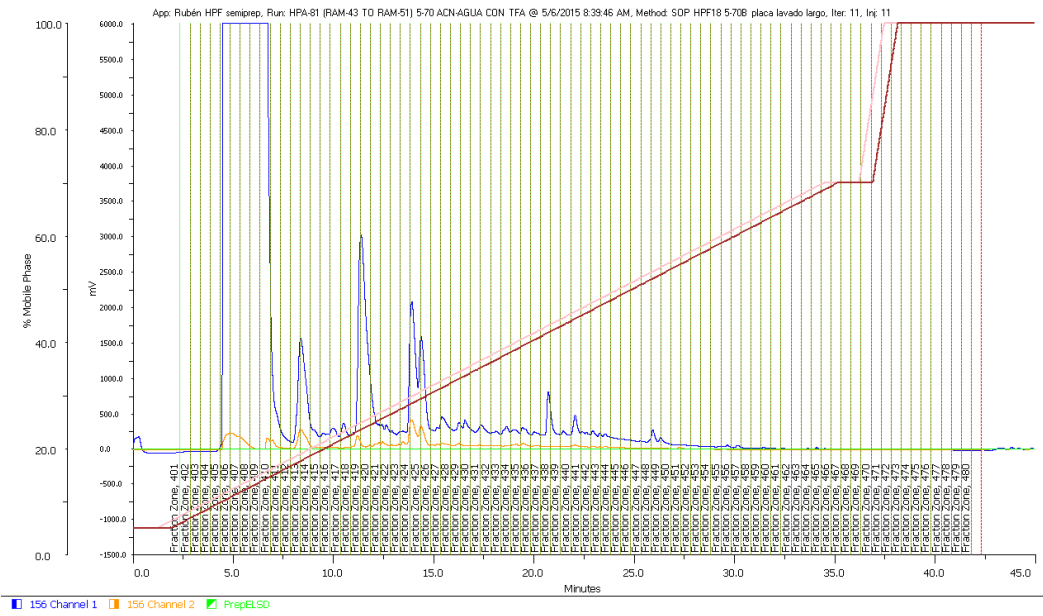
21. CA-152578-MO013-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



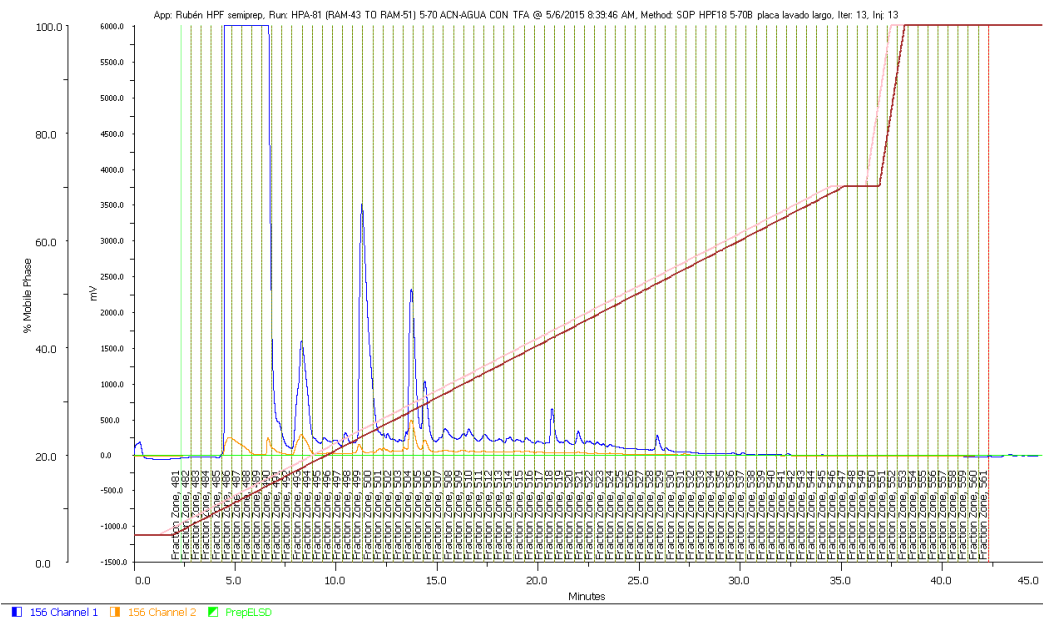
22. CA-161197-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



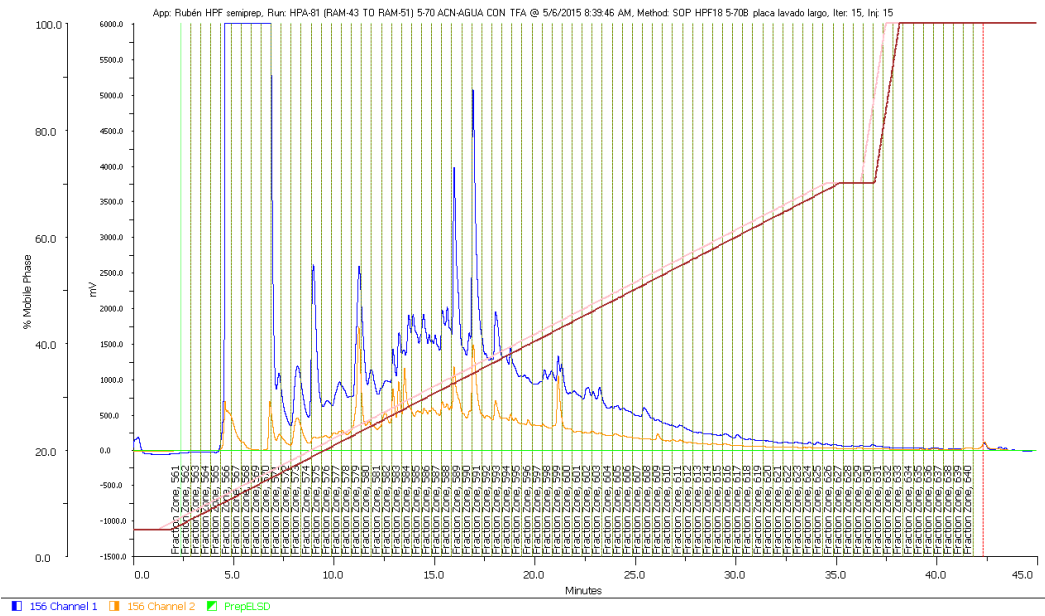
23. CA-169254-MO010-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



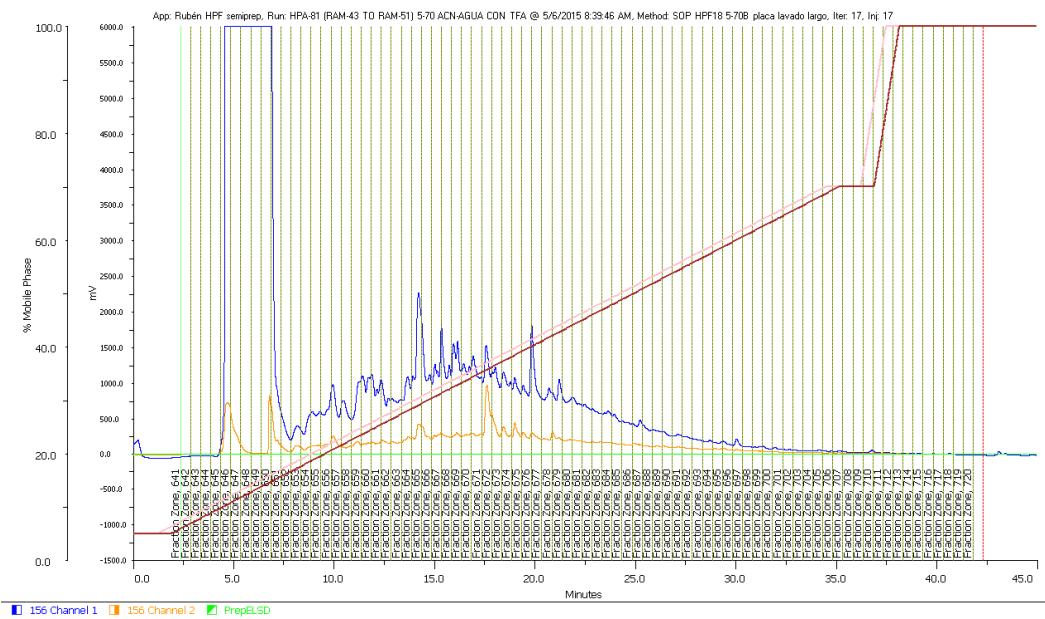
24. CA-170297-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



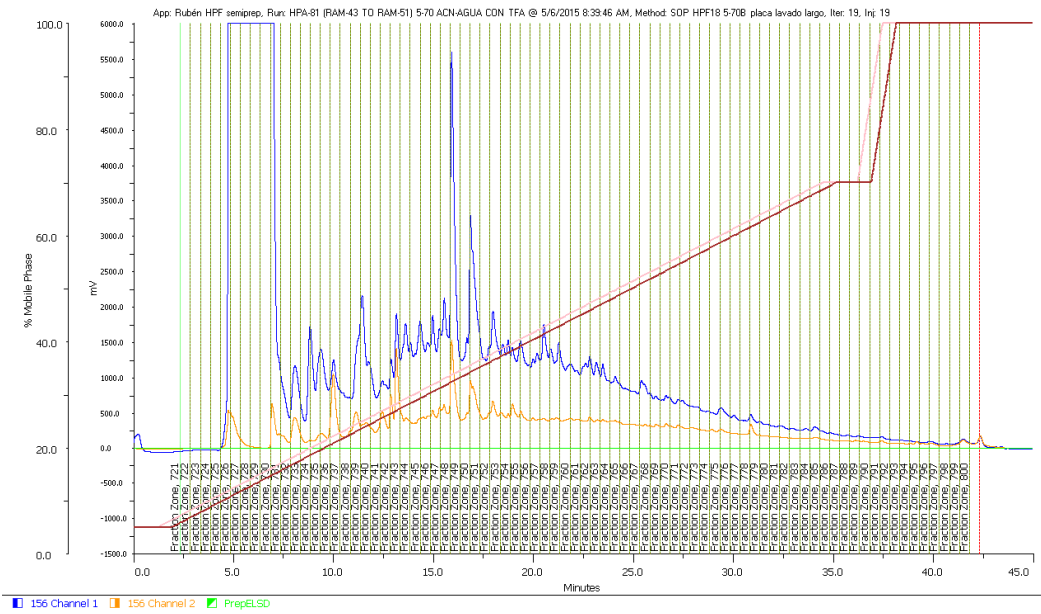
25. CA-175917-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



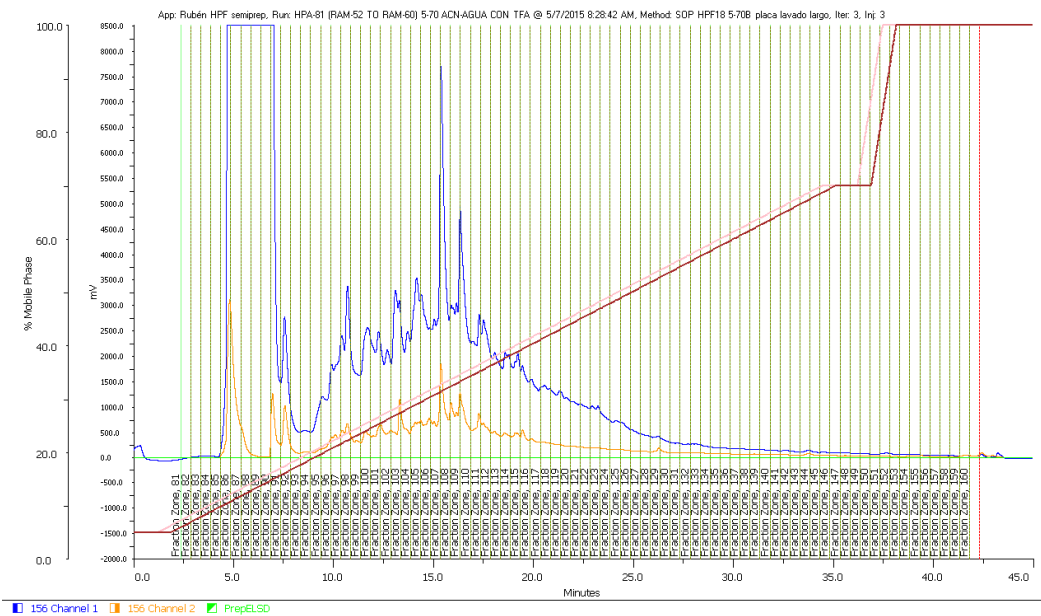
26. CA-177487-MO022-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



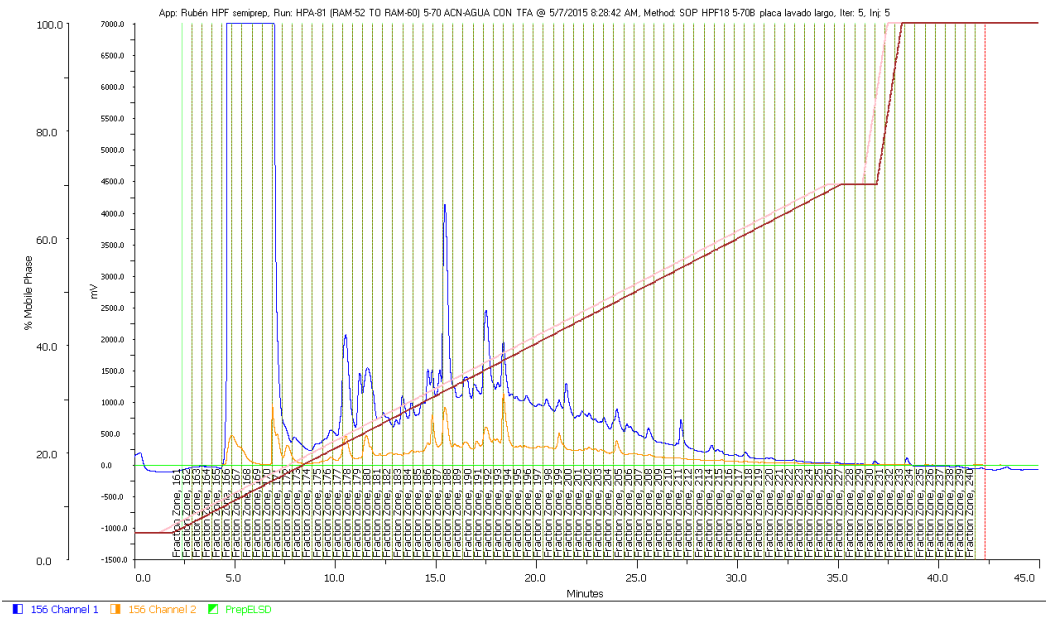
27. CA-177770-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



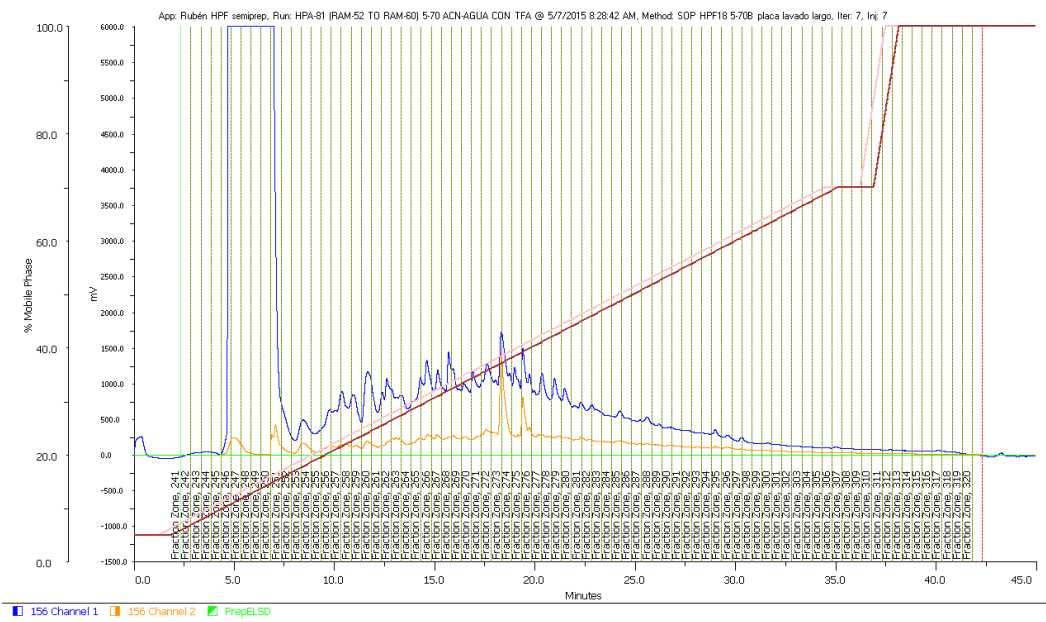
28. CA-178247-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



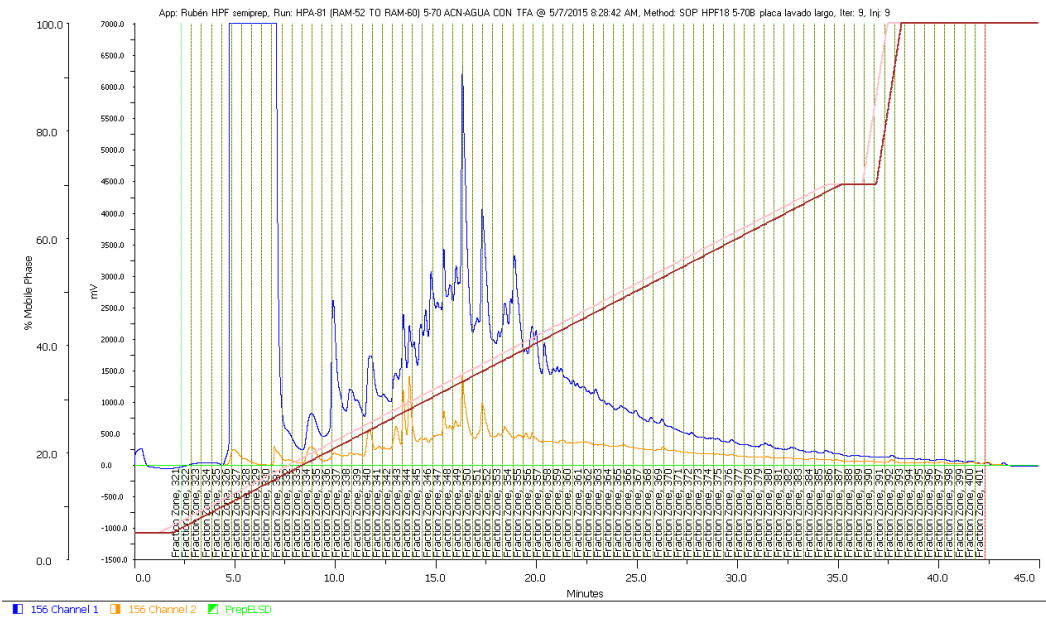
29. CA-178253-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



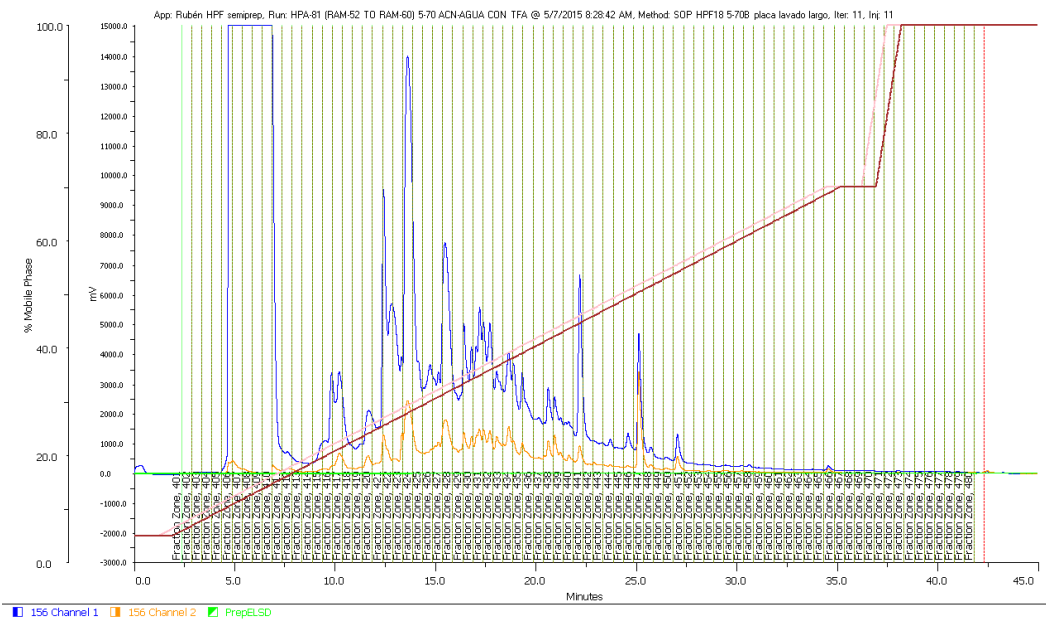
30. CA-178645-MO010-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



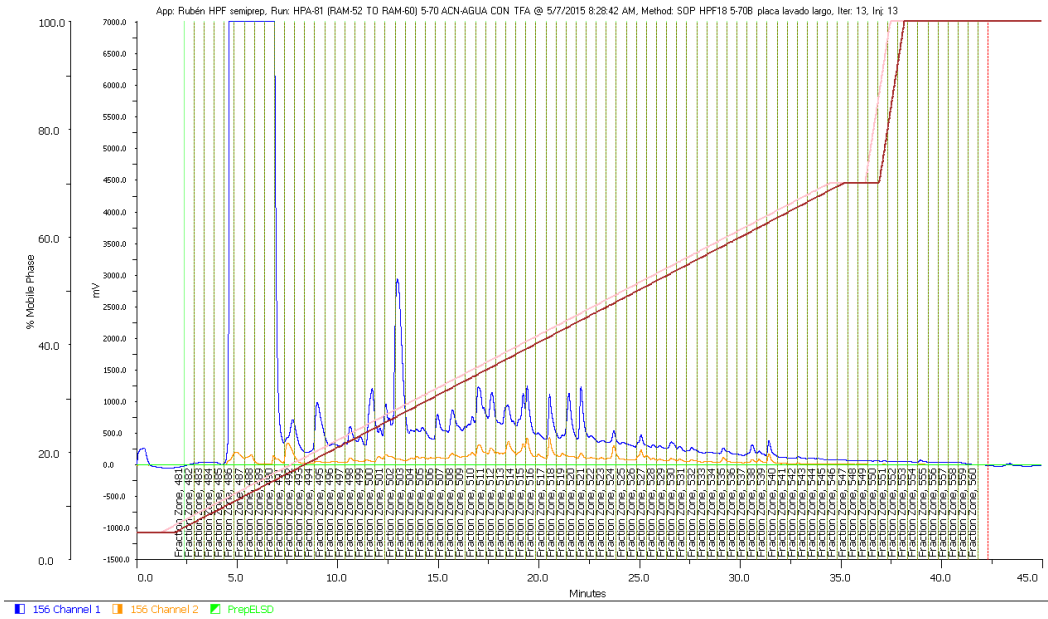
31. CA-178645-MO011-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



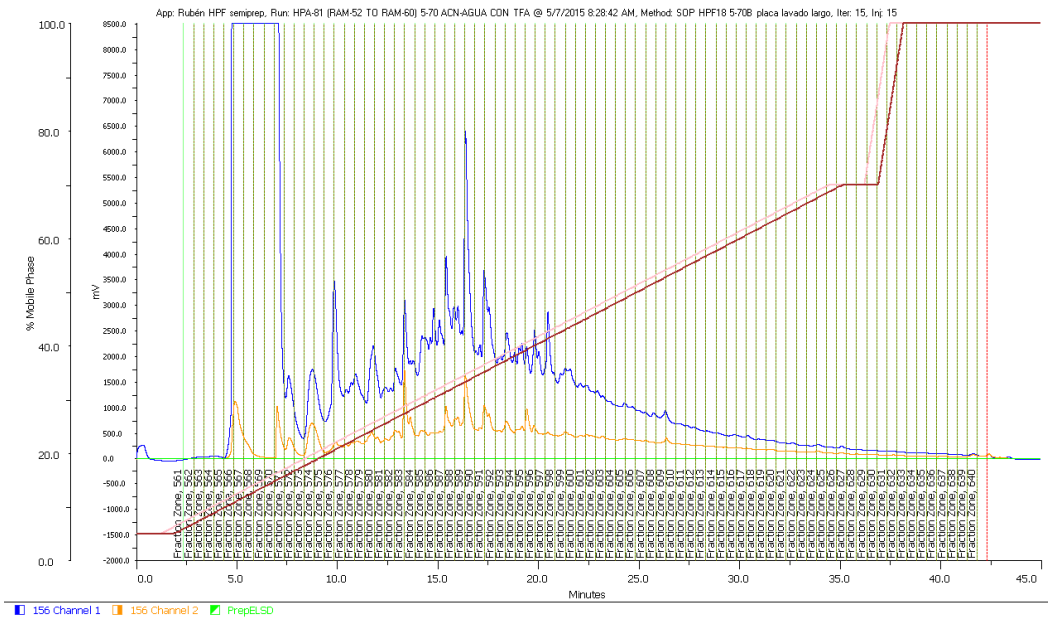
32. CA-179434-MO016-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



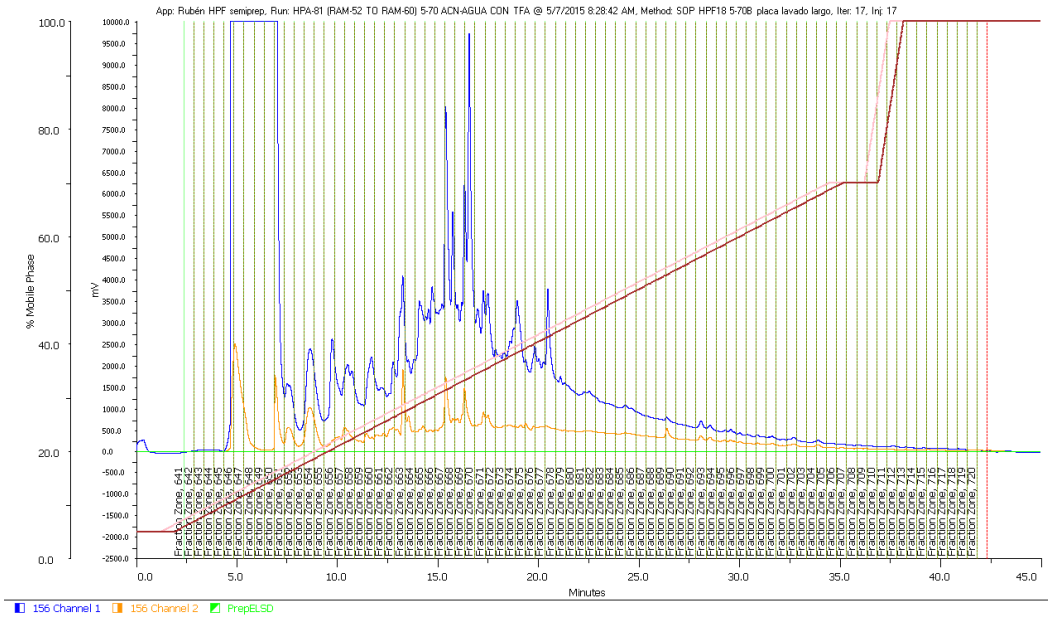
33. CA-179434-MO017-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



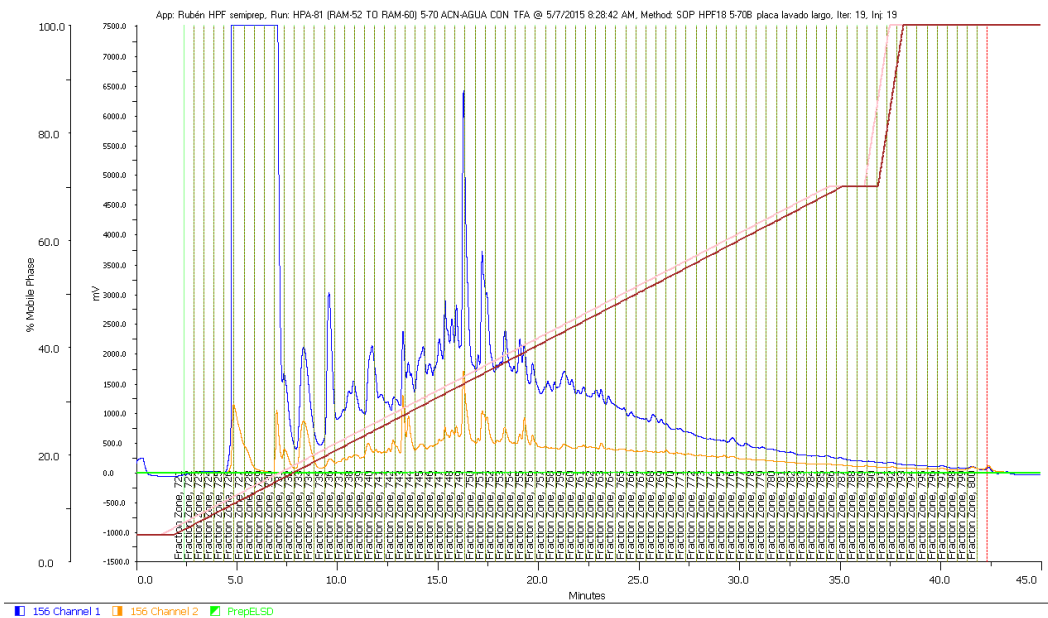
34. CA-182239-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



35. CA-188417-MO008-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



36. CA-188442-MO007-EB04 (550ul 5-70% ACN/AGUA CON TFA)



Anexo 3: Curvas dosis-respuesta (CDR) de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572, vancomicina, tunicamicina y eritromicina con y sin BSA frente a diferentes patógenos.

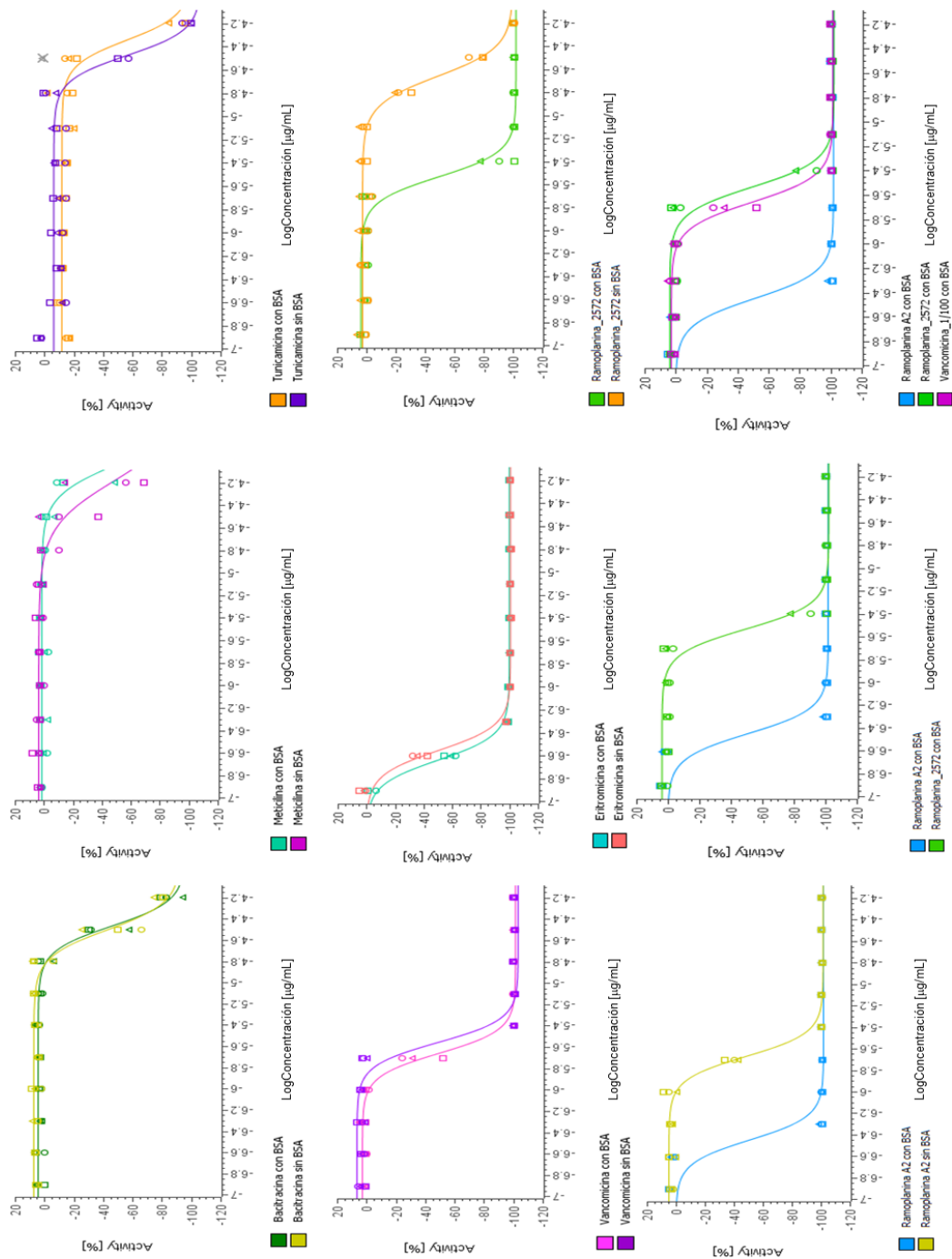


Figura 81. CDR de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572, vancomicina, tunicamicina y eritromicina con y sin BSA frente a SARM.

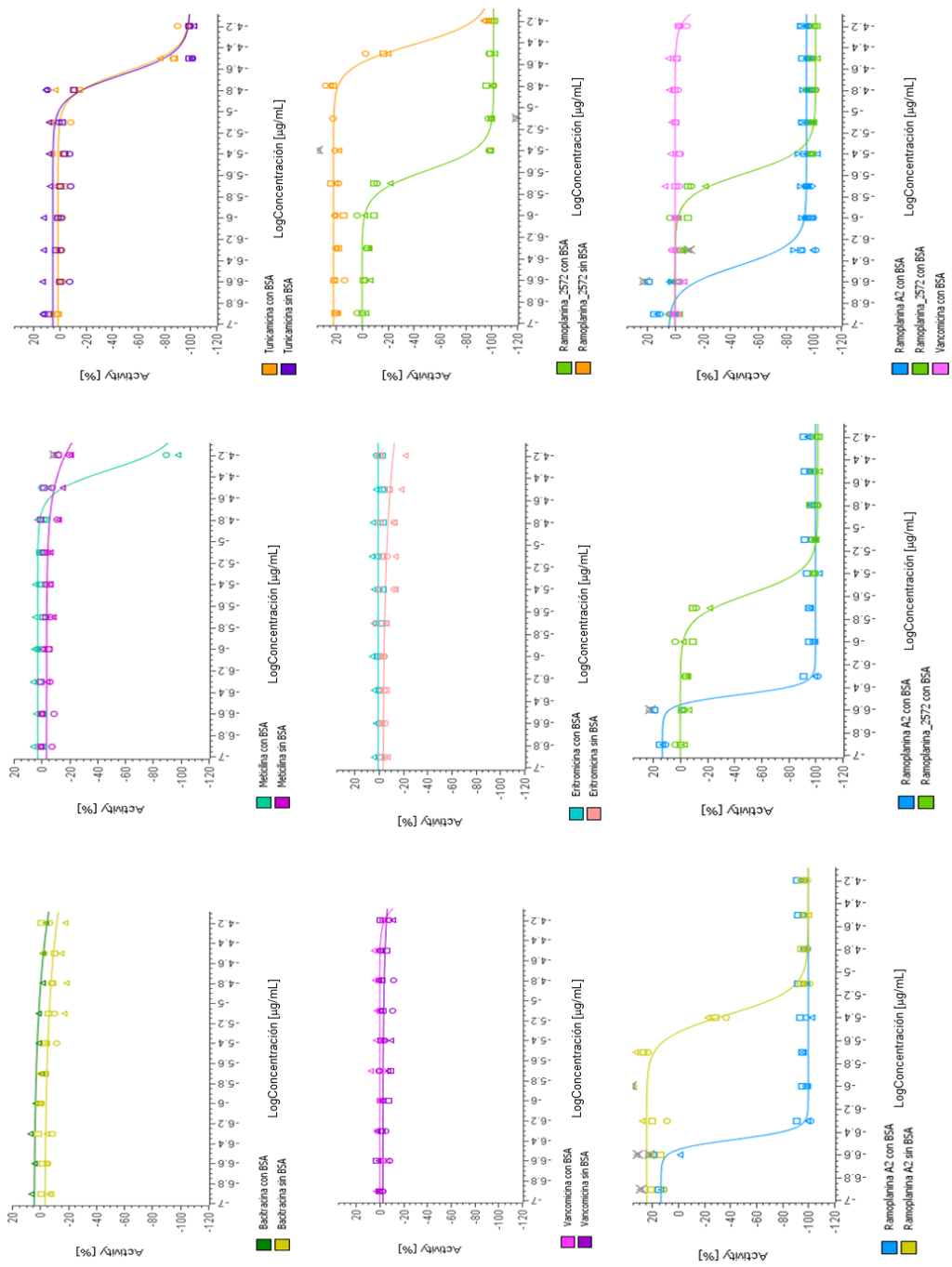


Figura 82. CDR de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572, vancomicina, tunicamicina y eritromicina con y sin BSA frente a *E. faecalis*.

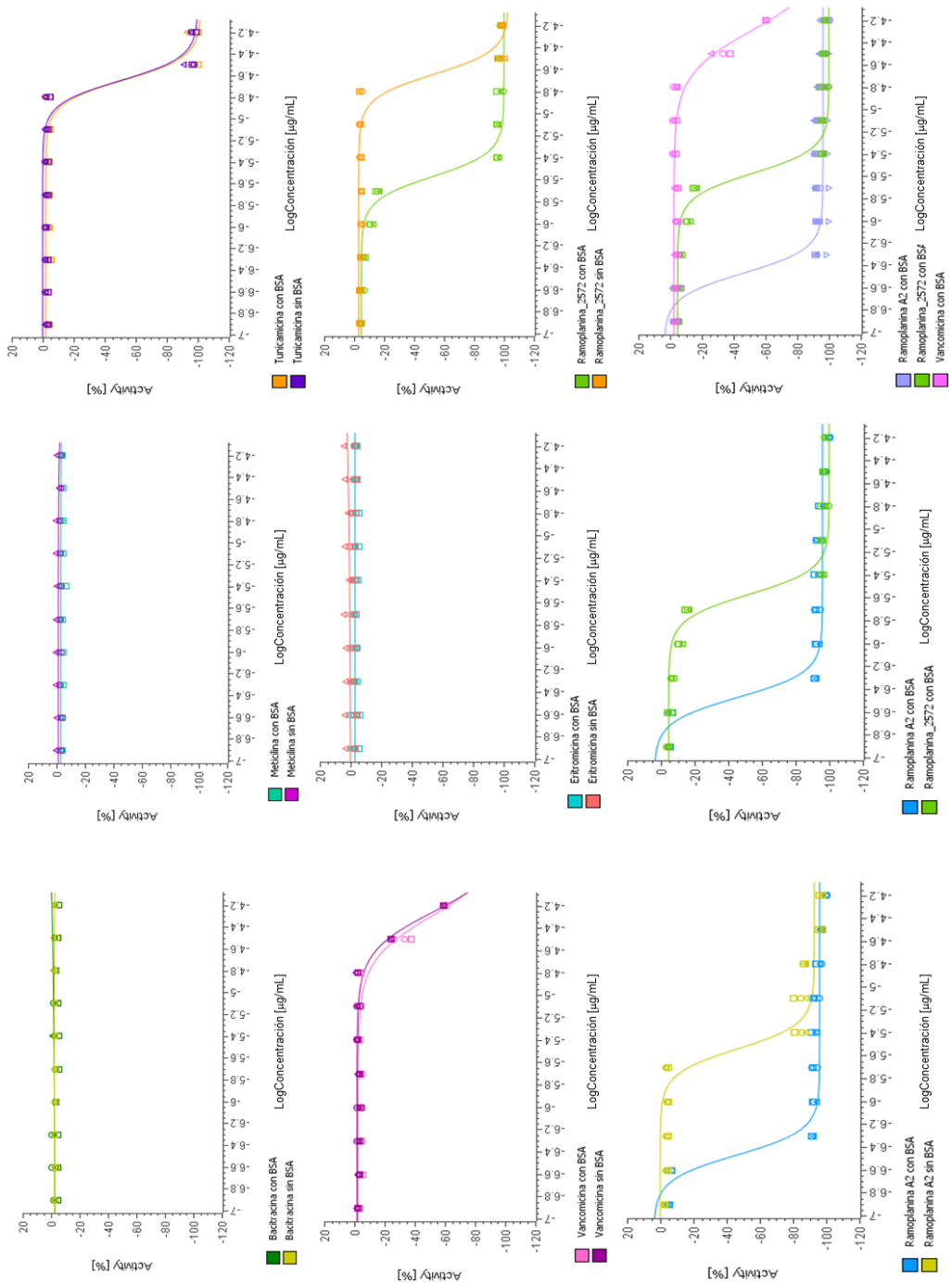


Figura 83. CDR de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572, vancomicina, tunicamicina y eritromicina con y sin BSA frente a *E faecium* sensible a vancomicina.

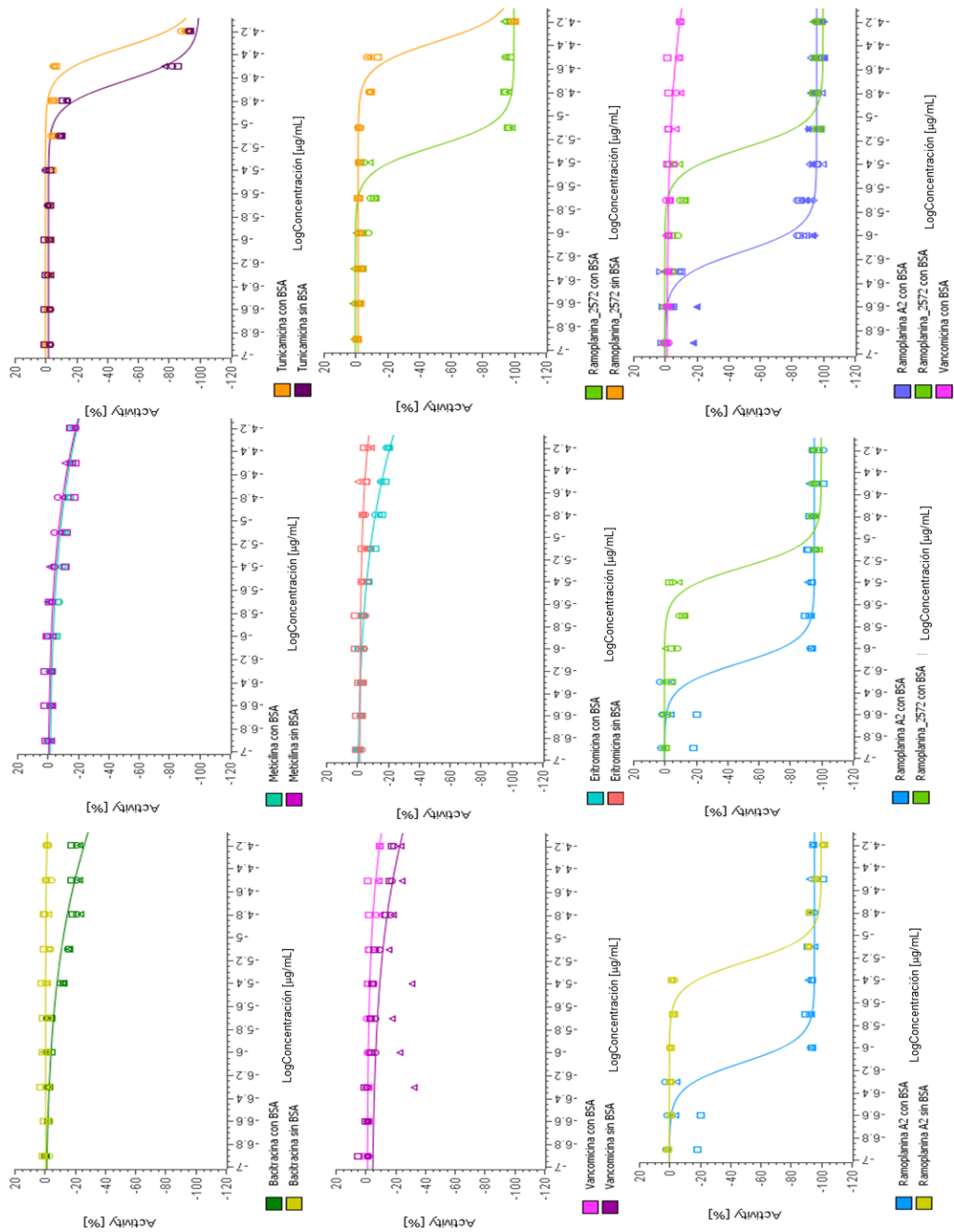


Figura 84. CDR de la ramoplanina A2, ramoplanina_2572, vancomicina, tunicamicina y eritromicina con y sin BSA frente a *E faecium* resistente a vancomicina.

10 ARTÍCULO

