

Recibido: 23 de junio de 2015. Aceptado: 13 de julio de 2015

Diseño de péptidos basado en la secuencia análoga al represor negativo *icaR* de *Staphylococcus* sp.

Resumen

La biopelícula como un mecanismo de virulencia en *Staphylococcus* involucrada en infecciones intrahospitalarias es regulada por un represor negativo *icaR*, responsable de la transcripción completa del operón *icaADBC*. La búsqueda de dominios funcionales por modulación computacional de *icaR* permitió hallar las secuencias peptídicas con actividad biológica análoga a la proteína *icaR*. Mediante biología computacional se diseñaron péptidos empleando el programa de predicción AntiBP (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/>); la síntesis química se hizo por N^α-Fmoc y se caracterizaron y purificaron tres moléculas por RP-HPLC y MALDI-TOF. Se evaluó su seguridad biológica mediante ensayo de actividad citotóxica realizada sobre macrófagos murinos de la línea J774 y la actividad hemolítica se determinó mediante el uso de glóbulos rojos. Los tres péptidos caracterizados IR1, IR2 e IR3, presentaron estructura secundaria predominantemente alfa helicoidal, alto grado de pureza y alto score antimicrobiano; además, mostraron baja toxicidad, evidenciada por la actividad citotóxica y hemolítica en las concentraciones ensayadas y en comparación con los controles usados, que permitiría su potencial uso como moléculas candidatas o principios activos con actividad análoga al represor nativo *icaR*, frente a la biopelícula de los *Staphylococcus* sp.

Palabras clave: péptidos catiónicos antimicrobianos, operón, biología computacional, síntesis química, citotoxicidad (DeCS).

Design of peptides based on similar sequence of negative repressor *icaR* of *Staphylococcus* sp.

Abstract

Staphylococcus sp. biofilm, formed as a mechanism of virulence that is involved in hospital acquired infections, is regulated by a negative repressor *icaR*, which is responsible for the full transcription of the operon *icaADBC*. This study, through functional commands by computational modulation of *icaR*, allowed to find peptide sequences with similar biological activity to the *icaR* protein. Peptides were designed by means of computational biology using the prediction program AntiBP (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/>). The chemical synthesis of peptides was performed by N^α-Fmoc. The purification and characterization of three molecules were carried out using RP-HPLC and MALDI-TOF. Biological safety of peptides was evaluated by tests of cytotoxic activity on murine macrophage cells line J774, and their hemolytic activity was determined by using red cells. The three characterized peptides IR1, IR2 and IR3 presented a predominantly secondary alpha helical structure with a high degree of purity and high antimicrobial scores. In addition, the peptides exhibited low toxicity, proved by their low cytotoxic and hemolytic activity in the tested concentrations and in comparison to the standards used. These results allow the potential use of these peptides as candidate molecules or active principles with similar activity to the native repressor *icaR* against the *Staphylococcus* biofilm.

Key words: Antimicrobial cationic peptides, operon, computational biology, chemical synthesis, cytotoxicity (DeCS).

Desenho de peptídeos com base na sequência similar ao represor negativo *icaR* dos *Staphylococcus* sp.

Resumo

O biofilme formado como um mecanismo de virulência em *Staphylococcus* sp., que está envolvido com infecções intra-hospitalares, é regulado por um represor negativo *icaR*, o qual é responsável pela plena transcrição do operão *icaADBC*. Por tanto, o presente estudo, avaliando a segurança biológica de moléculas, concebeu peptídeos antibiofilme semelhantes ao represor *icaR*. Por meio da biologia computacional foram concebidos peptídeos usando o programa de predição AntiBP (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/>) para identificar as sequências com uma atividade biologicamente similar à da proteína *icaR*. A Síntese química dos peptídeos se fez pelo N^α-Fmoc e foram caracterizadas e purificadas três moléculas por RP-HPLC e MALDI-TOF. O ensaio de atividade citotóxica foi realizado nos macrófagos murinos da linha J774 e a atividade hemolítica foi determinada por meio do uso de glóbulos vermelhos. Foram caracterizados três peptídeos IR1, IR2 e IR3, além de mostrarem uma estrutura secundaria predominantemente alfa helicoidal, com alto grau de pureza, alto score antimicrobiano e baixa toxicidade, estes podem ser postulados como moléculas candidatas ou princípios ativos com uma atividade similar ao represor nativo *icaR* frente ao biofilme dos *Staphylococcus* sp.

Palavras chave: peptídeos catiónicos antimicrobianos, operão, biologia computacional, síntese química, citotoxicidade (DeCS).

Introducción

La biopelícula como mecanismo de persistencia y resistencia bacteriana hace menos efectiva la actividad de los antibióticos debido a su penetración lenta e incompleta en las bacterias formadoras de biopelícula. Del mismo modo, se ha reportado que estas pueden resistir concentraciones de antibióticos 1000 veces mayores, que las mismas bacterias en estado plañtónico (1).

Microorganismos que tienen capacidad de formar biopelícula, como los *Staphylococcus* sp., producen un polisacárido intercelular adhesina (PIA), el cual media la agregación celular bacteriana y favorece la colonización. La síntesis de PIA y la variación fenotípica están reguladas por diversos factores y componentes genéticos que influyen en la comunicación intercelular bacteriana, en la cual intervienen operones, genes reguladores globales, elementos de inserción, entre otros (2,3).

La síntesis de biopelícula mediada por el operón *icaADBC* incluye: la enzima *N*-acetilglucosaminiltransferasa, que se encuentra anclada a la membrana y es codificada por *icaA*, que a su vez sintetiza PIA a partir de UDP-*N*-acetilglucosamina; el producto de *icaD* que optimiza la eficiencia de *icaA*; el producto de *icaC* que se relaciona con la externalización de PIA; y finalmente, el gen *icaB* que codifica una *N*-deacetilasa responsable de la deacetilación parcial de PIA. La expresión del operón es afectada por condiciones ambientales (4-6) y es regulada principalmente por el represor negativo *icaR* (7,8). Este represor pertenece a la familia de proteínas represoras de tetraciclina (TetR) que actúan como sensores químicos citosólicos y responden a señales ambientales específicas (9). *IcaR* es un homo dímero predominantemente alfa helicoidal, en el cual las alfa hélices dos y tres conforman su dominio *N*-terminal y corresponde a un dominio de unión a ADN, con estructura hélice-giro-hélice (HTH) (10).

A partir de la correlación entre el mecanismo de acción actualmente conocido de *icaR* (10,11) y de los péptidos antimicrobianos PAMs, se plantea que los péptidos sintetizados en este estudio podrían causar un efecto inhibitorio de la biopelícula de *Staphylococcus*, anclándose específicamente al codón de inicio del operón *icaADBC*, impidiendo su transcripción y/o uniéndose a moléculas internas utilizadas para su metabolismo y autoregulación (7,9). Adicionalmente, podrían tener efecto antimicrobiano al unirse a las membranas bacterianas por acción electrostática. El objetivo de este estudio fue diseñar péptidos análogos al represor *icaR*, evaluando la seguridad biológica de los mismos, para que posteriormente sean probados en su potencial efecto o principio activo antibiopelícula.

Materiales y métodos

Diseño de los péptidos

Las imágenes moleculares de la proteína *icaR* fueron producidas usando el programa UCSF Chimera (Universidad de California, San Francisco supported by NIH P41 RR-01081) (12) y la búsqueda de dominios funcionales en la proteína empleando la herramienta SMART (13).

A partir de la secuencia original reportada para *icaR* (13,14) se diseñó el péptido IR1, utilizando el servidor web *Antibp Server* (14). También se realizaron modificaciones a la secuencia original del péptido IR1 y se recalcularon los parámetros del péptido para incrementar el score antimicrobiano de los nuevos péptidos IR2 e IR3, utilizando The Antimicrobial Peptide Database (APD) (15). Con el fin de mejorar la exactitud de las predicciones de la estructura secundaria se utilizó GOR, Fragment Database Mining (FDM) GOR V (15,16), PSIPRED (17) y se utilizó el programa *Helical Weell* para mostrar su conformación anfipática (18).

Síntesis, purificación y caracterización de péptidos

Los péptidos IR1, IR2 e IR3 fueron sintetizados por Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) en fase sólida, usando resina Rink-amida, descrita previamente por Merrifield y modificada por Houghten Sarin (19). Los péptidos crudos se identificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (CLAE-FR) (L7400 La Chrom Merck Hitachi); se usó una columna analítica RP18, marca Waters, (5 µm; 25 cm de largo y 0,46 cm de diámetro) y acetonitrilo, agua, metanol y ácido trifluoroacético como solventes grado HPLC; se aplicaron 20 µL de la muestra (2 mg/mL), se eluye con el empleo de un sistema de gradiente A/B de 0 a 70% B (A: Agua desionizada, B: acetonitrilo) en 30 minutos, con flujo de solvente utilizado de 1.0 mL/min y una temperatura de 21°C. La pureza de los péptidos sintetizados fue confirmada por espectrometría de masas (Autoflex Bruker Daltonics Maldi-Tof) y se analizaron en un espectropolarímetro de dicroísmo circular para determinar su estructura secundaria preferencial.

Actividad hemolítica

La determinación de la actividad hemolítica se realizó por duplicado con glóbulos rojos (GR) grupo O Rh positivo con 8 diluciones seriadas a partir de una solución de 50000 µg/mL de cada péptido. Como controles negativos se incluyó insulina (péptido no hemolítico) y GR en solución salina fisiológica; como control positivo GR en agua destilada. Los datos exportados a Excel se analizaron con el programa Graph Pad Prism 5.0 Trial Version. Se determinó la concentración hemolítica media (CH₅₀), la cual corresponde a la concentración del péptido que ocasionó la hemólisis del 50% de los eritrocitos en suspensión (20).

Ensayo de citotoxicidad

Para establecer el efecto deletéreo de los péptidos se realizó un cultivo de macrófagos murinos de la línea J774, empleando células con viabi-



Figura 1. Representación esquemática en superficie de Conolly de un dímero de la proteína *icaR* que actúa como represor de la familia TetR. El dominio TetRN (rojo) muestra el sitio de unión al ADN.

lidad superior al 90%, las cuales fueron incubadas durante 24 h a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5%. Las células adheridas se incubaron 72 h con ocho concentraciones de cada péptido en RPMI 1640 a partir de 1200 µg/mL (por triplicado). La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de Alamar Blue con algunas modificaciones (20).

Resultados y discusión

Selección de la secuencia de *icaR* y síntesis de péptidos

La habilidad de producir biopelícula depende en gran parte de la presencia del operón *ica* como un posible marcador de cepas virulentas especialmente en *S. epidermidis*. El regulador *icaR* de la familia de represores transcripcionales TetR responde a señales en ambientes específicos y pueden afectar la expresión de genes como respuesta fisiológica (10,13).

Se identificó el dominio del represor de resistencia a Tetraciclina (TetR_N) basados en su similitud a nivel de secuencia con *icaR* en el extremo amino terminal entre los residuos cinco y 51 cuya secuencia corresponde a: IIDNAITLFSEKGYDGTTLDDISKSVNIKKASLYY-HYDNKEEIYRKS.

La predicción con ProteDNA (21) que utiliza un método entrenado con factores de transcripción, permitió reconocer siete residuos específicos implicados en la asociación con el ADN (Figura 1 en rojo), que están ubicados en el dominio HTH (con estructura hélice-giro-hélice) y que se encuentran formando predominantemente parte de alfa hélices. Adicionalmente, esta secuencia ha sido encontrada en varios reguladores transcripcionales de bacterias y arqueobacterias (10).

Por otra parte, el análisis de interacción de *icaR* (Figura 2), con otras proteínas en el servidor STRING, permitió verificar la interacción del represor con otros genes que conforman el operón *icaABDC* (22).

Se ha evidenciado una mutación en la región *intergénica icaR-icaA* de 5pb (TATTT) en *Staphylococcus* sp., capaz de inducir hiperproducción del polisacárido intercelular adhesina (PIA), clave en el proceso de agregación bacteriana a través de un estímulo en la transcripción de *icaABDC*, sin afectar la expresión ni la unión de *icaR*. Adicionalmente, se encontró que *icaR* se une por su motivo funcional a una región de 42 pb de ADN corriente arriba en sentido 5', ubicándose en la región inmediatamente anterior al codón de inicio de *icaA*, impidiendo que éste comience la transcripción en cadena del operón completo y por lo tanto inhibe la formación de biopelícula (23,24).

En este estudio, a partir de la secuencia nativa de la cadena A de *icaR*, desde el residuo 21 al 35 se sintetizó la secuencia molde (TLD-DISKSVNIKKAS) denominada IR1 y a partir de estas se sintetizaron otros dos péptidos modificados denominados IR2 (TLIDKLKSVGRK-KAK) e IR3 (TLIDKLKSVGRKKAK) para lograr el incremento de score antimicrobiano de 0,930 para IR1 a 3,057 para IR2 y 3,426 para IR3. Este proceso se logró a través de la sustitución de residuos con carga neutra por aminoácidos cargados positivamente como lisina o arginina, que aumenta de forma significativa las interacciones electrostáticas con los ácidos teicóicos de las bacterias Gram positivas. Específicamente, se cambió la Serina en el C-terminal de IR1 por Lisina tanto en IR2 como en IR3.

De igual manera, se buscó que la estructura de estos dos últimos fuera más helicoidal y anfipática, con el fin de obtener la carga neta positiva más alta. Lo anterior de acuerdo a lo descrito para péptidos antimicrobianos catiónicos, es decir, que aumentan o disminuyen su actividad por modificaciones en su secuencia tales como reducción, sustitución, duplicación e incorporación de compuestos acetilados, ya que estas modificaciones producen aumento en la interacción con las membranas bacterianas y por lo tanto aumento en la actividad antimicrobiana (25,26).

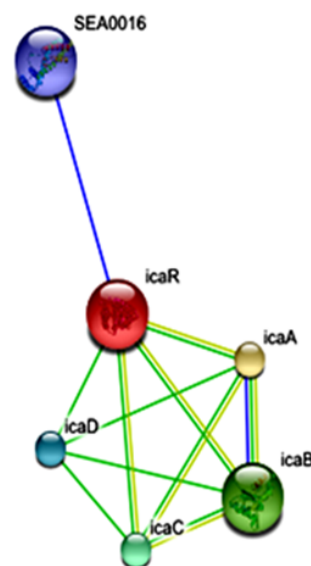


Figura 2. Modelo de interacción de *icaR* con las demás proteínas que conforman el operón completo *icaABDC-icaR*.

En cuanto a los resultados de la caracterización de los péptidos, la cromatografía muestra que los péptidos tienen una pureza mayor del 90%, confirmada por el análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF, donde los pesos moleculares para IR1, IR2 e IR3 (1618,85; 1685,09; 1637,03 u.m.a. respectivamente) concuerdan con la masa teórica determinada.

Actividad hemolítica y citotóxica de los péptidos

Para que los PAMs tengan aplicaciones farmacológicas se requiere que posean actividad antimicrobiana pero que no muestren actividad citotóxica contra las células normales del huésped. Los péptidos IR1, IR2 e IR3 mostraron una actividad hemolítica CH₅₀ de 6,4%, 6,3% y 1,8% y concentraciones letales 50 (CL₅₀) mayor a 1200 µg/mL, 1111 µg/mL y 1017 µg/mL respectivamente. Como control positivo se usó gentamicina a la concentración inhibitoria bacteriana en la práctica clínica.

El mejor resultado de los péptidos analizados es atribuido a IR3, el cual obtuvo una CH₅₀ similar al control negativo (Insulina, péptido reconocido por ser no hemolítico); IR2 e IR3 presentaron hemólisis superior al control negativo, pero a concentraciones muy altas de péptidos (por encima de 500 µg/mL), que no se usarían en la terapéutica *in vivo*. En ensayos preliminares del uso de los péptidos en mención (datos no mostrados), se obtuvo actividad antimicrobiana a concentraciones de 50 µg/mL y actividad anti biopelícula a 30 µg/mL.

La actividad hemolítica de algunos péptidos, restringe su utilidad para administraciones terapéuticas y requiere de optimización en los diseños de estos, con el objetivo de minimizar dicho impacto (20). En cuanto al ensayo de citotoxicidad, para los péptidos IR2 e IR3 se encontró una CL₅₀ dentro del rango de concentraciones evaluadas y para IR1 la CL₅₀ es superior a la concentración máxima utilizada, resultados concordantes con estudios previos (14,20).

Conclusiones

Se diseñaron péptidos antimicrobianos a partir de la secuencia nativa de *icaR*, secuencia encontrada en reguladores transcripcionales de bacterias y que podrían inhibir la formación de biopelícula por su unión a la

región anterior al codón de inicio de *icaA*, impidiendo la transcripción del operón completo *icaADBC* o parte de este. De igual manera, tendrían un efecto antimicrobiano por su carácter catiónico y anfipático, que permitiría la unión a los ácidos teicóicos de bacterias Gram positivas, como los *Staphylococcus*.

El análisis bionfórmico de la superficie de *icaR* mostró un potencial electrostático de gran parte de los residuos expuestos al ambiente extracelular del dominio TetRN, que probablemente contribuye a estabilizar la unión con el respectivo sustrato. Por lo tanto, la posible actividad antibiopelícula de los péptidos diseñados en este estudio, dependerá de la secuencia, así como de los epitopes análogos a *icaR*, tamaño, estructura, anfipaticidad catiónica y el grado helicoidal que incrementa la estabilidad y la unión a la membrana de la bacteria.

Los péptidos evaluados muestran en general una baja toxicidad, siendo el péptido IR3 el más seguro, evidenciado por el ensayo de hemólisis, que demostró poca capacidad de los péptidos para lisar glóbulos rojos, lo que significa que no causaría una respuesta significativa de tipo inmune; asimismo, en el ensayo de citotoxicidad, los péptidos presentan una CL_{50} por encima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, facilitando su uso inocuo, siendo menos tóxicos que la gentamicina, aminoglucósido de referencia para el control bacteriano.

Teniendo en cuenta la secuencia, el score antimicrobiano de los péptidos obtenidos, y el bajo grado de toxicidad, éstos podrían ser postulados como moléculas candidatas en el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos y/o antibiopelícula, por su posible actividad análoga a la regulación negativa del represor nativo *icaR*, responsable de la formación de biopelícula en *Staphylococcus* sp.

Agradecimientos

Este proyecto está siendo financiado por COLCIENCIAS Convocatoria 657-2014 Código COL0041221. Contrato RC651-2014 y por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Agradecemos a la Dra. Gabriela Delgado y al Dr. José Julián Pérez-Cordero del Grupo de Investigación de Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. Fitzpatrick, F.; Humphreys, H.; O'Gara, J. The genetics of *Staphylococcal* biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?. *Clin. Microbiol. Infect.* **2005**, *11*, 967-973. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01274.x>.
2. Donlan, R.; Costerton, J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167-193. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
3. Monds, R.; O'Toole, G. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **2008**, *17*, 73-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
4. Arciola, C.; Campoccia, D.; Ravaioli, S.; Montanaro, I. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5*, 7. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>
5. McCann, M.; Gilmore, B.; Gorman, S. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 1551-1571. DOI: <http://dx.doi.org/10.1211/jpp.60.12.0001>
6. Vuong, C.; Voyich, J.; Fischer, E.; Braughton, K.; Whitney, A.; DeLeo, F.; Otto, M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 269-275. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x>
7. Cue, D.; Mei, G.; Chia, Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *Staphylococci*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 1-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00038>
8. Heilmann, C.; Schweitzer, O.; Gerke, C.; Vanittanakom, N.; Mack, D. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20*, 1083-1091. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x>
9. Xu, L.; Li, H.; Vuong, C.; Vadyvaloo, V.; Wang, J.; Yao, Y.; Otto, M.; Gao, Q. Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immunol.* **2006**, *74*, 488-496. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.74.1.488-496.2006>
10. Routh, M.; Su, C.; Zhang, Q.; Yu, E. Structures of AcrR and CmeR: insight into the mechanisms of transcriptional repression and multi-drug recognition in the TetR family of regulators. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1794*, 844-851. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.001>
11. McCann, M.T.; Gilmore, B.F.; Gorman, S.P. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 1551-1571. DOI: <http://dx.doi.org/10.1211/jpp.60.12.0001>
12. Pettersen, E.; Goddard, T.; Huang, C.; Couch, G.; Greenblatt, D.; Meng, E. Ferrin T.U.C.S.F. Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>
13. Jeng, W.; Ko, T.; Liu, C.; Guo, R.; Liu, C.; Shr, H.L.; Wang, A.H. Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1567-1577. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm1176>
14. Muñoz, L.; Salazar, L.; Botero, S.; Navarrete, J.; Pinilla, G. Possible antibiofilm effect of peptides derived from IcaR repressor of *Staphylococcus epidermidis* responsible for hospital-acquired sepsis. *Advan. Comput. Biol.* **2013**, *232*, 92-95. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-01568-2_13
15. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 933-937. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn823>
16. Cheng, H.; Sen, T.; Kloczkowski, A.; Margaritis, D.; Jernigan, R.L. Prediction of protein secondary structure by mining structural fragment data base. *Polymer.* **2005**, *46*, 4314-4321. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.040>
17. Lata, S.; Sharma, B.; Raghava, G. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC. Bioinformatics.* **2007**, *8*, 263. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-263>
18. Baxevanis, A.; Quellerie, F. *Bioinformatic: A practical guide to the analysis of Genes and Proteins*. Wiley Interscience.: NY, 2005; pp 50-65.
19. Sarin, V.; Kent, S.; Tam, J.; Merrifield, R. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147-57. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90704-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1)
20. Perez-Cordero, J.; Lozano, J.; Cortes, J.; Delgado, G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides.* **2011**, *32*, 683-690. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.011>
21. ProteDNA Predictor of sequence-specific DNA-binding residues in transcription factors <http://serv.csbb.ntu.edu.tw/ProteDNA/index.php> (consultado el 14 de marzo de 2015)
22. STRING. Known and predicted protein-protein interactions http://string.embl.de/newstring.cgi/show_input_page.pl?UserId=IskH9

- N1aPbTO&sessionId=x6NILBgnr2_m (consultado el 15 de marzo de 2015).
25. Jefferson, K.; Cramton, S.; Gotz, F.; Pier, G. Identification of a 5- nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 889–899. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03482.x>
 26. Cheng, H.; Sen, T.Z.; Jernigan, L.; Kloczkowski, A. Consensus Data Mining (CDM) Protein Secondary Structure Prediction Server: combining GOR V and Fragment Database Mining (FDM). *Bioinformatics.* **2007**, *23*, 2628–30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm379>
 27. Botero, S. Síntesis de péptidos derivados del represor icaR de *Staphylococcus epidermidis* con posible actividad anti biopelícula y baja actividad hemolítica. Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia, Julio 2013.
 28. Liu, L.; Fang, Y.; Wu, J. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1828*, 2479–86. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.017>

Article citation:

Pinilla, G.; Muñoz, L. C.; Salazar, L. M.; Navarrete, J.; Guevara, A. Diseño de péptidos basado en la secuencia análoga al represor negativo icaR de *Staphylococcus* sp. *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, *44*(2), 5–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n2.55213>