



**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
DERIVADOS DEL LL-37 SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULA OBTENIDAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS
HUMANOS Y AISLAMIENTOS DE BOVINOS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
PROYECTO DE GRADO
BOGOTA D.C, 18 SEPTIEMBRE 2020**



**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
DERIVADOS DEL LL-37 SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULA OBTENIDAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS
HUMANOS Y AISLAMIENTOS DE BOVINOS**

ESTUDIANTES:

**DAYANA VANESA REYES RÁTIVA
MARJED VALENTINA TRIANA PARDO**

ASESORA INTERNA:

**LILIANA CONSTANZA MUÑOZ MOLINA MSc EN BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ, 18 SEPTIEMBRE 2020**

DEDICATORIA

Dedicado a Dios que me permitió luchar por este sueño, a mis padres, hermanos y sobrinos por su apoyo, amor y fortaleza y aquellas personas que me acompañaron en este proceso.

Vanesa R.

Dedicado a Dios que me ha dado fuerzas en los momentos que más lo he necesitado, a mis padres que me brindaron su apoyo incondicional y por último a mis amigos que me han brindado su ayuda en todo mi proceso de formación.

Valentina T.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios quien puso en mi camino esta meta y me dio los conocimientos, sabiduría, salud y fortaleza cada día de continuar aún cuando me iba a dar por vencida. A mi familia por ser mi refugio, mi fortaleza, mi motivo de luchar por esta meta, por su amor incondicional que fue mi aliento cada día para continuar avanzando. A Alejandro Lopez quien hizo parte de esa motivación de seguir formándome profesionalmente, por su apoyo en los momentos que más lo necesite. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por todos los conocimientos que adquirí para mi formación profesional. A la profesora Liliana Muñoz y a la estudiante de maestría Laura Viuche, por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación, por los conocimientos aportados en pro de mi crecimiento profesional. A la profesora Angélica Betancourt, por los conocimientos aportados en pro de un trabajo de investigación de calidad y crecimiento profesional. Al grupo de investigación REMA quien nos colaboró proporcionando los laboratorios, implementos y reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto. A los compañeros y amigos con los que compartí grandes momentos, que fueron de gran apoyo cuando lo necesite.

Vanesa R.

Agradezco a Dios por ser el pilar en mi vida. A mis padres porque sin ellos no me hubiera sido posible ser la persona que soy tanto profesional como personalmente. A mis amigos que me apoyaron en momentos difíciles y fueron mi compañía durante este proceso. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por abrirme sus puertas permitiendo mi formación profesional y ofrecer las herramientas para cumplir mis metas. Al grupo de investigación REMA por acogerme y brindarme la ayuda necesaria para el desarrollo de los distintos experimentos realizados. A la profesora Liliana Muñoz por ser mi guía y permitirme culminar esta investigación. A la Bacterióloga Laura Viuche por acompañarme en este proceso y brindarme bases para comenzar este proyecto. A la Bacterióloga Maryi Segura por abrirme las puertas del Instituto Nacional de Salud y estar siempre dispuesta a ayudar.

Valentina T.

CONTENIDO

	Pág.
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Índice de anexos	10
Resumen	11
Introducción	13
1. Objetivos	14
1.1 Objetivo general	14
1.2 Objetivos específicos	14
2. Justificación	14
3. Antecedentes	15
4. Marco teórico	26
4.1 Generalidades de los péptidos antimicrobianos	26
4.2 Péptidos antimicrobianos en aplicaciones clínicas	28
4.3 Bacterias Gram negativas	29
4.4 Bacterias Gram negativas asociadas a infecciones en humanos	31
4.5 Enfermedades de importancia clínica	33
4.6 Bacterias Gram negativas asociadas a infecciones en bovinos	35
4.7 Formación de biopelícula en bacterias Gram negativas	36
4.7.1 Proceso de formación de la biopelícula	37
4.8 Resistencia en bacterias Gram negativas	39
5. Materiales y métodos	42
5.1 Aislamiento de muestras: humanos, bovinos, controles y criopreservación.....	42
5.2 Escalas McFarland	45
5.3 Reconstitución de péptidos	45
5.4 Determinación de biopelícula	45
5.5 Curvas de crecimiento Bacteriano.....	46
5.6 Análisis estadístico.....	47

6. Resultados	48
7. Discusión	57
8. Conclusiones	61
9. Recomendaciones	62
10. Bibliografía	63
11. Anexos	10

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura de pared bacteriana en bacterias Gram negativas	30
Figura 2: Representación esquemática de la formación de la biopelícula	38
Figura 3: Mecanismos de resistencia adquirida	40
Figura 4: Control técnica cristal violeta	48
Figura 5: Porcentaje total de cepas Gram negativas que se les determinó la formación de biopelícula	49
Figura 6: Comparación del porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos de bovinos y humanos	50
Figura 7: Comparación del porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos bovinos	50
Figura 8: Porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos humanos	51
Figura 9: Porcentaje total de cepas Gram negativas que se les determinó curva de crecimiento.....	52
Figura 10: Curva de crecimiento bacteriano control <i>E.coli</i> ATCC 35218 con y sin tratamiento	52
Figura 11: Curva de crecimiento bacteriano cepa 100 <i>E.coli</i> con y sin tratamiento.	53
Figura 12: Curva de crecimiento bacteriano cepa CL10 <i>E.coli</i> con y sin tratamiento	54
Figura 13: Curva de crecimiento bacteriano cepa CL11 <i>P.mirabilis</i> con y sin tratamiento	54
Figura 14: Inhibición de crecimiento bacteriano de cepas Gram negativas	55
Figura 15: Inhibición de crecimiento bacteriano de aislamientos de bovinos	56
Figura 16: Inhibición de crecimiento bacteriano de aislamientos de humanos	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucradas las biopelículas bacterianas	34
Tabla 2: Especies bacterianas de bovinos y humanos analizadas en el estudio.....	43
Tabla 3: Número de cepas analizadas en la determinación de biopelícula y curvas de crecimiento	47

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Protocolo técnica Cristal violeta	77
Anexo 2: Curvas de crecimiento bacteriano cepas de bovinos y humanos	78



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
DERIVADOS DEL LL-37 SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULA OBTENIDAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS
HUMANOS Y AISLAMIENTOS DE BOVINOS**

RESUMEN

Muchos microorganismos tienen la capacidad de formar biopelícula, asociado a la persistencia de las infecciones y a la resistencia adquirida por algunas bacterias. Actualmente se han estudiado péptidos antimicrobianos los cuales cumplen funciones inmunomoduladoras como el péptido de defensa catiónico humano LL-37 que se almacena principalmente en gránulos específicos de los neutrófilos y en revestimientos epiteliales de diferentes órganos del cuerpo humano, así como también cuenta con actividad antimicrobiana y buena acción sobre la formación de biopelícula en las bacterias.

El biofilm o biopelícula es una placa de aglomerados bacterianos la cual se forma cuando las bacterias se adhieren a una superficie inerte o tejido vivo, donde crecen con formación estructurada mediante un mecanismo de comunicación denominado quorum sensing, lo que les confiere mayor resistencia. La formación de biopelícula por parte de bacterias Gram negativas les proporciona un potente factor de virulencia, resistencia y limitaciones a la hora de tratar estas infecciones por lo tanto se ha optado por nuevas alternativas de tratamiento como el uso de péptidos antimicrobianos derivados del LL-37.

El péptido antimicrobiano LL-37 desempeña un papel fundamental en el sistema inmune para actuar contra bacterias Gram negativas, por su amplio espectro de acción antimicrobiana alterando la permeabilidad de la membrana de dichos patógenos, además cuenta con una protección contra la degradación proteolítica bacteriana y carece de puentes de disulfuro permitiendo de esta manera una síntesis química más fácil y económica.

Por lo anterior se determinará el efecto inhibitorio en la formación de la biopelícula a partir del péptido de defensa catiónico humano LL-37 y sus derivados DLL-37, LL37-AC2 y LL37-I en bacterias Gram negativas de origen humano y de bovinos con diagnóstico de mastitis.

Palabras clave: Péptido sintético LL-37, biopelícula, bacterias Gram negativas.

ABSTRACT

Many microorganisms have the ability to form biofilm, associated with the persistence of infections and the resistance acquired by some bacteria. Currently, antimicrobial peptides have been studied which fulfill immunomodulatory functions, such as the human cationic defense peptide LL-37, which is stored mainly in specific granules of neutrophils and in epithelial coatings of different organs of the human body, as well as having antimicrobial activity and good action on the formation of biofilm in bacteria.

The biofilm or biofilm is a plate of bacterial agglomerates which is formed when bacteria adhere to an inert surface or living tissue, where they grow with structured formation through a communication mechanism called quorum sensing, which gives them greater resistance. The formation of biofilm by Gram negative bacteria provides them with a powerful virulence factor, resistance and limitations when treating these infections, therefore new treatment alternatives have been chosen, such as the use of antimicrobial peptides derived from LL-37 .

The antimicrobial peptide LL-37 plays a fundamental role in the immune system to act against Gram negative bacteria, due to its broad spectrum of antimicrobial action

that can have greater permeability of the membrane of these pathogens, it also has protection against proteolytic degradation and lacks disulfide bridges thus allowing easier and cheaper chemical synthesis.

Therefore, the inhibitory effect on the formation of the biofilm from the human cationic defense peptide LL-37 and its derivatives DLL-37, LL37-AC2 and LL37-I in Gram negative bacteria of human origin and of bovines diagnosed with mastitis will be determined.

Key words: Synthetic peptide LL-37, biofilm, Gram negative bacteria.

INTRODUCCIÓN

Actualmente una de las grandes problemáticas que se presentan al momento de tratar una infección o enfermedad bacteriana, es la capacidad de formación de biopelícula por parte de algunos microorganismos. La biopelícula al ser una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie, los envuelve en una matriz que le proporciona un factor importante a las infecciones, llegando a estar estrechamente relacionado con la resistencia adquirida por algunas bacterias Gram negativas y en presencia de esta se incrementa la posibilidad de que la infección progrese siendo más fuerte y difícil de controlar.

Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas para el tratamiento de dichas afecciones, lo que ha abierto el camino al uso de los péptidos antimicrobianos como una opción de tratamiento contra bacterias formadoras de biopelícula. Los péptidos antimicrobianos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune innata, estos pueden expresarse de forma inducible por causa de algún estímulo que se genere o expresarse de forma constante, se han estudiado algunos de estos péptidos para probar su capacidad a la hora de contrarrestar los daños producidos por las bacterias causantes de la infección, gracias a su amplio espectro antimicrobiano y a sus múltiples mecanismos de acción.

Las características del péptido catiónico de defensa de humano LL-37 que es liberado por la desgranulación de neutrófilos frente a un proceso de infección y/o

inflamación hacen que sea un buen candidato, debido a que cuenta con actividad antimicrobiana y buena acción sobre la formación de biopelícula. Por ello se opta por distintas alternativas de tratamiento utilizando péptidos antimicrobianos derivados del LL-37 para contrarrestar estos mecanismos de acción por parte de las bacterias Gram negativas.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Comparar el efecto de péptidos antimicrobianos derivados del LL-37 sobre cepas de bacterias Gram negativas productoras de biopelícula provenientes de aislamientos en humanos y bovinos.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la formación de biopelícula en bacterias Gram negativas provenientes de aislamientos humanos y bovinos.
- Evaluar la eficacia de péptidos antimicrobianos derivados LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I, en cuanto a la actividad antimicrobiana y su capacidad de inhibición de la formación de biopelícula en bacterias Gram negativas de aislamientos humanos y aislamientos de bovinos.

2. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se realizará para determinar el efecto de los péptidos DLL-37, LL37-AC2 y LL37-I derivados del LL-37, el cual se almacena principalmente en gránulos específicos de los neutrófilos y en revestimientos epiteliales, el nombre del péptido se debe a dos residuos de leucina (L) en el extremo N y el número de aminoácidos (37) que lo constituyen. Se conoce que este péptido tiene funciones inmunomoduladoras, así como también cuenta con actividad antimicrobiana. (12) De acuerdo con investigaciones previas acerca del péptido antimicrobiano LL-37, evidenciaron su amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y su capacidad de inhibición de formación de biopelículas bacterianas. (13)

Las bacterias formadoras de biopelícula afectan seriamente la salud de humanos y en bovinos, producen infecciones, como lo son la mastitis las cuales tienen impacto de cierto modo sobre la ganadería lechera. Con esta investigación se busca evaluar el péptido antimicrobiano LL-37 y sus derivados frente a la formación de biopelícula de bacterias Gram negativas que afectan a humanos y bovinos.

Se verá beneficiado el sector salud y los ganaderos gracias a que se ampliarán las investigaciones en bovinos con mastitis y en distintos aislados clínicos, se enriquecerá el conocimiento de bacterias Gram negativas productoras de biopelícula que será de gran ayuda a la hora de tratar las infecciones causadas por estos patógenos. La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se beneficiará con una amplia investigación sobre la acción de los derivados del péptido LL-37 en las bacterias Gram negativas, la cual será muy provechosa para el desarrollo de proyectos basados en lo mismo a futuro.

Este proyecto de investigación se realizó con el apoyo del grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, el cual proporcionó su laboratorio, implementos y reactivos necesarios para llevar a cabo el estudio.

3. ANTECEDENTES

En primer lugar en nuestra amplia consulta se encontró el trabajo de Johansson et al en el cual se habla acerca de los péptidos antimicrobianos naturales los cuales son de gran abundancia, distribución y principalmente buena actividad, de tal manera que estos péptidos cumplen un gran papel en los sistemas de defensa del cuerpo. Los autores describen acerca del péptido maduro LL-37 el cual proviene de células granulocíticas específicamente de los neutrófilos, se demuestra que tiene actividad citotóxica en células y podría ser peligroso al liberarse extracelularmente, pero esto se puede moderar con factores provenientes del suero humano ya que se observó que su acción citotóxica se disminuye al estar en contacto con el suero y las células no se afectan de gran manera.(1)

Por otro lado, se encuentra que en la superficie de la vía aérea hay secreción de proteínas con funciones antimicrobianas siendo de gran importancia para el sistema

inmune innato, el cual protege al pulmón de infecciones respiratorias. En el estudio de Bals y colaboradores se demostró que LL-37 / hCAP-18 se expresa en diferentes epitelios de órganos en el humano incluyendo epitelios superficiales de las vías respiratorias, células serosas y submucosas de vías respiratorias proximales, actuando como péptido antimicrobiano el cual tiene una amplia actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La demostración por parte de los autores acerca de la expresión difusa de esta catelicidina humana en el epitelio de distintos órganos, hace de este péptido un antimicrobiano prometedor que puede cumplir un importante papel en la salud y enfermedad humana.(2)

También, se consultó la investigación de Turner y colaboradores en el cual se estudió que los neutrófilos humanos tienen la facilidad para acabar con bacterias y hongos gracias a su actividad antimicrobiana cumpliendo un gran papel en la inmunidad innata, cuentan con dos tipos de péptidos antimicrobianos, los primeros son las defensinas de láminas β y el péptido α -helicoidal LL-37. Los neutrófilos actúan por medio de mecanismos oxidativos y no oxidativos, este último mecanismo procede mediante péptidos antimicrobianos y proteínas que componen sus gránulos citoplasmáticos, en el caso de LL-37 se ubica en la familia de los péptidos de las catelicidinas que después de perder su secuencia señal se origina hCAP-18 que se encuentra específicamente en los gránulos secundarios de los neutrófilos y queratinocitos.(3)

El sistema de defensa del cuerpo humano está compuesto por diferentes péptidos antimicrobianos que actúan junto con el sistema inmune, el cual es altamente específico. En el estudio de Oren y colaboradores habla acerca de cómo el péptido de la catelicidina constituye una parte importante de los antibióticos peptídicos de mamíferos en una variedad de especies e incluso en el humano. La mayoría de catelicidinas liberan los péptidos antimicrobianos tras la activación de los leucocitos, así como también tienen varias estructuras y diferentes mecanismos de muerte.

Se detectó el péptido LL-37 en heridas y fluidos de ampollas en el humano y el gen que codifica a este péptido es inducido en queratinocitos humanos durante trastornos inflamatorios. En el estudio, para obtener información del péptido acerca su mecanismo de citotoxicidad no selectivo de células, sintetizó y caracterizó

estructural y funcionalmente a LL-37. En los resultados se evidenció que el péptido es significativamente resistente a la degradación proteolítica en solución a concentraciones bajas. (4)

Por otro lado en el trabajo de Scott y colaboradores habla acerca de los péptidos antimicrobianos los cuales juegan un papel importante en la inmunidad innata, principalmente en las superficies mucosas y epiteliales. Los péptidos son reconocidos como la forma principal de defensa contra la infección y son inducidos, en respuesta al desafío por los microorganismos causantes de graves infecciones en el hombre. La investigación tenía como objetivo estudiar las funciones del péptido LL-37 en la lucha contra la infección bacteriana, se demostró que LL-37 es potente agente antiséptico con la posibilidad de inhibir la estimulación de macrófagos por parte de los componentes bacterianos LPS, ácido lipoteicoico y lipoarabinomano. En el péptido se evidenció que protege a los ratones contra la endotoxemia letal. Un hallazgo a destacar por parte de LL-37 es que puede ayudar al sistema inmune limitando los daños provocados por parte de los productos bacterianos y reclutar células inmunes hacia el sitio de la afección para poder eliminar la infección. (5)

Las células de diferentes mamíferos producen una variedad de péptidos antimicrobianos como lo son las β -defensinas que se producen principalmente en células epiteliales de la piel y las mucosas, siendo la primera barrera de protección contra infecciones bacterianas. En la investigación de Ouhara y colaboradores se analizaron bacterias Gram negativas y Gram positivas frente al péptido LL-37 donde se observó la actividad antimicrobiana de este péptido el cual mostró una buena eficacia, ya que este péptido ataca la membrana y los lipopolisacáridos bacterianos. En el trabajo se evidenció una desintegración y perforación de la membrana bacteriana, haciendo una variable la cual se incubó con NaCl y no se vio afectación como tal en el péptido pero sí se vio afectada la interacción bacterias-péptido; con respecto a las bacterias con mayor carga negativa estas mostraron mayor susceptibilidad causada por la carga catiónica del péptido y por último al presentarse una bacteria formadora de biopelícula productora de exopolisacáridos la cual puede ser una barrera de protección contra el péptido. (6)

Los agentes infecciosos responsables de muchas enfermedades en el hombre han ido evolucionando a medida que se progresa con nuevas técnicas médicas y de higiene, llegando muchos microorganismos patógenos a crear resistencia a los diferentes antibióticos. Por lo tanto en trabajo de Lasa y colaboradores se trata un tema muy importante, el biofilm, que es un conjunto de microorganismos que presentan crecimiento estando adheridos a una superficie, este biofilm está constituido en su mayor parte por agua, seguido de bacterias y sus exopolisacáridos y en menor cantidad productos originados de la lisis bacteriana; la consistencia del biofilm permite el transporte de nutrientes, agua y todo lo necesario para las bacterias que se encuentran en la parte interna, los autoinductores o el quorum sensing que funciona como el sistema de comunicación bacteriana permite inducir la expresión genética. Estos biofilms bacterianos pueden estar asociados a procesos infecciosos, principalmente creando resistencia a los mecanismos de defensa y terapia antibiótica. En algunos casos cumple un papel protector como el de *Lactobacillus* que previene la colonización de microorganismos patógenos.(7)

Los neutrófilos cumplen funciones importantes como efectos de la inflamación, lesiones tisulares y la defensa del huésped contra las infecciones microbianas. En la investigación de Nagaoka y colaboradores se observa que la apoptosis de neutrófilos es inhibida en pacientes con sepsis, síndromes inflamatorios y dificultad respiratoria, por la acción de diferentes productos bacterianos.

La supresión de la apoptosis de neutrófilos tiene consecuencias como lo es la prolongación de la vida útil y liberación incontrolada de metabolitos citotóxicos y sustancias proinflamatorias, provocando diferentes trastornos en el paciente. En el artículo se registra que algunas células expresan péptidos que están presentes en epitelios, gránulos del neutrófilo que se activan con el sistema inmune innato produciendo reacciones antimicrobianas contra los microorganismos que puedan entrar en contacto y así proteger tejidos de bacterias invasoras, además este péptido LL-37 cuenta con quimioatrayentes para monocitos, linfocitos T y B, células natural killer, neutrófilos y favorece la liberación de la IL-1 β , se puede aliviar la sepsis por la capacidad de unirse a los lipopolisacáridos y promueve la repitelización para curar heridas.(8)

Por otro lado en el trabajo de Ulrich y colaboradores habla de que este péptido es el único de la familia de catelicidina que es de origen humano, tiene las secuencias tipo catelicidina conservadas y las secuencias c-terminales variables correspondientes a péptidos maduros, el nombre del péptido LL-37 proviene de su tamaño de 37 residuos de aminoácidos (1 LLGDFFRKSK-EKIGKEFKRI-VQRIKDFLRN-LVPRTES 37) con dos residuos principales como leucinas y sin presencia de residuos de cisteína. El péptido LL-37 y su precursor, hCAP18, se pueden encontrar en diferentes tipos de células, tejidos y fluidos corporales en diferentes concentraciones, este hecho está estrechamente relacionado con su doble naturaleza como antibiótico peptídico y molécula de señalización. De igual manera, se realiza en este artículo, una compilación de las propiedades antimicrobianas por parte del péptido LL-37, el cual exhibió un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y patógenos virales, esta actividad varía según las diferentes especies y cepas.(9)

Retomando nuevamente un punto muy importante respecto a las bacterias y su capacidad de formar biofilm, en la revisión bibliográfica del autor Nazar habla de que las bacterias pueden estar en la naturaleza de dos formas, como las bacterias planctónicas es decir de forma libre y como bacterias biofilm en colonias de microorganismos. Esta segunda forma de bacterias con capacidad de formar biofilm están estrechamente relacionadas a las infecciones. Principalmente se han evidenciado que en diversos dispositivos médicos como lo son catéteres endovenosos y arteriales, catéteres urinarios, sigmoidoscopios, lentes de contacto y más grave aún en válvulas cardíacas artificiales y marcapasos, siendo estos implantes portadores de biofilm, provocando graves problemas ya que pueden llegar a generar infecciones complicadas difíciles de tratar con los antibióticos. Finalmente el autor habla acerca de estrategias terapéuticas futuras como lo son péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula a célula el cual es indispensable para la formación de un biofilm.(10)

Por otra parte, en la revisión bibliográfica de Larsen y colaboradores se habla de que los péptidos tienen actividades microbicidas. Los péptidos que contienen los gránulos de los neutrófilos se secretan tras la exocitosis para atacar a los patógenos extracelulares o actuar en los fagosomas para destruir las bacterias ingeridas. El

péptido LL-37 el único identificado en humanos y que originalmente se obtuvo a partir de un clon de ADNc de médula ósea humana como un péptido de 39 residuos llamado FALL-39. Más tarde el péptido maduro se obtuvo de los gránulos de neutrófilos modificando su nombre como el que se conoce actualmente LL-37. Los autores correlacionan su actividad antimicrobiana y la estructura de LL-37 donde su mayor grado de conformación alfa-helicoidal tiene una mejor capacidad de atacar bacterias Gram negativas y los factores que contribuyen a formar esa estructura del péptido se deben a el pH fisiológico y los aniones, como HCO₃⁻, SO₄²⁻ o CF₃CO₂⁻.(11)

La capacidad de formar biofilm por parte de las bacterias es de gran importancia ya que este se asocia a infecciones críticas en el humano; en la investigación de Overhage y colaboradores que trata principalmente de *Pseudomonas aeruginosa* siendo este un microorganismo formador de biofilm el cual es el principal factor en las infecciones crónicas provocadas por esta bacteria, provocando en ella cierto tipo de supervivencia a ambientes extremos y difícil tratamiento debido a su alta resistencia a los agentes antimicrobianos.

La investigación tenía como objetivo analizar la interacción entre los péptidos catiónicos de defensa del huésped y *P. aeruginosa*, de la cual evidenciaron que el péptido LL-37 previene fuertemente la formación de biopelículas bacterianas in vitro y lo mejor del caso en concentraciones muy bajas. Se demostró que LL-37 afecta la formación de biofilm de tres maneras, primero fue en el apego por parte de *P. aeruginosa* a la superficie se redujeron en presencia del péptido; segundo LL-37 promueve las contracciones nerviosas, de este modo aumenta la motilidad de la bacteria lo que evita la formación de biofilm y el tercero, con la utilización de tecnología microarrays se demostró que el péptido afecta los dos sistemas principales de detección de quórum de *P. aeruginosa*.(12)

Por otra parte, en la investigación de Chennupati y colaboradores también se estudió los efectos de LL-37 sobre la formación de biofilm de *Pseudomonas*. Se demostró que ciertas características físicas de los biofilms reducen la actividad por parte de los antimicrobianos, así como la respuesta inmune del huésped. En el péptido LL-37 se ha evidenciado actividad frente a la formación de biofilm de

Staphylococcus aureus y *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente en el estudio realizado, los autores observaron que las altas concentraciones de péptido derivado de LL-37 mostraron una buena eficacia in vivo para erradicar las biopelículas de *Pseudomonas* y disminuir los recuentos bacterianos. Sin embargo, las altas concentraciones de péptidos mostraron efectos proinflamatorios y ciliotóxicos en la mucosa sinusal, por lo que se busca hacer estudios más profundos del péptido para evitar efectos secundarios en los pacientes.(13)

También, se consultó la investigación de Thennarasu y colaboradores donde se habla acerca del péptido LL-37 que debido a su origen de tipo humano es el más indicado para realizar investigaciones, éste desempeña un papel fundamental en la defensa inmune, es activo contra bacterias Gram negativas y Gram positivas gracias a que cuenta con un amplia acción antimicrobiana por medio de actividad lítica contra células cancerosas, hematíes y bacterias permeabilizando su membrana. A diferencia de otros péptidos antimicrobianos que son altamente susceptibles a degradación enzimática, LL-37 cuenta con una protección contra la degradación proteolítica y carece de puentes de disulfuro permitiendo de esta manera una síntesis química más fácil y económica.(14)

Otros microorganismos como los *Staphylococcus* coagulasa negativos son de importancia clínica por ser causantes de infecciones intrahospitalarias y su resistencia a diferentes antibióticos. En el trabajo de Hell y colaboradores se estudió a *Staphylococcus epidermidis* y su capacidad de agregarse en las superficies formando multi capa de biofilm, siendo este responsable de que la bacteria cree resistencia a los mecanismos de defensa: El objetivo de su investigación es determinar los posibles efectos del péptido LL-37 sobre la formación de biofilm de ésta bacteria causante de infecciones de importancia en dispositivos médicos permanentes. Se realizó el ensayo de biofilm a partir de la metodología de Cristal violeta, obtuvieron como resultados que el Péptido inhibe la unión de la bacteria a la superficie como la formación de biofilm, llegando a la conclusión de que el péptido puede interactuar directamente con los componentes del biofilm, lo que indicaría que puede ser un potencial candidato para la prevención de infecciones provocadas por *Staphylococcus*.(15)

El sistema inmune innato tiene como funciones mantener una barrera física y funcional contra microorganismos extraños al cuerpo, esta inmunidad cuenta con mecanismos reguladores para equilibrar la defensa y la inflamación ya que esta puede ser dañina para el organismo. Los neutrófilos también hacen parte de este sistema inmune cumpliendo funciones como efectores antimicrobianos contra diversos patógenos.

En la investigación de Alalwani y colaboradores se realiza un importante aporte respecto a los péptidos antimicrobianos los cuáles a parte de función antimicrobiana directa, cuentan con mecanismos de la modulación de la reparación y la homeostasis de los tejidos. El objetivo de su estudio es evaluar si la catelicidina LL-37 modula la respuesta de los neutrófilos a la estimulación microbiana, se evidencio que el péptido indujo la producción de ROS y la absorción de bacterias en neutrófilos. En estudios anteriores realizados por los mismos autores ya se había evidenciado que este péptido induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de neutrófilos humanos y tiene una influencia compleja en la apoptosis de neutrófilos. En conclusión, LL-37 modula la respuesta de los neutrófilos a la activación bacteriana. La catelicidina controla la liberación de mediadores inflamatorios al tiempo que aumenta la actividad antimicrobiana de los neutrófilos.(16)

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista puede causar neumonía, infecciones del catéter y del tracto urinario, sepsis en pacientes heridos y aquellos que están inmunocomprometidos, para que esta bacteria infecte a un huésped requiere de una ruptura del sistema inmune innato, después de ingresar al organismo *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar biofilm siendo ésta la característica principal para generar infecciones crónicas y le provee a la bacteria mejorar su supervivencia, así como la resistencia a los agentes antimicrobianos y a las respuestas inmunes del huésped. En el artículo de Dean y colaboradores hablan de que algunas cepas de *P. aeruginosa* presentan resistencia a diferentes fármacos, por lo tanto se busca evaluar nuevas alternativas como péptidos antimicrobianos que sean efectivos. En este estudio demostró que péptidos antimicrobianos derivados de LL-37 en concentraciones altas degrada la biopelícula de *P. aeruginosa* establecida en la nasofaringe de un animal y afectó la expresión

génica de muchos genes relacionados con biopelículas en *P. aeruginosa* PAO1, incluida la disminución significativa de la regulación de expresión de *rhIA* y *rhIB* .(17)

Las superbacterias clínicas difíciles de tratar tienen como principal característica la capacidad de escapar de los efectos de diversos antibióticos, debido a la formación de biofilm. Como ya se ha venido nombrando los péptidos antimicrobianos han sido muy estudiados y por las características que se han presenciado en ellos, son candidatos atractivos para el desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos. En el estudio de Wang y colaboradores se destaca el papel importante que tiene el péptido LL-37 en la protección contra infecciones.

El péptido LL-37 curiosamente en presencia de la luz solar desencadena la biosíntesis de dihidroxivitamina D en la piel que se une al receptor de vitamina D para iniciar la expresión del péptido. Debido a que estos péptidos naturales carecen de suficiente estabilidad para las proteasas, este estudio pretende rediseñar el LL-37 humano en análogos de péptidos con potencia, estabilidad y selectividad celular contra las superbacterias.(18)

Por otro lado se consultó la investigación de Lin y colaboradores donde se explica que los péptidos antimicrobianos utilizan varios mecanismos para atacar a las bacterias, como lo es cambio de conformación anfipática que puede ayudar a acceder a la membrana plasmática de las bacterias e interrumpir las células, inhiben la biosíntesis de la pared celular, el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática e incluso la síntesis de proteínas a través de la unión al ADN. *Acinetobacter baumannii* se ha convertido en un importante patógeno en las infecciones intrahospitalarias, las infecciones provocadas por esta bacteria últimamente han ido aumentando siendo de difícil tratamiento por su multirresistencia debido a su proteína AbOmbA que juega un papel en la formación de biopelículas en superficies abióticas. Se evidencio que cepas de *A. baumannii* presentaron una viabilidad reducida en bajas concentraciones de LL-37 ya que los fragmentos de este péptido poseen actividades tanto antimicrobianas como antibiofilm contra MDRAB.(19)

El principal patógeno involucrado en las mastitis es *Staphylococcus aureus* provocando infecciones subclínicas y clínicas, siendo un microorganismo difícil de tratar y controlar. En la investigación de Pawlik y colaboradores se habla que durante las mastitis una pronta respuesta inmunitaria es de gran importancia para evitar complicaciones. En la efectividad de la inmunidad innata está involucrada la actividad de los neutrófilos. Por lo tanto el receptor de interleucina 8 (IL-8) α (IL8RA), codificado por el gen *CXCR1*, está presente en la superficie de los neutrófilos. Se evidenció que la aparición del genotipo *CXCR1* está relacionada con el reclutamiento de neutrófilos deteriorado, lo que explica el mecanismo fisiológico de las diferencias genéticas para la susceptibilidad a la mastitis.(20)

El péptido LL-37 es producido por leucocitos fagocíticos, que se almacena en los gránulos de los neutrófilos en forma de propéptidos y son segmentados por la proteasa-3 después de ser liberada; también se encuentra en células epiteliales ubicadas en el tracto gastrointestinal y genitourinario, árbol bronquial y en la piel; está catelicidina tiene estructura α hélice, siendo un péptido catiónico lineal. En la investigación de Castillo y colaboradores tiene como objetivo determinar el efecto de los péptidos antimicrobianos análogos a IcaR y LL-37 en cepas *S. aureus* productoras de biofilm en medios con distintas condiciones cómo adición de glucosa, sacarosa y cloruro de sodio. Se observó que las condiciones del medio afectan en la formación de biofilm, los péptidos derivados de IcaR no mostraron eficacia y LL-37 mostró mejores resultados.(21)

Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas que han adquirido gran resistencia representan un problema actual Li y colaboradores dicen que los péptidos antimicrobianos se han vuelto de gran interés para el tratamiento por sus estructuras y por su gran potencial a la hora de atacar bacterias Gram negativas ya que por sus propiedades logran penetrar más allá de la membrana externa y se pretende que los péptidos antimicrobianos sean la ayuda en casos de resistencia a múltiples fármacos. En este estudio se investigó los genomas para identificar si contaban con capacidad biosintética los péptidos catiónicos no ribosomales para identificar si eran opcionales como tratamiento antibiótico. Se identificó que la brevicidina y laterocidina que muestran actividades bactericidas contra patógenos Gram negativos resistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*,

examinando genomas bacterianos se identificó que estos dos péptidos actuaban contra patógenos Gram negativos resistentes a antibióticos.(22)

El mecanismo de acción de los péptidos catiónicos es gracias a las interacciones electrostáticas entre la membrana bacteriana y el péptido, López y colaboradores estudió los efectos en un modelo de membrana por dos péptidos catiónicos con características parecidas pero con cargas catiónicas distintas que varían desde +2 hasta +9, estos péptidos actúan con su actividad lítica frente a los patógenos por su característica electrostática con la carga negativa de las superficies de las células microbianas que es favorecida por la carga positiva de estos péptidos catiónicos. Se observó que con cargas positivas por encima de +9 la actividad antimicrobiana es casi nula y con esta investigación se ha demostrado que los péptidos catiónicos cuentan con un gran potencial para ser la nueva generación de antibióticos.(23)

Los péptidos antimicrobianos son antibióticos a base de aminoácidos que forman parte de la primera línea de defensa del organismo. En el trabajo de Snoussi y colaboradores se investigó la actividad del péptido antimicrobiano humano LL-37 contra *Escherichia coli*. Se vio una rápida absorción del péptido LL-37 por parte de *E. coli* y la inhibición de su crecimiento. Se observó que los cultivos con gran masa celular presentan dos poblaciones, una que absorbe al péptido y otra población que resiste debido a la absorción del péptido por otras bacterias.(24)

Finalmente se consultó la investigación de Boge y colaboradores que trata sobre el uso de nanopartículas lipídicas de fase cúbica (cubosomas), como alternativa a los antibióticos de uso para la administración tópica del péptido antimicrobiano LL-37. La administración del péptido es de gran interés para el tratamiento de infecciones en la piel causadas por bacterias, como *Staphylococcus aureus* siendo esta una de las mayores causales, seguido de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*. Los cubosomas que contiene este péptido se prepararon de tres diferentes maneras para así comparar su acción. Se observó un efecto bactericida significativamente mejor para los cubosomas con LL-37 encapsulado después de la exposición a la enzima, en comparación con el LL-37 puro que había perdido su efecto bactericida después de la proteólisis.(25)

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son proteínas producidas por distintos tipos de células que cuentan con un amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias, virus, hongos y parásitos, están encargados de actuar en la inmunidad innata, generalmente están formados por alrededor de 200 aminoácidos que en gran parte son arginina y lisina las cuales tienen carga positiva y en menor concentración ácido aspártico y ácido glutámico con carga negativa dando así su característica catiónica.(34)

Un mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es atraer a los patógenos como las bacterias Gram negativas gracias a su concentración de lipopolisacárido y a las bacterias Gram positivas por sus ácidos teicoicos y lipoteicoicos lo que la hace inestable y permite la entrada del péptido a la membrana de este causando daños y creando un poro hidrofílico para inestabilizar al patógeno mediante pérdida de potencial de membrana y equilibrio osmótico. Existe otro mecanismo por el cual los péptidos en vez de penetrar al patógeno se sitúan en la membrana hasta alcanzar una gran concentración y cubrirla para así lograr debilitar su membrana y causar la muerte del patógeno.(34)

Estos péptidos tienen variaciones en cuanto a su estructura, organización y tamaño se separan por familias:

- **Defensinas:** ubicados en las superficies del epitelio de mucosa y células epiteliales, tracto gastrointestinal y respiratorio, se ha visto que se presenta un aumento en esta clase de péptido cuando se exponen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).(35)

Actualmente se han encontrado 4 beta-defensinas humanas hBD1 hBD2 hBD3 y hBD4 (6)

- **Histatinas:** contienen residuos de arginina, histidina y lisina y están ubicadas en la saliva donde es la primera línea de defensa contra patógenos que ingresan por esa vía.(36)
- **Catelicidina:** poseen un dominio conservado de catelina N-terminal y un dominio antimicrobiano C-terminal él cual puede variar.(37)

El péptido LL-37 es la única catelicidina de origen humano y es la parte c-terminal de la proteína antimicrobiana catiónica humana (hCAP-18) producida principalmente por los gránulos secundarios de neutrófilos y por células epiteliales, cuando se enfrenta a una infección posee capacidad quimiotáctica. hCAP 18 se refiere a que posee 18 kDa del extremo C-terminal de la proteína antimicrobiana catiónica humana (CAP), se le empezó a llamar LL-37 a este péptido al aislarse de neutrófilos y ver que contaba con 37 aminoácidos y LL gracias a que sus dos aminoácidos iniciales son leucinas.(38)

El gen hCAP 18 se expresa en los epitelios escamosos de las vías respiratorias, boca, lengua, esófago e intestino, se sintetiza constitutivamente en el bazo, hígado, estómago, intestino y médula ósea y se secreta en el sudor y saliva y su expresión se puede dar de manera constitutiva o inducida al entrar en contacto con patógenos o componentes bacterianos como los lipopolisacáridos y cambios en la barrera de las células epiteliales.(38)

El péptido LL-37 por lo tanto hCAP-18 / LL-37 es atraído a los grupos de fosfolípidos que se encuentran en la superficie de la membrana en los patógenos como bacterias donde se torna porosa y conlleva a la lisis hipoosmótica. (38)

A parte de su acción antimicrobiana también se ha identificado que esta catelicidina actúa como quimiocinas mediante la estimulación de las células del sistema inmune, ayuda con la activación de angiogénesis y la reepitelización beneficiando la cicatrización de heridas. (40)

El péptido LL-37 ha demostrado que con pequeñas modificaciones en su estructura su actividad se potencializa, así como controlar o eliminar la producción de biopelícula. Razón principal por la cual de su estructura original se derivan péptidos

antimicrobianos, como es el diseño del enantiómero D-LL37, que consiste en que cada residuo de aminoácido del isómero L de origen natural es reemplazado por el correspondiente D-aminoácido, presentando mayor resistencia a las proteasas y exhibiendo una actividad inmunoestimuladora más potente, mejora la actividad antimicrobiana y la estabilidad fisiológica que la de LL-37, lo que sugiere la interacción entre el péptido de catelicidina y la membrana celular del huésped o dianas intracelulares(54, 59).

En el caso del péptido LL37-AC2 este pasa por un proceso de acetilación de proteínas, es catalizada por una amplia gama de acetiltransferasas que transfieren grupos acetilo de la acetil-coenzima A al grupo α -amino de residuos amino-terminales o al grupo ϵ -amino de residuos lisina en diversas posiciones. Sin embargo se debe tener presente que para potenciar el efecto antimicrobiano de un péptido deben tenerse en cuenta factores como el aumento de carga neta, lo que permite mejorar su afinidad y actividad contra las bacterias, además de la hidrofobicidad de un péptido siendo esta de gran importancia para que este pueda insertarse de forma adecuada en la membrana celular bacteriana. (60,61)

Con respecto al péptido LL37-I se le realizó una variación en su plantilla, donde fue sintetizado con el grupo amino libre y el grupo carboxilo en forma de amina, para brindarle la característica de neutralizar endotoxinas bacterianas y para poder contrarrestar dichos mecanismos de acción de las bacterias Gram negativas.(54)

4.2. Péptidos antimicrobianos en aplicaciones clínicas

Los péptidos antimicrobianos son una alternativa prometedora porque presentan propiedades terapéuticamente atractivas. Son considerados antibióticos naturales que se encuentran presentes en todas las formas de vida, desde organismos unicelulares hasta mamíferos; se destacan por presentar un amplio espectro de actividad frente a hongos, bacterias, virus y protozoos, por lo que tienen una importante acción protectora en organismos que carecen de sistema inmune mientras que en los vertebrados forman parte de la inmunidad innata. Además, no son afectados por las mutaciones que provocan resistencia a los antibióticos clásicos. (32)

En muchos estudios realizados se ha evidenciado que los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos. La aplicación terapéutica de péptidos en desórdenes del sistema inmune, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neuronales y el cáncer. Los péptidos antimicrobianos pueden entrar a la terapéutica por medio de varias estrategias: como la monoterapia, para el tratamiento de infecciones; como agentes inmunomoduladores que incrementan la inmunidad innata natural, y como agentes neutralizantes de las endotoxinas, con el fin de prevenir complicaciones fatales asociadas con los factores de virulencia que causan el choque séptico. (32)

Otras ventajas importantes de los péptidos antimicrobianos es que al ser empleados como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y/o complementar la terapia con los antibióticos convencionales, pueden presentar sinergismo con estos. En estudios realizados anteriormente se ha demostrado que los péptidos HBD1 - HBD3, HNP1, HD5, y LL-37 al combinarse con otros antibióticos tienen efecto sinérgico, lo cual favorece la actividad antimicrobiana contra cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Clostridium difficile*.

También algunos péptidos antimicrobianos como el LL-37 pueden neutralizar las endotoxinas bacterianas como el LPS evitando la secreción de citocinas proinflamatorias que pueden causar destrucción del tejido, shock e incluso la muerte. Esto demuestra que podrían ser empleados como inmunomoduladores en enfermedades infecciosas y no infecciosas. (31)

Es de gran importancia las aplicaciones clínicas de estos péptidos que adicionalmente varias compañías farmacéuticas están trabajando en las aplicaciones de los péptidos como vacunas y en diagnóstico.

4.3. Bacterias Gram negativas

En las bacterias Gram negativas su pared bacteriana no les permite retener los agentes químicos ya que su permeabilidad cambia al poseer una membrana celular externa formada de lipopolisacáridos, porinas y endotoxinas, que tiene como

principal función ser la barrera de permeabilidad, excluyendo que ciertos medicamentos y antibióticos penetran en la célula (39), va seguida de un compartimiento celular acuoso llamado espacio periplásmico donde se encuentra una pared celular delgada de peptidoglicano con cadenas peptídicas que mantienen la forma celular y protege contra la lisis osmótica y termina con una membrana citoplasmática o interna.(41)

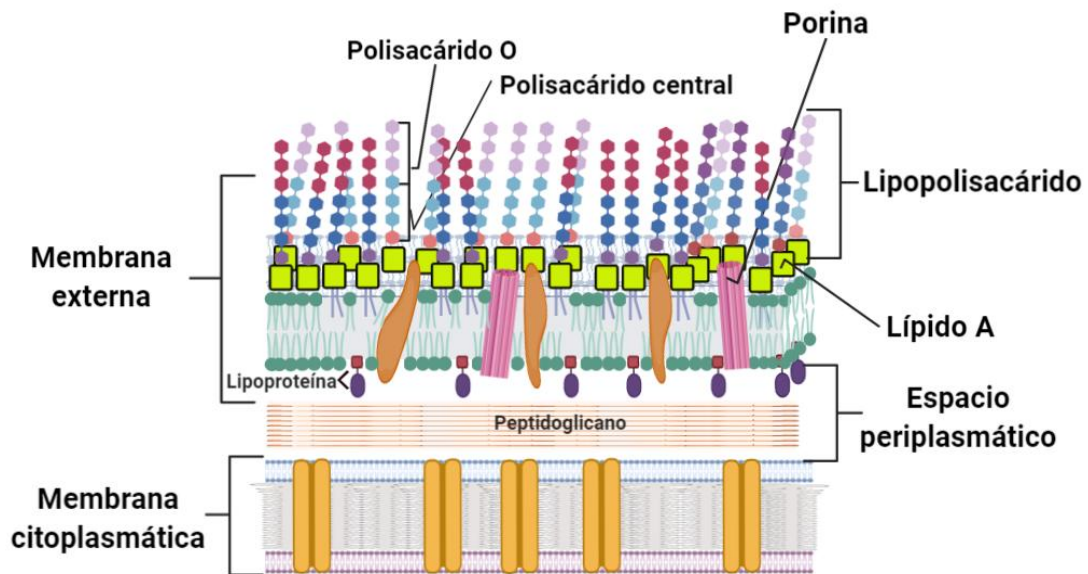


Figura 1. Estructura de pared bacteriana en bacterias Gram negativas.

En la pared de las bacterias Gram negativas está compuesta por 1. La membrana citoplasmática. 2. El espacio periplásmico, ubicado entre la membrana citoplasmática y el peptidoglicano. 3. Una capa de peptidoglicano. 4. Membrana externa que contiene fosfolípidos, el lipopolisacárido (LPS) característico de estas bacterias y proteínas de membrana externa, esta capa está estrechamente unida al peptidoglicano.

La tinción de Gram se fundamenta en las diferencias que poseen las paredes celulares de las bacterias Gram negativas y positivas anteriormente descritas; la base es el peptidoglicano, ya que este es el componente que le proporciona la rigidez a la pared celular, y las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa a diferencia de las Gram negativas que poseen una capa muy delgada. (42)

La diferencia de color que se observa frente a la tinción, se da porque la membrana externa de las bacterias Gram negativas es soluble en solventes orgánicos como el decolorante de Gram y la capa de peptidoglicano no atrapa el cristal violeta y se

pierde, quedando con un color respectivo rosa tenue. (42)

Las bacterias Gram negativas tienen un papel importante en la activación de la respuesta inmune innata ya que cuentan con dos membranas, una externa y otra interna. La membrana externa expresa un potente inductor de respuesta inmune, el lipopolisacárido (LPS), que está compuesto por tres unidades: un polisacárido hidrófilo, antígeno O y un dominio hidrofóbico conocido como lípido A. El lípido A es responsable de la mayor actividad endotóxica de estas bacterias. Sin embargo, los LPS son heterogéneos en los diversos grupos bacterianos, y algunas bacterias manifiestan este antígeno débilmente debido a cambios genéticos y no son reconocidos por receptores tipo Toll.

Por el contrario, hay grupos de BGN que pueden desencadenar dicha respuesta en grandes proporciones. Por lo tanto, el LPS puede desencadenar la respuesta inmune innata a través de los receptores Toll-like 4 (TLR4), que ocurre en muchas células inmunes como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos.

Los bacilos Gram negativos se encuentran entre los problemas de salud pública más importantes del mundo debido a la alta resistencia a los antibióticos. Estos microorganismos tienen una gran importancia clínica en los hospitales porque ponen a los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI) en alto riesgo y conducen a una alta morbilidad y mortalidad. Dos grandes grupos, Enterobacteriaceae y los no fermentadores, son responsables de la mayoría de los aislamientos clínicos. (45)

4.4. Bacterias Gram negativas asociadas a infecciones en humanos

Las bacterias Gram negativas tienen una gran capacidad para causar enfermedades en los humanos y pueden llegar a casi todos los sistemas del organismo, como el sistema digestivo, el sistema nervioso, el sistema urinario y el torrente sanguíneo, causando desde gastroenteritis, diarrea hasta meningitis severa. Tales microorganismos colonizan los intestinos, las vías respiratorias y la piel; lo que favorece la propagación a otras partes del organismo humano, especialmente en individuos inmunocomprometidos.

Una de las mayores dificultades de los profesionales de la salud es tratar las

infecciones intrahospitalarias del tracto respiratorio inferior en las que están involucrados los patógenos BGN, porque aunque son responsables de una buena parte de estas infecciones, no responden a la terapia con antibióticos debido a la altas tasas de resistencia y la pobre penetración de drogas en el parénquima pulmonar.(45)

Además, son responsables de la meningitis, asociada a Gram negativos donde se encuentra *Neisseria meningitidis* como el agente causal más común de meningitis en las poblaciones de niños y jóvenes adultos con un porcentaje de 59%, seguido de *Haemophilus influenzae* el cual desde la implementación de su vacuna han pasado de un 2-4% a menos del 1%, también encontramos en menor porcentaje algunos bacilos Gram negativos como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp*, las cuales como grupo se presentan en ciertos tipos de pacientes, siendo *E. coli* el agente causal más común para meningitis neonatal , en una enfermedad cómo está la cuál es potencialmente mortal si no se trata a tiempo, que se adquiere tanto en la comunidad como en el entorno hospitalario. Las infecciones del tracto urinario también son comunes, especialmente en mujeres jóvenes. Sin embargo, estas infecciones se convirtieron en un problema con la aparición desenfrenada de bacterias multirresistentes. (45)

Las Enterobacterias son un grupo heterogéneo ampliamente disperso en la naturaleza. Representan alrededor del 80% de los aislamientos Gram negativos con una miríada de especies generales que causan enfermedades en los humanos, incluidas infecciones del tracto urinario, neumonía, diarrea, meningitis, sepsis, shock endotóxico y muchos otros. Los géneros que frecuentemente afectan a los humanos son *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella*, entre otras.(45)

Los bacilos Gram negativos no fermentadores tienen una menor frecuencia de aislamiento en comparación con las Enterobacterianas; sin embargo, son un grupo relevante ya que causan infecciones graves y fatales, especialmente en el entorno hospitalario. También causan enfermedades oportunistas en pacientes de UCI que se someten a procedimientos invasivos. Los principales bacilos Gram negativos no fermentadores que causan enfermedades en humanos son *Pseudomonas*

aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas spp*, *Alcaligenes spp* y *Moraxella spp*.(45)

Otras de las bacterias Gram negativas que son significativamente importantes incluyen los siguientes patógenos:(39)

- *Neisseria spp*.
- *Vibrio cholerae*.
- *Acinetobacter spp*.
- *Helicobacter pylori*.
- *Campylobacter spp*.
- *Bordetella pertussis*.
- *Legionella pneumophila*.
- *Haemophilus influenzae*.

4.5. Enfermedades de importancia clínica

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan la biopelícula con distintos procesos infecciosos. La infección asociada a tejido dañado-cuerpo-extraño-biomaterial incluye una serie de características comunes:

- Colonización de sustratos por bacterias adhesivas formadoras de biopelícula.
- Presencia de un biomaterial, tejido dañado, o sustrato de tejido relativamente acelular.
- Iniciación de infección por pequeños inóculos bacterianos.
- Resistencia mediada por biopelícula bacteriana a los mecanismos de defensa del huésped y a la terapia antibiótica.
- Infecciones causadas con mucha frecuencia por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Infecciones persistentes por resistencia al tratamiento antimicrobiano.
- Presencia de inflamación, tejido celular dañado y necrosis en la interfase tejido-implante (zona fibroinflamatoria, inmunoincompetente) generado por partículas del biomaterial.
- Alteración de la respuesta mediada por células y posiblemente humoral del huésped por la presencia del biomaterial y bacterias.(8)

A continuación vamos a describir brevemente una lista parcial de algunos ejemplos de enfermedades infecciosas de importancia clínica relacionados con la formación de biopelícula bacteriana.(8)

Tabla 1: Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucradas las biopelículas bacterianas.

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biopelícula
Prostatitis bacteriana	<i>E.coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia</i>
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Melioidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Neumonía	Bacilos Gram negativos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E.coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Peritonitis por diálisis peritoneal	Variedad de bacterias
Tubos endotraqueales	Variedad de bacterias
Bloqueo conducto biliar	Variedad de bacterias

En muchos estudios se ha mencionado que las infecciones crónicas y las biopelículas se encuentran estrechamente relacionadas. Algunos autores describieron que la colonización de los pulmones en pacientes que padecían fibrosis quística era provocado por *P. aeruginosa* creciendo en forma de biopelículas, una de las primeras infecciones que se asocia con esta característica microbiológica. Cuando analizaron biopsias pulmonares de distintos casos de fibrosis quística, los autores lo demostraron y observaron que las bacterias se encontraban incrustadas en los tejidos en forma de microagregados, y que a su vez estos estaban rodeados por una matriz extracelular.(43)

De acuerdo con investigaciones realizadas, se estima que aproximadamente el 65% de las infecciones bacterianas son causadas por bacterias creciendo en forma de biopelículas; estas incluyen las que se asocian con dispositivos médicos y con tejidos. La incidencia cambia entre ellas, dependiendo del sitio de infección. Por ejemplo, se estima una incidencia del 2% en infecciones asociadas con implantes mamarios, del 1-4% en prótesis articulares, del 4% en válvulas mecánicas de corazón, del 10% en las derivaciones ventriculares, del 4% en marcapasos y desfibriladores, y hasta del 80% en las heridas de pie diabético.

Por otra parte, las infecciones asociadas a implantes médicos y tejidos, los tipos de microorganismos que son productores de biopelículas y que causan estas enfermedades también cambian. En las infecciones por catéteres vasculares se detectan *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella spp.*; en lentes de contacto (rígidas y blandas), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida spp.* y *Serratia spp.*; en válvulas cardíacas nativas (endocarditis), *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus spp.* y *Enterococcus spp.*; en catéteres urinarios, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y otros bacilos Gram negativos; en periodontitis, *Fusobacterium nucleatum* y *Peptostreptococcus anaerobius*; y finalmente en el pie diabético, bacterias anaerobias, hongos, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.(43)

4.6. Bacterias Gram negativas asociadas a infecciones en bovinos

La mastitis es una de las infecciones con mayor importancia en el sector ganadero ya que se presenta con alta frecuencia, esta infección causa una inflamación en la glándula mamaria donde las bacterias se multiplican y producen toxinas, esto provoca un incremento en el número de leucocitos o de las células somáticas en leche, reduciendo la cantidad y afectando al mismo tiempo la calidad de la leche, todo esto acompañado de cambios tanto químicos como físicos y microbiológicos, causando pérdidas económicas ya que la leche producida por una vaca con mastitis se encuentra alterada y no cumple con los requisitos para ser comercializada y consumida, también afecta al tener que comprar medicamentos para tratar esta infección y en algunos casos se ha visto muerte prematura del ganado. (44)

La fuente de contagio suele ser por contacto de vaca a vaca por medio de instrumentos contaminados que son utilizados en el ordeño al no ser desinfectados, también se puede presentar mediante la transmisión por contacto con las manos de los ordeñadores que anteriormente hayan estado en contacto con ubres afectadas.

Los bacilos Gram negativos que usualmente están asociados y pueden originar mastitis son los patógenos ambientales como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp*. Estas bacterias se encuentran en el medio ambiente donde pueden infectar a las vacas por higiene deficiente, humedad, las heridas en los pezones de las vacas también ayudan en la entrada de estos patógenos. Otras bacterias Gram negativas que afectan en menor proporción son *Citrobacter spp*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Proteus spp*, *P. aeruginosa*, *Serratia spp* y *Leptospira spp*.(44)

La mastitis originarias a partir de patógenos ambientales Gram negativos se han visto en constante aumento por causa de las ineficientes prácticas de prevención y control de mastitis ya confirmadas en vacas del mismo establo/granja, además se ha visto bajo interés por parte de los ganaderos en la higiene en el ordeño y inapropiada recolección de las heces, lo cual incrementa este aumento de casos. (46)

4.7. Formación de biopelícula en bacterias Gram negativas

La formación de biopelículas se inicia por varios factores ambientales, incluidas señales mecánicas, señales nutricionales y metabólicas, señales derivadas del huésped, concentración subinhibitoria de antimicrobianos y señales de quórum (QS). Una de las funciones clave de este proceso es actuar como un importante mecanismo de defensa contra amenazas internas y externas. A su vez, facilita su mayor resistencia y tolerancia a los antibióticos y desinfectantes, en comparación con los organismos planctónicos.

Las biopelículas logran esto a través de varios mecanismos, incluida la disminución de la permeabilidad de los antibióticos, los cambios fisiológicos inducidos por la tasa

de crecimiento reducida y la respuesta de privación de nutrientes y oxígeno, la mayor expresión de las bombas de salida y la aparición de células persistentes (una célula capaz de resistir los efectos antimicrobianos) dentro de la biopelícula.(33)

Las infecciones asociadas a biopelículas son extremadamente recalcitrantes a la terapia antimicrobiana debido a su propensión a la resistencia y, en consecuencia, han vuelto inadecuadas las monoterapias con antibióticos. Además, su robustez ha permitido que ciertas especies de bacterias desarrollen resistencias genética y fenotípica a una variedad de terapias antibacterianas.(33).

4.7.1 Proceso de formación de la biopelícula

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar. (8)

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula formando unas estructuras en las que se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, etc. En otros estudios han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula.

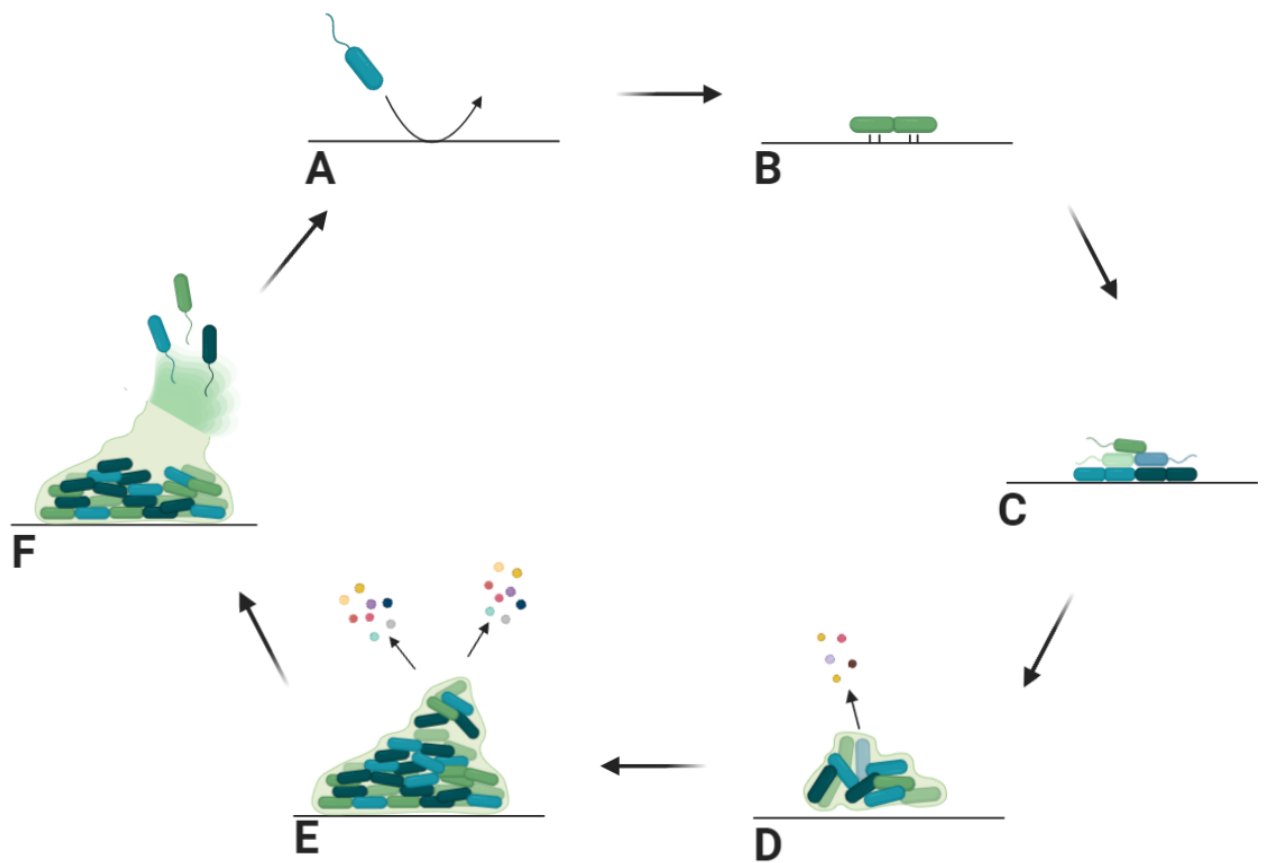


Figura 2. Representación esquemática de la formación de la biopelícula.

(A) Bacterias se adhieren a la superficie utilizando moléculas de adhesina.(B) Las adhesinas interbacterianas promueven mayor expansión de colonias bacterianas.(C) Las bacterias comienzan a dividirse y a expresarse más macromoléculas que les permite unirse en pequeñas microcolonias.D) A medida que estas colonias van creciendo, comienzan a secretar una sustancia compleja de carbohidratos, proteínas y lípidos que encapsula las bacterias formando la biopelícula. (E) La biopelícula alcanza su madurez, una serie de factores desarrollan una disposición heterogénea de células y moléculas dentro de la biopelícula, dando lugar a canales llenos de disolvente, así como a la secreción del factor de virulencia. (F) Dispersión de células de la masa celular. Factores del medio ambiente provocan la lisis celular que provocan la liberación de las moléculas y diseminando las de la matriz.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde la biopelícula es el proceso que menos se conoce; sin embargo en estudios realizados se ha evaluado que la presencia en distintos genomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación

controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias de la biopelícula.(8)

La capacidad de formar biopelículas es el factor crucial en las infecciones crónicas por bacterias Gram negativas, como lo es *K. pneumoniae* las cuáles son bacterias que aumentan su persistencia en los tejidos epiteliales y las superficies de los dispositivos médicos, y actúa como una barrera protectora contra los agentes antimicrobianos . Su capacidad para formar biopelículas ha sido un factor importante que contribuye a la infección del tracto urinario, que es uno de los tipos más frecuentes de infección nosocomial causada por el patógeno.

P. aeruginosa por ser causante de múltiples infecciones se ha convertido esta bacteria en un organismo modelo con respecto a la formación de biopelículas. Una vez establecidas, estas comunidades sésiles constituyen un modo protegido de crecimiento que promueve la supervivencia en un ambiente hostil y son difíciles de tratar debido a su alta resistencia inherente a los agentes antimicrobianos.(14)

4.8. Resistencia en bacterias Gram negativas

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural y una propiedad intrínseca de las bacterias que se produce tras la exposición a los antibióticos debido a su flexibilidad genética y adaptabilidad. Sin embargo, a lo largo de los años, este proceso se ha acelerado enormemente a través del uso excesivo, la prescripción inapropiada y el uso extensivo de antibióticos y otros agentes antimicrobianos. Este proceso, denominado resistencia adquirida, ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR). (33)

Se puede presentar una resistencia adquirida por medio de mutaciones en el material genético de las bacterias que causan que los antibióticos que usualmente se implementa en su tratamiento se vuelvan ineficaces, esta mutación se genera por estar en contacto con dichos antibióticos de manera incorrecta o prolongada, por ello, mientras se recetan más antibióticos en un tratamiento mayor será la probabilidad de que se origine resistencia y proliferen cepas nuevas con mutaciones

que pueden ser aumentando la producción y expresión de enzimas inactivadoras de antibióticos o bombas de reflujo.(39)

La resistencia adquirida puede ser causada por la transferencia horizontal de genes (HGT), mutaciones cromosómicas espontáneas o una combinación de ambos factores. La transferencia horizontal de genes es una de las fuerzas impulsoras predominantes del aumento de la resistencia a múltiples medicamentos, es la transferencia del gen de resistencia entre bacterias mediante el uso de genes exógenos: plásmidos, transposones e integrones . La base bioquímica subyacente para la resistencia a los antimicrobianos incluye varios mecanismos, como la inactivación, alteración del fármaco mediante hidrólisis u otras modificaciones; alteración o sobreexpresión del sitio de unión al fármaco; pérdida de porina que resulta en un paso limitado de antibiótico en la célula; aumento de la salida de antibióticos a través de bombas y formación de biopelículas. (33)

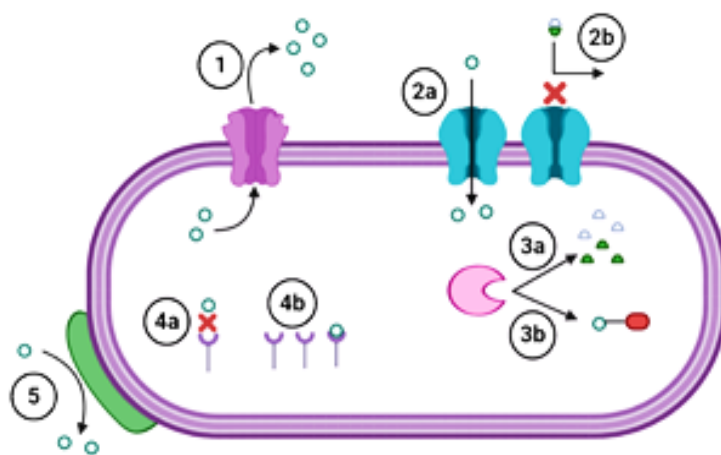


Figura 3. Mecanismos de resistencia adquirida.

1.Un aumento en la cantidad de antibióticos intracelulares que se transportan activamente fuera de la célula mediante bombas de salida. 2a. Pérdida de porinas que conduce a una reducción de la permeabilidad de la membrana externa, lo que limita la entrada de antibióticos. 2b. Reemplazo de porinas por canales más selectivos. 3. Inactivación de antibióticos por enzima. 3a. hidrólisis. 3b. modificación (por ejemplo, por fosforilación). 4a. Alteración del sitio objetivo. 4b. Sobreproducción del sitio objetivo. 5. Las biopelículas proporcionan un escudo mecánico y bioquímico que proporciona las condiciones necesarias para atenuar la actividad de los antibióticos.

Las bacterias Gram negativas naturalmente o de forma innata son insensibles a la vancomicina ya que este antibiótico no puede ingresar a la membrana externa. En el caso de *Klebsiella* posee insensibilidad para ampicilina por la producción de betalactamasa y *Pseudomonas aeruginosa* es insensible a las sulfonamidas, tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprima.(39)

Las bacterias Gram negativas pueden adquirir resistencia a una o más clases importantes de antibióticos, que generalmente resultan eficaces contra ellas, como:(39)

- Fosfomicina
- Cloranfenicol
- Glicilciclina (tigeciclina)
- Sulfonamidas (cotrimoxazol)
- Ureidopenicilinas (piperacilina)
- Fluorquinolonas (ciprofloxacina)
- Polimixinas (colistina y polimixina B)
- Tetraciclinas (doxiciclina, minociclina)
- Carbapenems (imipenem, meropenem)
- Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina)
- Cefalosporinas de tercera o cuarta generación (cefotaxima, ceftazidima)

La resistencia que se genere contra los péptidos antimicrobianos es más grave aún que la generada por medicamentos comunes ya que los péptidos son productos de la respuesta inmune propia del cuerpo.

Esta resistencia de las bacterias hacia los péptidos se da por sus variantes en la composición, carga, capacidad de adaptabilidad a cambios que genere el ambiente, estrés, cambios en las proteínas de membrana, polisacáridos si la bacteria tiene cápsula y demás cambios y/o modificaciones que les proporcionen la capacidad de limitar el mecanismo de acción de los péptidos.

Se ha visto que ciertas bacterias gram negativas adquieren resistencia gracias a las modificaciones que se presentan en las proteínas de su membrana exterior. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* produce enzimas proteolíticas las cuales logran

degradar a los péptidos antimicrobianos *Salmonella* se ha visto que sube las interacciones hidrofóbicas de su membrana exterior para evitar que los péptidos antimicrobianos la penetren y *Yersinia enterocolitica* modifica la carga del lípido A para evitar la respuesta inmune y el contacto con dichos péptidos, otra forma de evadir la acción de los péptidos antimicrobianos por parte de las bacterias es por medio de la neutralización produciendo moléculas que se adhieren a la membrana exterior o se segregan para unirse a los péptidos para así inhibirlos.(34)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación maneja variables de tipo cualitativo. La variable independiente está relacionada con la concentración de cada uno de los péptidos y la variable dependiente está relacionada con la capacidad de inhibición de los péptidos sobre las bacterias Gram negativas.

5.1 Aislamiento de muestras: humanos, bovinos, controles y criopreservación

- a. **Aislamientos de humanos y bovinos:** se analizaron 19 aislamientos de bacilos Gram negativos provenientes de pacientes de consulta externa y hospitalización las cuales contaban con previa identificación microbiana y 16 muestras identificadas como bacilos Gram negativos provenientes de muestras de leche de bovinos tomadas de fincas ubicadas en el Municipio de Caldas, Boyacá, Colombia. Tabla 2 se encuentran todas las bacterias Gram negativas aisladas en este estudio.

Tabla 2: Especies bacterianas de bovinos y humanos analizadas en el estudio.

TIPO DE CEPA	ESPECIES BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	CONSECUTIVO CEPA
CEPAS BOVINOS	<i>E.coli</i>	Cepa 23
	<i>E.coli</i>	Cepa 35
	<i>E.coli</i>	Cepa 37
	<i>Complejo Enterobacter- cloacae</i>	Cepa 62
	<i>E.coli</i>	Cepa 79
	<i>E.coli</i>	Cepa 80
	<i>E.coli</i>	Cepa 82
	<i>E.coli</i>	Cepa 84
	<i>E.coli</i>	Cepa 90
	<i>E.coli</i>	Cepa 100
	<i>K.oxytoca</i>	Cepa 130
	<i>S.paucimobilis</i>	Cepa 134
	<i>E.coli</i>	Cepa 157
	<i>K.oxytoca</i>	Cepa 165
	<i>Raoultella</i>	Cepa 177
<i>P.agglomerans</i>	Cepa 181	
CEPAS HUMANOS	<i>E.coli</i>	Ext 1
	<i>E.coli</i>	Ext 2
	<i>E.coli</i>	Ext 3
	<i>E.coli</i>	Ext 4
	<i>E.coli</i>	Ext 5
	<i>M. morgani</i>	Ext 6
	<i>K. pneumoniae</i>	Ext 7
	<i>E. coli</i>	Ext 8

	<i>E.coli</i>	CL 1
	<i>E. aerogenes</i>	CL 2
	<i>E.coli</i>	CL 3
	<i>E. cloacae</i>	CL 4
	<i>E.coli</i>	CL 5
	<i>E.coli</i>	CL 6
	<i>E.coli</i>	CL 8
	<i>E.coli</i>	CL 9
	<i>E.coli</i>	CL 10
	<i>P. mirabilis</i>	CL 11
	<i>E. cloacae</i>	CL 12

- b. Identificación de género y especie:** a las muestras de leche se les realizó la identificación con el equipo VITEK 2 (proporcionado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca), teniendo en cuenta las condiciones del fabricante.
- c. Controles:** las cepas seleccionadas como controles fueron la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 como control positivo para la formación de biopelícula, cepa *E. coli* ATCC 8739 control negativo no formadora de biopelícula, Cepa *E.coli* ATCC 35218 para curvas de crecimiento. Las cepas seleccionadas para control de calidad interno fueron *S. aureus* USA300 control positivo y *S. epidermidis* ATCC 12228 control negativo en la producción de biopelícula.
- d. Criopreservación de las muestras:** se realizó siembra masiva en agar LB de todas las cepas, se dejó en proceso de incubación a 37°C por 24 horas, obteniendo cepas puras de bacterias Gram negativas. En tubos crioviales se agregó 1.5 ml de caldo LB + glicerol al 20%, con un escobillón estéril se tomó la totalidad de las colonias y se agregó al criovial, se realizó por duplicado, finalmente las cepas se criopreservaron a -80°C. (Anexo 1)

5.2 Escalas McFarland:

Todas las cepas en estudio se ajustaron a escala de MacFarland de 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL) en el espectrofotómetro Genesys 10S UV.VIS a una densidad óptica de 650 nm.

5.3 Reconstitución de péptidos

En esta investigación se utilizaron los péptidos LL37-AC2, D-LL37, LL37-I, los cuáles fueron proporcionados por el grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Para la reconstitución se peso 3 mg de cada uno de los péptidos liofilizados en la balanza analítica, luego en un tubo eppendorf estéril se agregó agua ultrapura, el volumen de agua varía de acuerdo al peso molecular de cada péptido, para que quedara una concentración final de 1000 μ M, se estandarizó de la siguiente manera:

Péptido LL37-AC2: 713 μ L de agua ultrapura

Péptido DLL-37: 690 μ L de agua ultrapura

Péptido LL37-I: 736 μ L de agua ultrapura

5.4 Determinación de biopelícula

Se utilizó el método de Cristal Violeta propuesto por Cristensen y colaboradores con algunas modificaciones, las cuales fueron reemplazar el caldo TSB con y sin suplemento de glucosa por BHI y el tiempo de incubación pasó de 18 a 24 horas (55). Todas las cepas en estudio y los controles se analizaron 9 veces en placas de poliestireno de 96 pozos por triplicado, colocando 198 μ L de caldo BHI + glucosa al 1% y 2 μ L de inóculo bacteriano a escala 0,5 McFarland. Los controles usados para las pruebas fueron la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 como control positivo para la formación de biopelícula, cepa *E. coli* ATCC 8739 control negativo no formadora de biopelícula y control de esterilidad caldo BHI, Caldo BHI+Glucosa 1% y controles de calidad internos a cepa *S. aureus* USA300 como control positivo, cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 control negativo. Se dejó en proceso de incubación a 37°C por 24 horas y 48 horas, luego el sobrenadante se descartó, la

placa se dejó secar, las bacterias se fijaron con 20 μ l de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, con el fin de que permanezcan adheridas en la placa. Tabla 3 se encuentran el número total de bacterias Gram negativas analizadas en este estudio.

Posteriormente la placa se lavó tres veces con agua destilada desionizada esteril y se dejó secar, se adiciono 200 μ l de Cristal violeta 0.4% durante 10 minutos, permitiendo teñir las biopelículas adheridas al poliestireno, seguido de esto se realizó cuatro lavados con el agua destilada desionizada esteril para eliminar el exceso de colorante, la placa se dejó secar a temperatura ambiente de 10 a 30 minutos, por último el colorante adherido fue solubilizado con 200 μ L de ácido acético al 30 %. Las placas fueron leídas en un lector de MicroElisa (TECAN INFINITE 200 PRO) a una densidad óptica de 492 y 570 nm. (Anexo 2)

5.5 Curvas de crecimiento

Para determinar el crecimiento bacteriano se utilizó el equipo BioScreen C, a una temperatura de 37°C y agitación constante para mantener el inóculo bacteriano en suspensión uniforme, con lecturas cada hora por 24 horas a una longitud de onda 600 nm. Las cepas en estudio a escala 0,5 Mcfarland (0,08-0,1 Abs), se adicionaron 30 μ L en cada pozo a una placa que contenían 270 μ L de medio LB con péptido LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a una concentración final de 2.5 y 5 μ M. Finalmente se siembra control del medio (300 μ L de medio) y control de la cepa. Tabla 3 se encuentran el número total de bacterias Gram negativas analizadas.

Tabla 3: Número de cepas analizadas en la determinación de biopelícula y curvas de crecimiento.

ANÁLISIS	CEPAS BOVINOS	CEPAS CLÍNICAS
DETERMINACIÓN DE BIOPELÍCULA	14	11
CURVAS DE CRECIMIENTO	16	16

5.6 Análisis estadístico

- a. **Análisis de cristal violeta:** en el programa Excel se analizó el coeficiente de variación de las cepas a las que se les determinación de biopelícula las cuales fueron 14 cepas de origen bovino y 11 de origen clínico, el cual es una medida estadística que nos permite saber la dispersión de nuestro conjunto de datos, nos muestra cuánto varían los datos con respecto al promedio, este análisis nos arrojó que nuestros resultados son precisos, ya que presentan una dispersión en sus datos no mayor a 1,0. Los datos de desviación estándar nos indican, cómo su nombre lo dice la dispersión de los datos, es decir, que tan lejos se encuentran estos del promedio, entre más lejos se encuentre el dato del promedio más disperso es, nuestros resultados arrojaron que se generó poca dispersión de la desviación estándar con respecto al promedio, lo que nos indica mayor precisión en los análisis realizados.

Se tuvieron en cuenta los criterios de Salma y colaboradores para los puntos de corte, que nos permitieron establecer la clasificación de los microorganismos productores de biopelícula de la siguiente manera: no productores ($DO_{570} < 0.078$), productores bajos ($DO_{570} 0.078 - \leq 0.156$), productores moderados ($DO_{570} 0.156 - \leq 0.312$) y productores fuertes ($DO_{570} > 0,312$) (58).

- b. **Análisis curvas de crecimiento:** las lecturas obtenidas del equipo BioScreen C de las lecturas de las 16 cepas de origen bovino y 16 de origen clínico se pasaron a Excel, el análisis estadístico se realizó con el programa

estadístico GraphPad Prism versión 8. Inicialmente se realizó un test de normalidad (Test Gaussian distribution), el cual evalúa tres test (Kolmogorov-Smirnov test, D'Agostino and Pearson omnibus normality test, Shapiro-Wilk normality test), luego mediante el test de One-Way ANOVA y el método no paramétrico (Kruskal-Wallis test), nos permitió evidenciar el efecto de inhibición de cada uno de los péptidos con valores de significancia de 0.05 (intervalo de confianza del 95%), permitiendo observar valores de significancia ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***)

Por último se realizó un análisis de datos agrupados con el test Two-way ANOVA el cual nos permite comparar el comportamiento de las cepas tratadas con cada una de las concentraciones del péptido, junto con las cepas que no fueron tratadas con péptidos, realizando un análisis por hora durante las 24 horas, del mismo modo permitiendo observar valores de significancia ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

6. RESULTADOS

6.1 Determinación producción de biopelícula

6.1.1 Cristal Violeta

Mediante la técnica de Cristal Violeta, se determinó la producción de biopelícula por parte de las bacterias Gram negativas analizadas en el estudio, se tuvieron en cuenta los criterios de Salma y colaboradores. En la Figura 4 se puede observar los controles de la placa de cristal violeta ya finalizada.

Figura 4. Control técnica cristal violeta

En esta figura se puede observar un montaje del control de calidad interno de la técnica de cristal violeta ya finalizada. A. control de esterilidad para caldo BHI, B. control de esterilidad para

BHI+Glucosa 1%, C. control positivo con la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 formadora de biopelícula, D. control negativo cepa *E. coli* ATCC 8739 no formadora de biopelícula.

En la determinación de la formación de biopelícula se logra observar que hay mayor porcentaje de producción en aislamientos de bovinos que en humanos, como se muestra en la Figura 5.

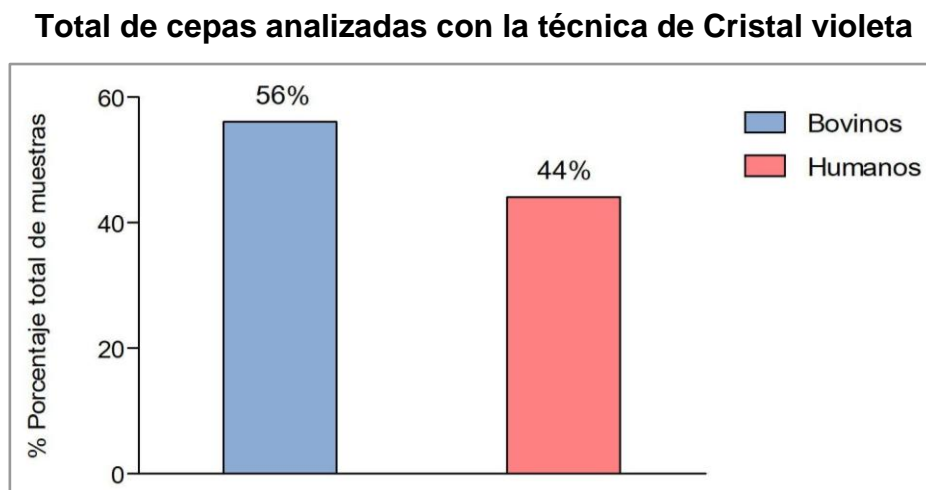


Figura 5. Porcentaje total de cepas Gram negativas que se les determinó la formación de biopelícula.

A partir de las lecturas de las absorbancias de 24 y 48 horas de incubación de cada una de las cepas analizadas, en primer lugar se puede observar la figura 6, donde se compara la formación de biopelícula a las 24 y 48 horas en el total de aislamientos. Se puede apreciar que de los 25 aislados evaluados (8%) fueron productores fuertes de biopelícula.

Determinación de la Formación de biopelícula en cepas Gram negativas de aislamientos de bovinos y humanos

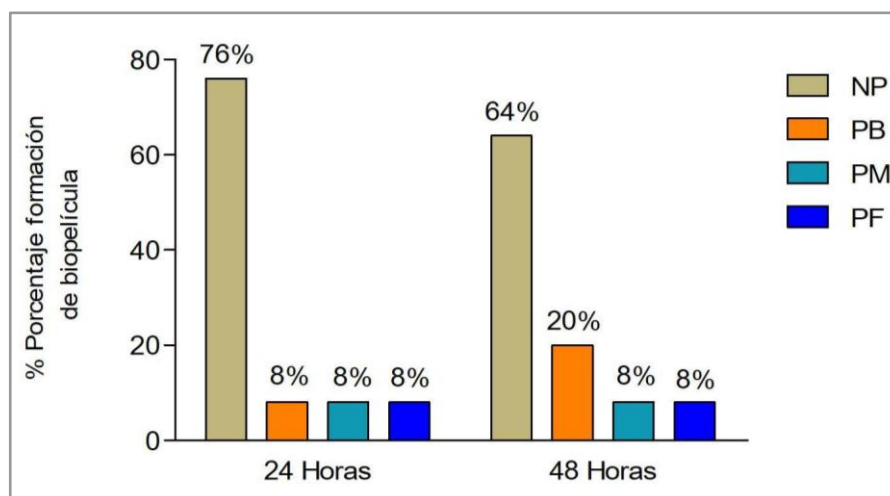


Figura 6. Comparación del porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos de bovinos y humanos.

NP: No productores, PB: Productores bajos, PM: Productores moderados, PF: Productores fuertes. Determinación de la formación de biopelícula por método de Cristal Violeta, a las 24 y 48 horas en el total de aislamientos.

Por otro lado en la figura 7, se puede observar que de los 14 aislamientos evaluados a las 24 y 48 horas, provenientes de bovinos, (14,3%) demostraron ser productores fuertes de biopelícula.

Determinación de la Formación de biopelícula en cepas Gram negativas de aislamientos de bovinos

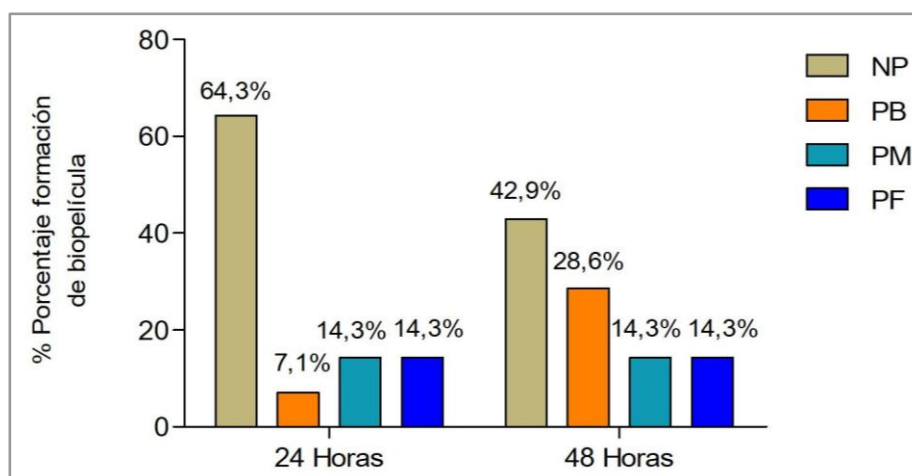


Figura 7. Comparación del porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos bovinos.

NP: No productores, PB: Productores bajos, PM: Productores moderados, PF: Productores fuertes. Determinación de la formación de biopelícula por método de Cristal Violeta, a las 24 y 48 horas en aislamientos de bovinos.

En la figura 8 podemos observar la formación de biopelícula a las 24 y 48 horas en los aislamientos de humano. Se evidenció que en los 11 aislados evaluados sólo (9,1%) fue productor bajo de biopelícula que correspondía a un *Proteus mirabilis*.

Determinación de la Formación de biopelícula en cepas Gram negativas de aislamientos humanos

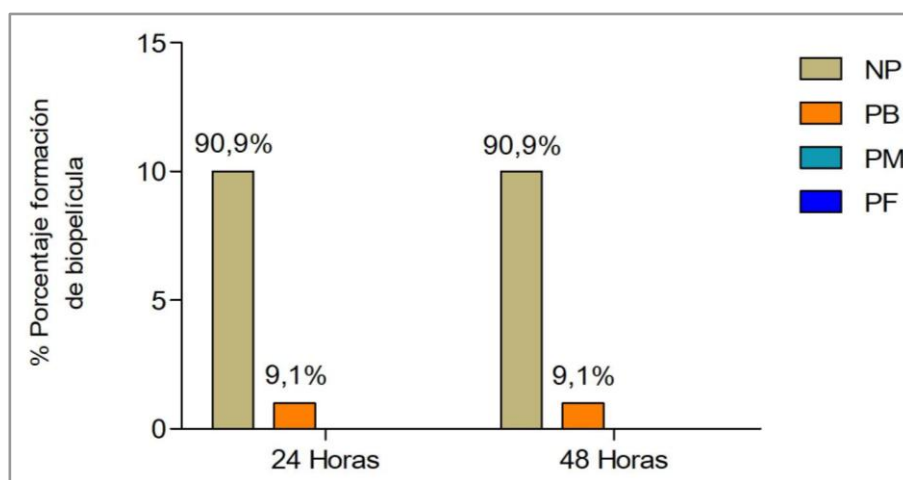


Figura 8. Porcentaje de formación de biopelícula de 24 y 48 horas en aislamientos humanos.

NP: No productores, PB: Productores bajos, PM: Productores moderados, PF: Productores fuertes. Determinación de la formación de biopelícula por método de Cristal Violeta, a las 24 y 48 horas en aislamientos de humanos.

6.2 Curvas de crecimiento

Se determinó las curvas de crecimiento por parte de las bacterias gram negativas analizadas en el estudio. En la figura 9 se logra observar qué se analizó igual número de cepas aisladas de muestras de bovinos y de cepas aisladas de muestras clínicas.

Total de cepas analizadas para curvas de crecimiento

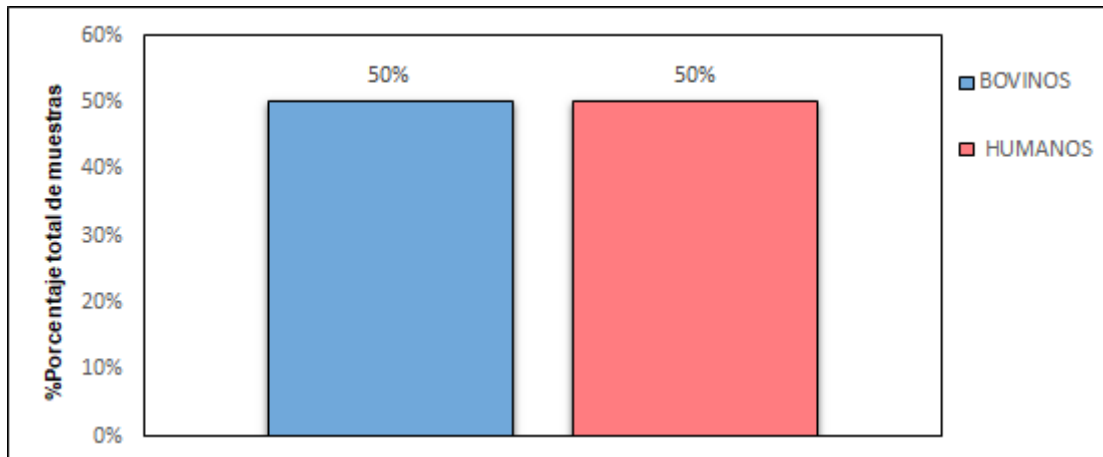


Figura 9. Porcentaje total de cepas Gram negativas que se les determinó curva de crecimiento.

En las curvas de crecimiento analizadas y con los valores de significancia obtenidos, se logró realizar una comparación de las cepas puras sin presencia de péptidos y las cepas tratadas con los péptidos antimicrobianos. Logrando evidenciar la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano por cada uno de los péptidos estudiados durante las 24 horas. En la figura 10 se puede observar que los péptidos LL37-AC2 y LL37-I en las concentraciones de 2,5 μM , 5 μM y el péptido DLL-37 en la de 2,5 μM tienen un valor de significancia de ($p < 0.001$).

Control *E.coli* ATCC 35218 tratada con péptidos LL37-AC2, DLL-37, LL37-I a concentración de 5 μM , 2,5 μM

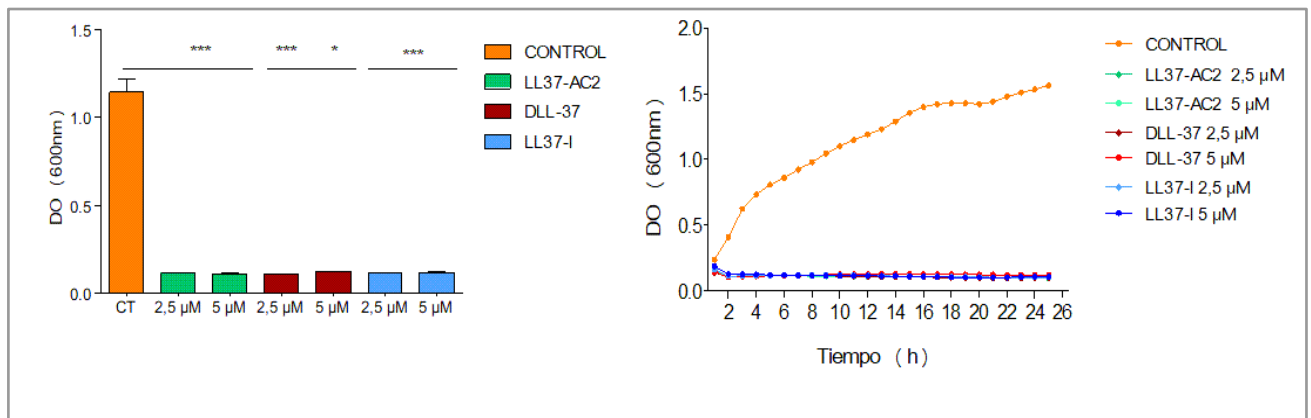


Figura 10. Curva de crecimiento bacteriano control *E.coli* ATCC 35218 con y sin tratamiento.

Inhibición estadísticamente significativa por horas en las curvas de crecimiento bacteriano en control *E.coli* ATCC 35218, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 μM y 5 μM . Valores de significancia: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***

Por otro lado en la figura 11 se puede apreciar que los péptidos LL37-AC2 en las concentraciones de 2,5 μM , 5 μM , DLL-37 en la de 2,5 μM y LL37-I en la de 5 μM tienen un valor de significancia de ($p < 0.001$).

**Cepa 100 *E.coli* tratada con péptidos LL37-AC2, DLL-37,LL37-I
a concentración de 5 μM , 2,5 μM**

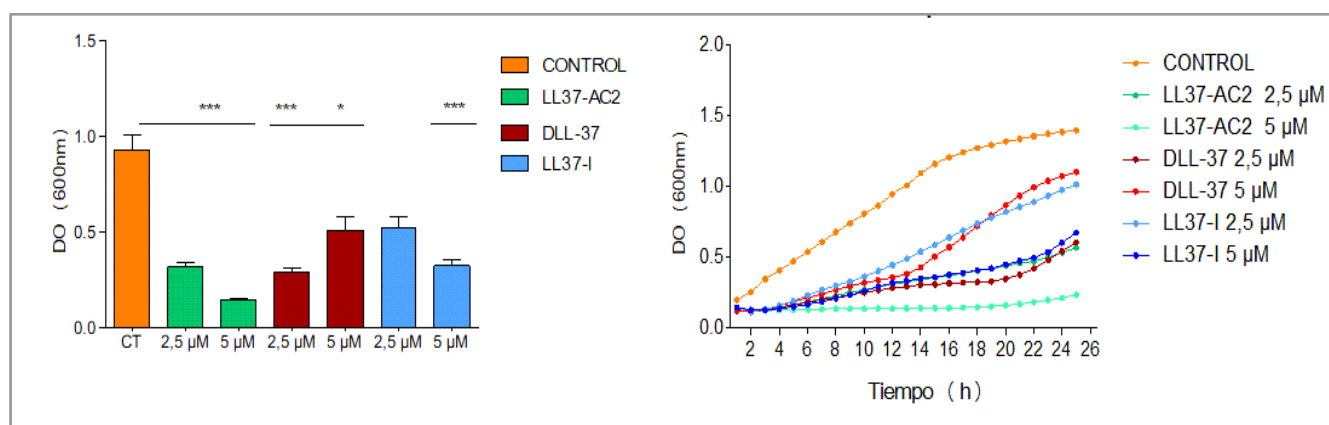


Figura 11. Curva de crecimiento bacteriano cepa 100 *E.coli* con y sin tratamiento.

Inhibición estadísticamente significativa por horas en las curvas de crecimiento bacteriano en la cepa 100 *E.coli* aislamiento de bovino, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 μM y 5 μM . Valores de significancia: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***

En la figura 12 se puede observar que en los tres péptidos en las dos concentraciones de 2,5 μM , 5 μM , tienen un valor de significancia de ($p < 0.001$).

**Cepa CL10 *E.coli* tratada con péptidos LL37-AC2, DLL-37,LL37-I
a concentración de 5 µM, 2,5 µM**

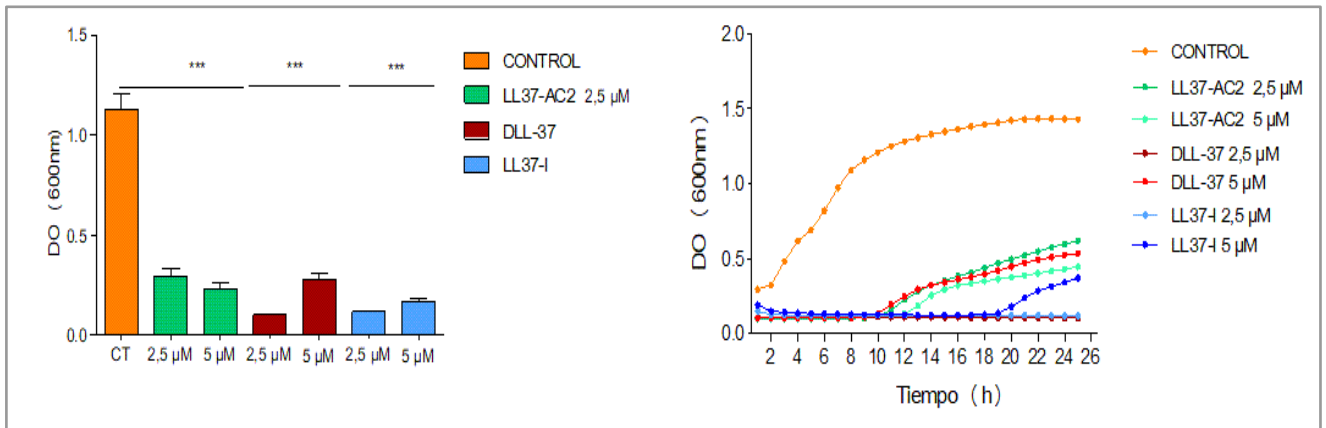


Figura 12. Curva de crecimiento bacteriano cepa CL10 *E.coli* con y sin tratamiento.

Inhibición estadísticamente significativa por horas en las curvas de crecimiento bacteriano en la cepa CL10 *E.coli* aislamiento de humano, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 µM y 5 µM. Valores de significancia: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***

En la figura 13 se observa que ninguno de los tres péptidos presentaron efecto inhibitorio con valores de significancia estadística.

**Cepa CL11 *P.mirabilis* tratada con péptidos LL37-AC2, DLL-37,LL37-I
a concentración de 5 µM, 2,5 µM**

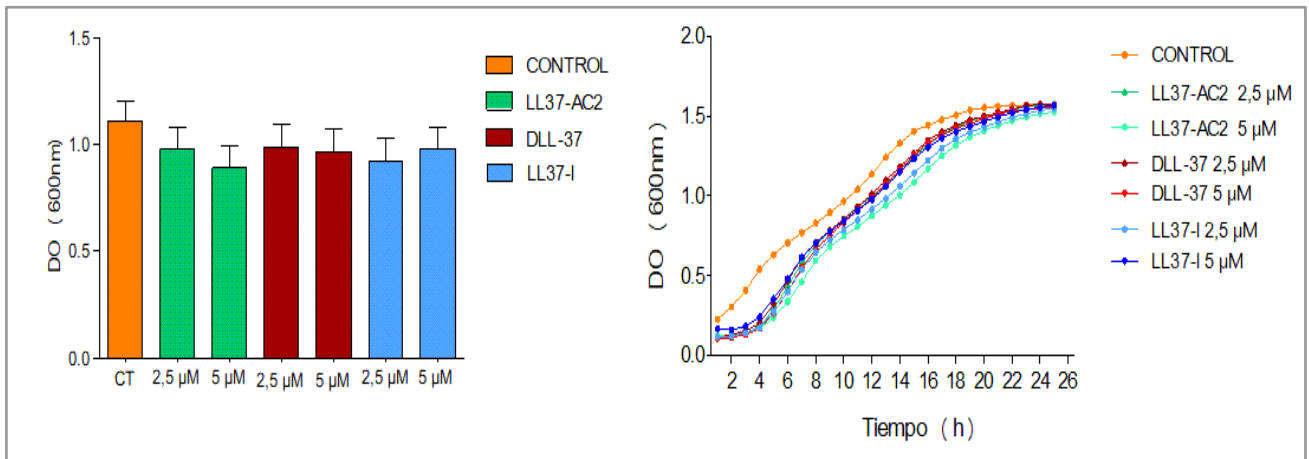


Figura 13. Curva de crecimiento bacteriano cepa CL11 *P.mirabilis* con y sin tratamiento.

Inhibición estadísticamente significativa por horas en las curvas de crecimiento bacteriano en la cepa CL11 *P.mirabilis* aislamiento de humano, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 µM y 5 µM. Valores de significancia: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***

Luego de analizar los resultados obtenidos que presentan valores de significancia estadística de 0.05 con un intervalo de confianza del 95%, se realizó un consolidado de los datos dando como resultado lo siguiente: en la figura 14 se puede observar que la inhibición del total de las bacterias Gram negativas por parte de los péptidos en concentración de 2,5µM está entre 50 y 68,8% y la inhibición en la concentración de 5 µM está entre 62,5 y 71,9%.

Efecto de los péptidos sobre el crecimiento bacteriano en bacterias Gram negativas

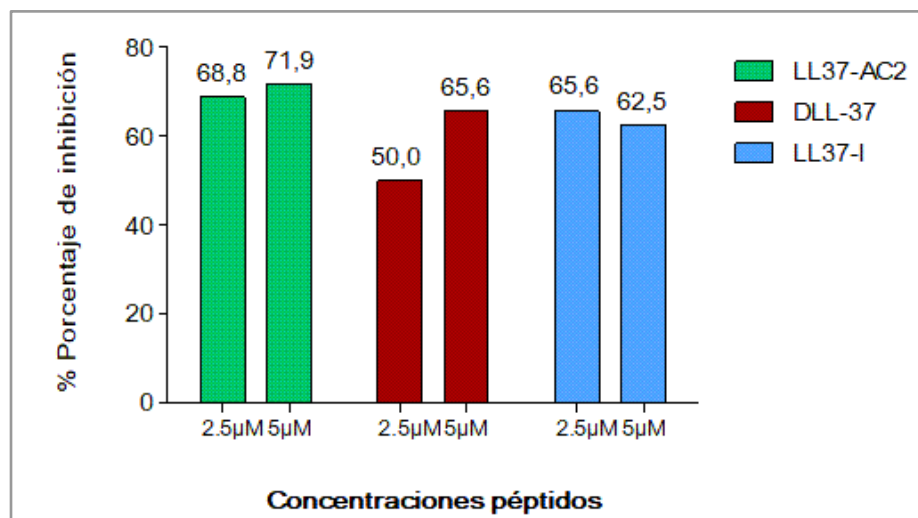


Figura 14. Inhibición de crecimiento bacteriano de cepas Gram negativas. Inhibición estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano en cepas de bacterias Gram negativas de aislamientos de bovinos y humanos, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 µM y 5 µM.

En la figura 15 se puede observar que la inhibición de bacterias Gram negativas de aislamientos de bovinos, por parte de todos los péptidos en concentración de 2,5µM está entre 50 y 87,5% y la inhibición en la concentración de 5 µM está entre 62,5 y 75%.

Efecto de los péptidos sobre el crecimiento bacteriano en aislamientos de bovinos

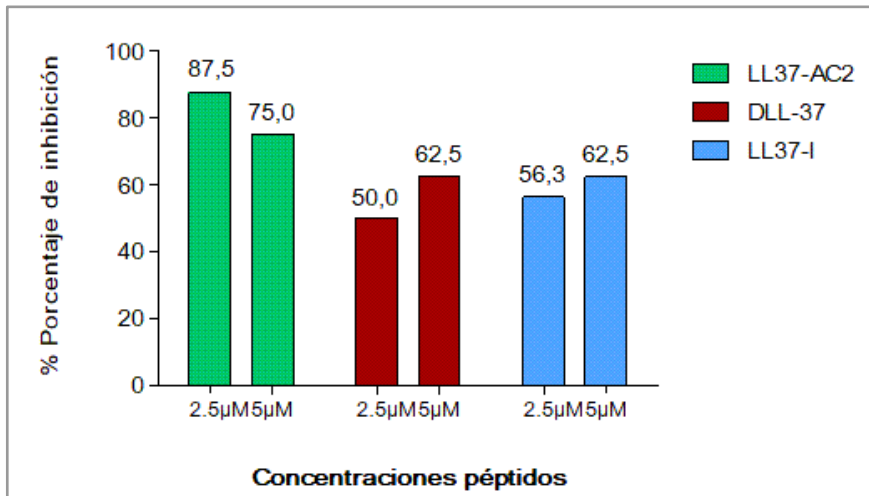


Figura 15. Inhibición de crecimiento bacteriano de aislamientos de bovinos.

Inhibición estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano en cepas Gram negativas de aislamientos de bovinos, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 μM y 5 μM.

En la figura 16 se puede observar que la inhibición de bacterias Gram negativas de aislamientos de humanos, por parte de todos los péptidos en concentración de 2,5 μM está entre 43,8 y 68,8% y la inhibición en la concentración de 5 μM está entre 56,3 y 62,5%.

Efecto de los péptidos sobre el crecimiento bacteriano en aislamientos de humanos

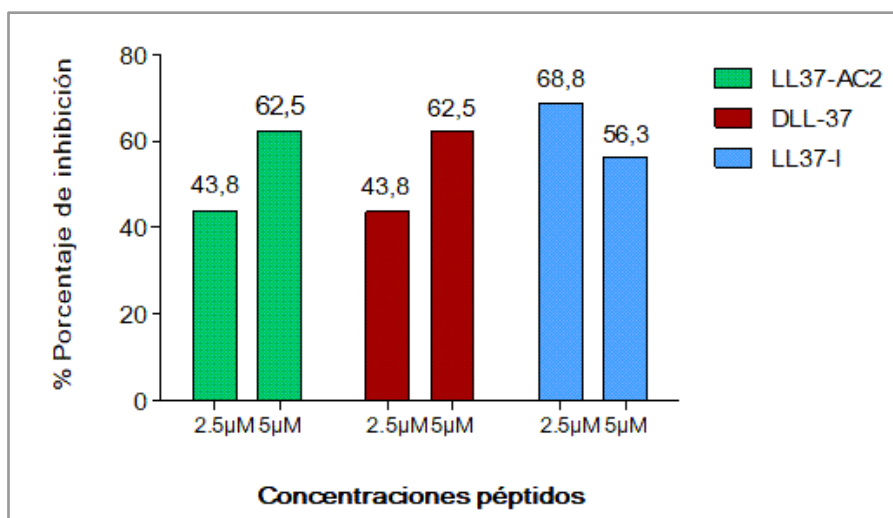


Figura 16. Inhibición de crecimiento bacteriano de aislamientos de humanos.

Inhibición estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano en cepas Gram negativas de aislamientos humanos, con los péptidos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I a concentraciones de 2,5 μM y 5 μM.

7.DISCUSIÓN

Con el pasar del tiempo la eficacia de los antibióticos se ha debilitado a causa de la multirresistencia en bacterias Gram negativas, que causan infecciones agudas a crónicas por lo que se requiere crear nuevas alternativas de tratamiento como los péptidos antimicrobianos (AMP), componentes esenciales de las defensas inmunitarias de los organismos multicelulares; tienen una actividad de amplio espectro y una cinética simple, combinadas con sus actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras, podrían proporcionar la base para el desarrollo de nuevos fármacos (61, 74).

En la formación de biopelícula como uno de los factores de virulencia más importantes a tener en cuenta en infecciones intrahospitalarias, los bacilos Gram negativos son los más frecuentemente aislados, es por esta razón que se analizaron muestras provenientes de aislamientos de leche de bovinos con mastitis bovina y diferentes secreciones de humanos. Se evidenció que del total de muestras a las que se les realizó determinación de biopelícula fueron 56% para cepas aisladas de muestras bovinas y 44% para cepas aisladas de muestras de humanos, de las cuales el 24% de estos aislamientos fueron formadoras de biopelícula a las 24 horas y a las 48 horas el 36% a una concentración de glucosa del 1%. En un estudio el resultado fue del 38%, se observó utilizando las mismas condiciones de este ensayo en bacterias Gram negativas, diferentes resultados se han reportado donde la formación de biopelícula fue del 77% en Gram negativas utilizando 2% de glucosa (70), este incremento en la concentración de glucosa favorece en las bacterias la adhesión al poliestireno, y en otro informe con el uso de caldo TSB suplementado con arabinosa y manosa la cuantificación de biopelícula fue del 98.2% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (75, 76). La literatura científica pone en manifiesto la variación en el carbohidrato y la concentración, sin embargo al realizar las comparaciones los resultados obtenidos avalan la formación de biopelícula.

Respecto a la curvas de letalidad bacteriana se evidencio que el total de muestras a las que se les realizó curvas de crecimiento fueron 50% para cepas aisladas de

muestras bovinas y 50% para cepas aisladas de muestras de humanos, de las cuales podemos observar que en función del tiempo, la fase lag se alarga en presencia de los péptidos, por lo tanto la fase logarítmica es corta debido a cambios en la actividad metabólica (63), sin embargo se observa un efecto inhibitorio en el crecimiento que va desde la fase lag y la fase logarítmica en el 100% y de 9.3% a 68.7% hasta las 24 horas de crecimiento en todas las cepas analizadas.

En los aislamientos de bovinos, la significancia estadística con IC 95% a una concentración de 5 μ M, fue del 75% para LL37-AC2 y 62.5% para DLL-37 y LL37-I; en las muestras de pacientes provenientes de consulta externa y clínicas a la misma concentración, los péptidos LL37-AC2 y DLL-37 fue del 62.5% y para el péptido LL37-I fue del 56.3%. Los péptidos a concentración de 2.5 μ M, en las muestras de bovinos se presentó incremento en el péptido LL37-AC2 en el 87.5% y en las muestras clínicas de pacientes con el péptido LL37-I fue del 68.8%. Se puede decir que la disminución de la actividad biológica observada en este estudio en muestras de humanos comparadas con las muestras de bovinos, posiblemente se deba a la presencia de genes de resistencia en estos aislamientos.

Sin embargo al presentar más del 50% de inhibición los péptidos análogos al LL-37 estudiados en bacterias Gram negativas se debe a que estos son cortos, catiónicos y presentan una carga neta de +9:LL37-I y DLL-37 y +10: LL37-AC2, que interactúan con la bacteria en la membrana bilipídica y posiblemente provoquen una disrupción de la membrana, seguido de una permeabilización y lisis bacteriana, por lo tanto actúan como agente antimicrobiano con capacidad de ser bactericidas, observación que ha sido demostrada *in-vitro* en un cultivo donde las bacterias se encontraban en fase de crecimiento logarítmico y la interacción del péptido análogo SAAP-148 del LL-37, permeabilizo la membrana en el 90% de *A. baumannii* contribuyendo a la muerte de las bacterias en minutos. Así mismo el péptido cuenta con la capacidad de eliminar las biopelículas establecidas por las cepas, de acuerdo a lo que muestran los resultados (78).

Como la actividad de los péptidos se observó de diferente manera, es importante reconocer las características de cada uno de ellos, para comprender completamente sus efectos sobre las bacterias Gram negativas. El péptido DLL37 tiene como

característica secuencia de ((d-F) G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D (d-F)LR), posee una longitud de 25 aminoácidos, su modificación consistió en generar un enantiómero D en la fenil alanina del amino terminal y carboxiterminal D, confiriéndole una mayor resistencia a las proteasas y exhibiendo una actividad inmunoestimuladora más potente (54, 59, 67).

La actividad por parte de DLL-37 a una concentración de 5 μ M en muestras de bovinos y humanos fue del 46.9%, siendo el péptido con menor actividad inhibitoria sobre las bacterias Gram negativas. En el estudio de Wongkaewkhiaw, demostraron que cuando se aumenta la concentración a 20 μ M, lograron obtener un actividad de muerte del 90 -100% de cepas de *Burkholderia pseudomallei*, ellos explican que la forma natural de los péptidos (que consta de L-aminoácidos) es sensible a la degradación enzimática por las proteasas bacterianas y humanas, siendo un inconveniente para el desarrollo de agentes terapéuticos peptídicos (71). Por otro lado cuando evaluaron el enantiómero D-RR4 en concentraciones de 10 μ M y 20 μ M, evidenciando una actividad bactericida rápida sobre cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, logrando la erradicación completa de la fase estacionaria (80).

A partir de lo que ellos explican y al evaluar específicamente la curva de crecimiento de la cepa CL11 *P.mirabilis* de este estudio, productora baja de biopelícula, se evidenció que ningún de los péptidos probados presentó una significancia estadística sobre el crecimiento bacteriano durante las 24 horas. En este caso se podría entender que la *metalo*proteínasa producida por *P.mirabilis*, podría ser la principal razón del bajo rendimiento de los péptidos, del mismo modo esto explicaría, que tal vez las concentraciones con las que se evaluó el péptido DLL-37 no fueron las adecuadas, ya que se observa que en general la mayoría de cepas tratadas en las dos concentraciones presentaron bajas inhibiciones.

En cuanto al péptido derivado del LL37-I de secuencia (G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D F L R), posee una longitud de 24 aminoácidos, gracias a su gran concentración de aminoácidos básicos e hidrófobos, ataca la membrana de los patógenos que cuentan con carga negativa (38,54). La actividad por parte de este péptido en las muestras de bovinos y humanos fue del 75%, siendo el péptido con

mejor actividad inhibitoria sobre las bacterias Gram negativas estudiadas, así mismo en la mayoría de curvas de crecimiento bacteriano se logró evidenciar una actividad biológica más estable en el tiempo.

La acción del péptido derivado del LL37-I a concentración de 5uM podría variar según su concentración, a bajas concentraciones de péptido podría actuar como ayudador en el sistema inmune y en concentraciones más altas podría verse colaborando en la migración de células inmunes, que apoyan a la hora de mantener controlada la infección causada por bacterias (65). Su eficaz capacidad de inhibición se logró apreciar en las dos concentraciones de 2,5 μ M y 5 μ M, así mismo en algunas cepas se evaluó la concentración de 1.5 μ M, sin embargo no se presentaron resultados con valores significativos, esto comparado con la investigación de Jerold Y y colaboradores en la cual se evidencia una buena actividad antimicrobiana en *Pseudomona aeruginosa*, por parte del péptido LL-37 el cual inhibió el crecimiento de esta bacteria dependiendo de la concentración, es decir, a concentraciones más bajas de péptido el efecto inhibitor era menor y al aumentar la concentración de péptido su acción antimicrobiana se intensificaban presentando así una tasa de mortalidad bacteriana constante(73).

Por otro lado, el péptido LL37-AC2 se caracteriza por una secuencia de (G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D F L R), posee una longitud de 24 aminoácidos y este pasa por un proceso de acetilación de proteínas, el cual es catalizado por una amplia gama de acetiltransferasas que transfieren grupos acetilo de la acetil-coenzima A al grupo ϵ -amino de residuos lisina en diversas posiciones (60,54). La actividad por parte de este péptido en las muestras de bovinos y humanos a concentración de 5uM fue del 65.6% de inhibición bacteriana de las bacterias Gram negativas.

Podemos observar que en el 59% de las curvas de crecimiento estudiadas se evidencia una actividad biológica de los péptidos de aproximadamente 6 a 12 horas. En la comparación de la investigación de Mohammed y colaboradores, que evaluaron péptidos cortos sintéticos derivados de la secuencia LL-37 como KR12, FK13 y FK16, ellos observaron que la actividad de estos péptidos redujo en gran

medida el crecimiento de *P. aeruginosa*, sin embargo proponen que la evaluación de estos a concentraciones altas se podría obtener una actividad mejorada. (72).

En los artículos que se han revisado de estos péptidos, no se encontró información relacionada en muestras causantes de mastitis bovina, y en muestras clínicas de humanos, se demostró que la actividad del péptido LL-37 puede ser disminuida por bacterias *E. coli* y *Salmonella* por poseer una fibra amiloide extracelular donde el péptido queda atrapado, y de esta manera evita que éste alcance la membrana bacteriana y lise la célula (77). Por lo anterior los resultados obtenidos en este estudio se puede sugerir que cada uno de los péptidos tiene una actividad inhibitoria en bacilos Gram negativos y que el péptido LL37-I mostró perdurar sobre el tiempo, con una amplia acción antimicrobiana gracias a su estructura helicoidal tridimensional y otra característica es que posiblemente inhiba la biopelícula independientemente de la dosis.

8. CONCLUSIONES

Los péptidos antimicrobianos prometen ser buenos candidatos para el tratamiento y control de enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram negativas. Las propiedades del péptido LL-37 que combate la formación de biopelícula, combinadas con sus actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras, podrían proporcionar la base para el desarrollo de nuevos fármacos que podrían ayudar a combatir las infecciones crónicas.

En la técnica de Cristal violeta para la determinación de la formación de biopelícula por parte de bacterias Gram negativas, se evidenció en un 20% de muestras clínicas y de bovinos en concentración de 1% de glucosa; evidenciándose en otros estudios que en concentraciones de 2% la identificación puede llegar a ser más sensible y específica para determinar la formación de la biopelícula.

Todos los péptidos en general presentaron una actividad biológica de aproximadamente 6 a 12 horas. Sin embargo, el péptido que presenta mejor efecto inhibitorio en los aislamientos de bovinos y de humanos es el LL37-I, en las dos concentraciones evaluadas. Indicando que el péptido cuenta con actividad

bactericida, ya que en las curvas se logra apreciar la inhibición transitoria del crecimiento bacteriano.

El péptido LL37-I tiene la capacidad de alargar la fase Lag, provocando así el acortamiento de la fase logarítmica, siendo este una buena alternativa de tratamiento para infecciones provocadas por bacterias Gram negativas y un candidato ideal para investigaciones a futuro.

9.RECOMENDACIONES

Para establecer una mejor formación de biopelícula por parte de bacterias Gram negativas, se sugiere comparar las concentraciones de glucosa al 1% y 2% en el medio BHI.

Para ver una mejor actividad de los péptidos realizar los análisis en presencia de diferentes antibióticos o teniendo en cuenta antibióticos que presente mayor resistencia, de tal manera que se pueda evaluar el efecto sinérgico por parte de los péptidos.

Evaluar la capacidad inhibitoria de la formación de biopelícula en bacterias Gram negativas, por parte de los péptidos análogos LL37-AC2, DLL-37 y LL37-I, ya que en este estudio por contratiempos no se logró evaluar esta característica.

10.BIBLIOGRAFÍA

1. Johansson J, Gudmundsson G, Rottenberg M, Berndt K, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. The Journal of biological chemistry [Internet].1998;273(6):3718..[Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <http://www.jbc.org/content/273/6/3718.short>
2. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet].1998 aug 4,;95(16):9541[Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://www.pnas.org/content/95/16/9541>
3. Jeffrey Turner, Yoon Cho, Nhu-Nguyen Dinh, Alan J. Waring, Robert I. Lehrer.Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Internet].1998 sep 1,;42(9):2206-2214.[Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://aac.asm.org/content/42/9/2206.full>
4. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. The Biochemical journal [Internet]. 1999 aug 1;341 (Pt 3)(3):501-513.[Cited 30 octubre 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220385/>
5. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. The Journal of Immunology [Internet].2002 Oct 1,;169(7):3883-3891.[Cited 30 de octubre de 2019]. Available in:<https://www.jimmunol.org/content/169/7/3883.short>

6. Kazuhisa Ouhara, Hitoshi Komatsuzawa, Sakuo Yamada, Hideki Shiba, Tamaki Fujiwara, Masaru Ohara, Koji Sayama, Koji Hashimoto, Hidemi Kurihara and Motoyuki Sugai. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2005 Mayo 10;55(Issue 6):888–896. [Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://academic.oup.com/jac/article/55/6/888/725457>
7. Lasa I, Pozo J L d, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* [Internet]. 2005 Aug 1;28(2):163-175. [Citado 30 de octubre de 2019]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002
8. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2006 Mar 1;176(5):3044-3052. [Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://www.jimmunol.org/content/176/5/3044#abstract-1>
9. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *BBA - Biomembranes* [Internet]. 2006;1758(9):1408-1425. [Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527360600126X>
10. Nazar C J. Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello* [Internet]. 2007 Apr 1;67(1):161-172. [Citado 30 de octubre de 2019]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162007000100011

11. Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Frontiers in Bioscience* [Internet]. 2008 1 de enero; 13: 3760-3767. [Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <http://www.bioscience.org/2008/v13/af/2964/fulltext.php?bframe=2.htm>
12. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infección e inmunidad* [Internet]. 2008 1 de septiembre; 76 (9): 4176-4182. [Cited 6 de noviembre de 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519444/>
13. Chennupati SK, Chiu AG, Tamashiro E, Banks CA, Cohen MB, Bleier BS, et al. Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas sinusitis*. *American Journal of Rhinology & Allergy* [Internet]. 2009 enero; 23 (1): 46-51. [Cited 6 de noviembre de 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379612>
14. Thennarasu S, Tan A, Penumatchu R, Shelburne CE, Heyl DL, Ramamoorthy A. Antimicrobial and Membrane Disrupting Activities of a Peptide Derived from the Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37. *Biophysical Journal* [Internet]. 2010; 98 (2): 248-257. [Cited 6 de noviembre de 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349509016087>
15. Hell É, Giske CG, Nelson A, Römling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Letters in Applied Microbiology* [Internet]. 2010 Feb; 50(2): 211-215. [Cited 6 de noviembre de 2019]. Available in: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2009.02778.x>
16. Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, et al. The antimicrobial peptide LL- 37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology* [Internet]. 2010

- Apr;40(4):1118-1126.[Cited 6 de noviembre de 2019].Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908514/>
17. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in microbiology* [Internet]. 2011;2:128.[Cited 6 de noviembre de 2019].Available in:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00128/full>
18. Wang G, Hanke ML, Mishra B, Lushnikova T, Heim CE, Chittezh Thomas V, et al. Transformation of Human Cathelicidin LL-37 into Selective, Stable, and Potent Antimicrobial Compounds. *ACS Chemical Biology* [Internet].2014 Sep 19,;9(9):1997-2002.[Cited 6 de noviembre de 2019].Available in:
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cb500475y>
19. Lin M, Tsai P, Chen J, Lin Y, Lan C. OmpA Binding Mediates the Effect of Antimicrobial Peptide LL-37 on *Acinetobacter baumannii*. *PloS one* [Internet].2015;10(10):e0141107.[Cited 6 de noviembre de 2019].Available in:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141107>
20. Pawlik A, Sender G, Kapera M, Korwin-Kossakowska A. Association between interleukin 8 receptor α gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Central-European journal of immunology*[Internet].2015;40(2):153-158.[Cited 6 de noviembre de 2019].Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637389/>
21. Castillo Sanchez C, Ricaurte Pérez C, Sierra Vargas A, Viuche Malaver L. Determinación de la actividad del péptido antimicrobiano LL-37, en cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de biopelícula obtenidas a partir de aislamientos clínicos.[Tesis pregrado].Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2017.
22. Li Y, Zhong Z, Zhang W, Qian P. Discovery of cationic nonribosomal peptides as Gram-negative antibiotics through global genome mining. *Nature communications*

- 2018 Aug 16,;9(1):3273-9. [Internet]. 2018 [Cited on 12 november 2019] Available in: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05781-6.pdf>
23. López Cascales JJ, Zenak S, García de la Torre, José, Lezama OG, Garro A, Enriz RD. Small Cationic Peptides: Influence of Charge on Their Antimicrobial Activity. *ACS Omega* 2018 May 31,;3(5):5390-5398. [Internet]. 2018 [Cited on 12 november 2019] Available in: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.8b00293>
24. Snoussi M, Talledo JP, Del Rosario N, Mohammadi S, Ha B, Košmrlj A, et al. Heterogeneous absorption of antimicrobial peptide LL37 in *Escherichia coli* cells enhances population survivability. *eLife* 2018 Dec 18,;7. [Internet]. 2018 [Cited on 12 november 2019] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6298785/pdf/elife-38174.pdf>
25. Boge L, Hallstenson K, Ringstad L, Johansson J, Andersson T, Andersson M, et al. Cubosomes for topical delivery of the antimicrobial peptide LL-37. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2019 Jan;134:60-67. [Internet]. 2019 [Cited on 12 november 2019] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641118311962>
26. Smet R, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* [Internet]. 2005 July 11;27(18):1337–1347. [Cited 30 de octubre de 2019]. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10529-005-0936-5>
27. Castrillón L, Palma A, Padilla C. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Revista Mexicana* [Internet]. 2007 marzo;51(2):57-67. [Citado 30 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2007/rmd072d.pdf>
28. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *INFECTIO* [Internet]. 2010 Mar;14(1):55-67. [Citado 6 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>

29. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *International immunology* [Internet]. 2016 May;28(5):245-253. [Cited 6 de noviembre de 2019]. Available in: <https://academic.oup.com/intimm/article/28/5/245/1750132>
30. Oñate-Garzon JF, Manrique-Moreno M, Patiño Gonzalez E. Actividad antimicrobiana de péptidos catiónicos diseñados a partir de un péptido neutro. *Acta Biológica Colombiana* 2017 Aug 1,;22(2):157-164. [Internet]. 2017 [Citado el 12 de noviembre de 2019] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v22n2/v22n2a04.pdf>
31. González García M, San Juan Galán J, Morales Vicente FE, Otero González AJ. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2017 Aug 1,;1. [Internet]. 2017 [Citado el 29 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedtro/cmt-2017/cmt172h.pdf>
32. Leidys Laura Pérez González, Mabel González Escudero, Noel D Pérez Acosta . Los péptidos y su utilidad en la práctica clínica. ;13. [Internet]. 2018 [Citado el 29 de marzo de 2020] Disponible en: <file:///C:/Users/diana/Downloads/809-4742-1-PB.pdf>
33. Glick M, DMD. Antibiotics. *The Journal of the American Dental Association (JADA)* 2016;147(10):771-773. [Internet]. 2019 [Cited on 31 march 2020] Available in: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/4/229/htm>
34. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio* 2010 Mar;14(1):55-67. [Internet]. 2010 [Citado el 13 de abril de 2020] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>
35. Tecilazich F, Dinh T, Veves A. Treating diabetic ulcers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2011 Mar;12(4):593-606. [Internet]. 2011 [Cited on 14 april 2020] Available in:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-89902018000400003&lang=es

36. G. Sandra Tjabringa, Klaus F. Raben, Pieter S. Hiemstra. The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2005 enero 06;18(5):321-327.[Internet]. 2005 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094553905000155?via%3Dihub>
37. Patricia MS. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: A multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. *Peptides* 2010 25 junio;31(9):1791-1798.[Internet]. 2005 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978110002603?via%3Dihub>
38. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: what is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS hygiene and infection control* 2017;12:Doc05.[Internet]. 2017 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388835/>
39. Dieter V, Bart L, Walter L, Liliane S. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology* 2012 28 noviembre;280(1):22-35.[Internet]. 2017 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874912002031>
40. Matthew T C, Christine Jacobs W. Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology* 2005 11 julio;3(8):601-610.[Internet]. 2005 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1205>
41. Jesus Artega, Geraldine Farfan, Pinto Luis. importancia de las tinción de gram para la identificación de la Escherichia coli Universidad de Carabobo;2015. [Internet]. 2015 [Citado el 14 de abril de 2020] Disponible en:

<https://pdfs.semanticscholar.org/3601/ae0bba4b11042516d67c02fc74982e206a40.pdf>

42. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Microbial biofilms and their impact on medical areas: physiopathology, diagnosis and treatment. *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 2018;75(2):79.[Internet]. 2015 [Citado el 14 de abril de 2020] Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v75n2/1665-1146-bmim-75-02-79.pdf>
43. MVZ. EDV. M en C. Rocío Angélica Ruiz Romero Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, FMVZ-UNAM. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio.[Internet].[Citado el 14 de abril de 2020] Disponible en: https://www.ammvab.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf
44. Junio Oliveira, Wanda C. Reygaert. Gram Negative Bacteria. 2019 9 marzo.[Internet]. 2005 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.statpearls.com/kb/viewarticle/22390>
45. Calderón A, Rodríguez VC. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2008 Dec 1,;21(4):582-589. [Internet]. 2008 [Citado el 14 de abril de 2020] Disponible en:<http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n4/v21n4a06.pdf>
46. Gwida M, Awad A, El-Ashker M, Hotzel H, Monecke S, Ehricht R, et al. Microarray-based detection of resistance and virulence factors in commensal *Escherichia coli* from livestock and farmers in Egypt. *Veterinary Microbiology* 2020 Jan;240:108539.[Internet]. 2015 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113519307515>
47. Yılmaz EŞ, Aslantaş Ö. Phylogenetic Group/Subgroups Distributions, Virulence Factors, and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Strains from Urinary Tract Infections in Hatay. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2020;53:e20190429.[Internet]. 2015 [Cited on 14 april 2019] Available in:

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822020000100306&script=sci_arttext

48. Hossain MA, Sattenapally N, Parikh HI, Li W, Rumbaugh KP, German NA. Design, synthesis, and evaluation of compounds capable of reducing *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020 Jan 1;185:111800. [Internet]. 2015 [Cited on 14 April 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523419309523>
49. Pereira SCL, Vanetti MCD. Potential virulence of *Klebsiella* sp. isolates from enteral diets. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 2015 Sep;48(9):782-789. [Internet]. 2015 [Cited on 14 April 2020] Available in: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000900782&lang=es
50. Chen T, Dong G, Zhang S, Zhang X, Zhao Y, Cao J, et al. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. *BMC microbiology* 2020 Feb 18;20(1):36. [Internet]. 2020 [Cited on 14 April 2020] Available in: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-01727-5>
51. Eraç B1, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu M, Oztürk I, Aydemir S. et al. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Mikrobiyol Bul.* 2014 Jan;48(1):70-81. [Internet]. 2014 [Cited on 14 April 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506717>
52. Lee C, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2017;7:55. [Internet]. 2017 [Cited on 14 April 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348979>

53. Wasfi R, Abdellatif GR, Elshishtawy HM, Ashour HM. First- time characterization of viable but non- culturable *Proteus mirabilis*: Induction and resuscitation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2020 Mar;24(5):2791-2801.[Internet]. 2020 [Cited on 14 april 2020] Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.15031>
54. Maryi Lorena Segura Alba. Efecto inhibitorio de péptidos de defensa innata derivados de LL-37 en biopelícula de *Staphylococcus* spp. [Internet]. 2008 [Citado el 14 de abril 2020] Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/75858>
55. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology* 1985 Dec 1,;22(6):996-1006.[Internet]. 1985 [Cited on 13 September 2020] Available in: <https://jcm.asm.org/content/22/6/996>
56. Mooney JA, Pridgen EM, Manasherob R, Suh G, Blackwell HE, Barron AE, et al. Periprosthetic bacterial biofilm and quorum sensing. *Journal of orthopaedic research* 2018;36(9):2331-2339.[Internet]. 2018 [Cited on 13 September 2020] Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.24019>
57. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 2013 Apr 1;70(2):136-150.[Internet]. 2013 [Citado el 13 de septiembre 2020] Disponible en: [file:///C:/Users/diana/Downloads/v70n2a10%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/diana/Downloads/v70n2a10%20(2).pdf)
58. Lajhar SA, Brownlie J, Barlow R. Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia. *BMC microbiology* 2018;18(1):41.[Internet]. 2018 [Cited on 13 September 2020] Available in: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-018-1182-z>

59. Dean SN, Bishop BM, Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology* 2011 Jul 1,;2.[Internet]. 2011 [Cited on 13 September 2020] Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3131519/>
60. Plevoda B, Sherman F. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biology* 2002;3(5):reviews0006.[Internet]. 2002 [Cited on 13 September 2020] Available in:<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-5-reviews0006>
61. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infection and immunity* 2008 Sep 1,;76(9):4176-4182.[Internet]. 2008 [Cited on 13 September 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519444/>
62. Caceres M, Etcheverria A, Padola N, Effects of the culture medium and the methodology applied on the biofilm formation of 2 diarrheagenic *Escherichia coli* strains. *Asociación Argentina de Microbiología*, Volume 51, Issue 3, July–September 2019, Pages 208-213 [Internet] 2019 [Cited on 13 September 2020] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754118301160>
63. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. *Introducción a la Microbiología*. 9a ed. Capítulo 6 Crecimiento Microbiano, Médica Panamericana, 2007.[Internet]2007 [Citado el 13 de septiembre 2020] Disponible en:<https://books.google.com.co/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA177&dq=fases+de+crecimiento+bacteriano&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwishP-cruXrAhXkp1kKHVLXBCYQ6AEwAXoECAYQAg#v=onepage&q=fases%20de%20Ocrecimiento%20bacteriano&f=false>
64. Rivera C, Flores L, Pantigoso C, Escobar E. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. *Rev. Peru biol.* v.17 n.1 Lima abr. 2010. [Internet] 2010 [citado el 13 de septiembre 2020]

Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000100016

65. Monisha G. Scott, Donald J. Davidson, Michael R. Gold, Dawn Bowdish, and Robert E. W. Hancock. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology* 2002; 169:3883-3891 [Internet] 2020 [cited 14 September 2020]. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/169/7/3883.full.pdf><https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/169/7/3883.full.pdf>
66. Pasachova J, Ramírez S. Efecto de los Péptidos Antimicrobianos Derivados del LL37 en el Crecimiento Bacteriano y Evaluación de la Formación de Biopelícula en Cepas Clínicas y ATCC de Bacilos Gram Negativos. [Internet] 2019 [Citado el 13 de septiembre 2020] https://docs.google.com/document/d/1JqDQxs_XBX45YzCvZXwaTbFHcgr9brCP/edit
67. Adam A, Strömstedt, Mukesh Pasupuleti, Artur Schmidtchen, Martin Malmsten. Evaluation of Strategies for Improving Proteolytic Resistance of Antimicrobial Peptides by Using Variants of EFK17, an Internal Segment of LL-37. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb; 53(2): 593–602.[internet] 2009 [cited 13 September 2020] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2630634/>
68. Muñoz L, Castillo C, Viuche L, Sierra A, Ricaurte C, Navarrete J, Pinilla G. La Experiencia: requisito para la visibilidad, la divulgación y el impacto de la investigación,1 Proyecto: Uso de péptidos antimicrobianos en modelos in vitro como estrategia de inhibición de la biopelícula en *Staphylococcus* sp Metabolismo y Formación de Biopelícula en *Staphylococcus aureus*, Cap 10. [internet] 2018 [Citado el 13 de septiembre 2020] Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/portal/recursos_user/SelloEditorial/Novedades/DiariodeCampollv2.pdf
69. Colmillo Xie, Yanan Zan, Xinyuan Zhang, Huihui Zhang, Mingjie Jin, Wanjiang Zhang, Yueling Zhang, Siguo Liu. Differential Abilities of Mammalian Cathelicidins

to Inhibit Bacterial Biofilm Formation and Promote Multifaceted Immune Functions of Neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**, 21(5), 1871 [Internet] 2020 [Cited 13 september 2020] Available in: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1871/htm>

70. Peña S, Cerón G. Producción de biopelículas y resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física. *Investigación en discapacidad*, Vol. 6, Núm. 3 de Septiembre-Diciembre 2017 pp 115-121. [Internet] 2017 [citado el 13 de septiembre 2020] Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2017/ir173c.pdf>

71. Saharut Wongkaewkhiaw, Suwimol Taweekhaisupapong, Chitchanok Anutrakunchai, Kamran Nazmi, Jan GM Bolscher, Surasakdi Wongratanacheewin Y Sakawrat Kanthawong. D-LL-31 en combinación con ceftazidima mejora sinérgicamente la actividad bactericida y la destrucción de biopelículas en *Burkholderia pseudomallei*. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 35, 2019-issue 5 [Internet] 2019 [Cited 13 september 2020] Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2019.1632835>

72. Mohammed I, Said D, Nubile m, Mastropasqua L, Dua H, Cathelicidin-Derived Synthetic Peptide Improves Therapeutic Potential of Vancomycin Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.*, 19 September 2019.02190. [Internet] 2019 [cited 13 september] Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02190/full#h5>

73. Jerold Y, Huang L, Romanowski E, Yates K, Proske R, McDermott A. Human Cathelicidin (LL-37), a Multifunctional Peptide, is Expressed by Ocular Surface Epithelia and has Potent Antibacterial and Antiviral Activity. *Curr Eye Res.* Mayo de 2005; 30 (5): 385–394. [Internet] 2005 [cited 13 september 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1497871/>

74. Lazarro B, Zasloff, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science* 01 May 2020: Vol. 368, Issue 6490. [Internet] 2020 [cited 13

september 2020] Available in:
<https://science.sciencemag.org/content/368/6490/eaau5480>

75. Ochoa S, López F, Escalona G, Cruz A, Dávila L, López B, Yolanda Jiménez, Giono S, Eslava C, Hernández R, Xicohtencatl J. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2013;70(2):138-150. [Internet] 2013 [citado el 13 de septiembre 2020] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1665-11462013000200010&lng=es&nrm=iso
76. Gomez J, Gomez-Lus M, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre J, Prieto J. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos?. *Revista Española de Quimioterapia* 2013;26(2): 97-102. [Internet] 2013. Disponible en: <https://medes.com/publication/92383>
77. Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm A, Kádas L, Hedlund K, Johansson J, Chapman M, Jacobson S, Römling U, Agerberth B, Brauner A. Uropathogenic *Escherichia coli* Modulates Immune Responses and Its Curli Fimbriae Interact with the Antimicrobial Peptide LL-37. *Journal* July 22, 2010, ppat.1001010. [Internet] 2010 [cited 13 september 2020] Available in: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001010#s3>
78. Brejil A, Riool M, Cordfunke R, Malanovic N, Boer L, Koning R, Ravensbergen E, Franken M, Heijde T, Boekema B, Kwakman P, Kamp N, Ghalbzouri A, Lohner K, Zaat S, Drijfhout J, Nibbering P. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Science Translational Medicine* 10 Jan 2018: Vol. 10, Issue 423, eaan4044. [Internet] 2018 [cited 13 september 2020] Available in: <https://stm.sciencemag.org/content/10/423/eaan4044>
79. Thennarasu S, Tan S, Penumatchu R, Shelburne C, Heyl D, Ramamoorthy A. Antimicrobial and Membrane Disrupting Activities of a Peptide Derived from the Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37. *Biophys J.* 2010 Jan 20; 98(2):

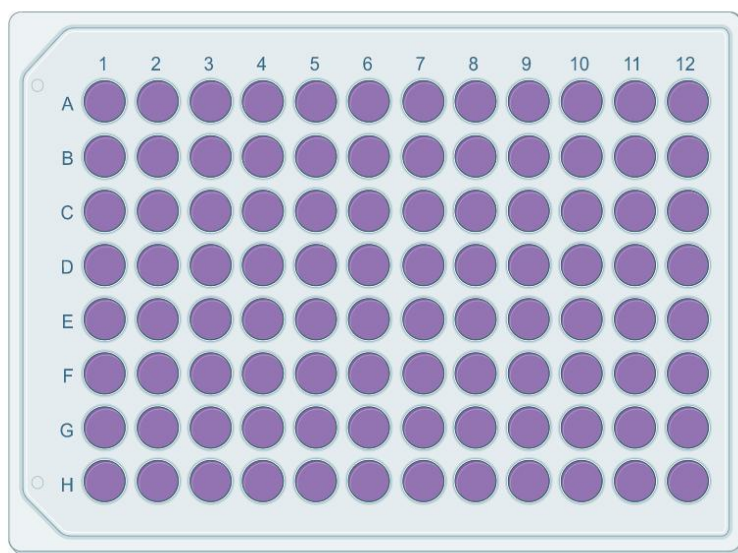
248–257. [Internet] 2010 [cited 13 september 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2808482/>

80. Mohamed M, Brezden A, Mohammad H, Chmielewski J, Seleem M. A short D-enantiomeric antimicrobial peptide with potent immunomodulatory and antibiofilm activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 6953 (2017) [Internet] 2017 [cited 13 september 2020] Available in: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07440-0#Sec2>

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo técnica Cristal violeta

- Las cepas se siembran en agar BHI durante 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación, se llevan a escala 0,5 Mcfarland (0,08-0,1 Abs) en caldo BHI.
- Se realiza la siembra de las cepas en caldo BHI +glucosa al 1% en placa de 96 pozos.
- Se recomienda montar en cada placa al menos 3 pozos con control negativo, positivo y control de esterilidad para caldo BHI y caldo BHI+Glucosa 1%.



Dilución 1/100
(198 μ L de caldo + 2 μ L de inóculo)

- La placa se incuba durante 24 horas a 37°C.

- Posteriormente el sobrenadante se descarta (1-2 golpe seco fuerte) y la placa se deja secar.
- Las bacterias adheridas se fijaron con Paraformaldehido al 4%, en cada pozo 20 μ l por 10 minutos.
- La Placa se lava tres veces con agua destilada desionizada estéril y se deja secar.
- Posteriormente se adiciona 200 μ l de Cristal violeta 0.4% a cada pozo durante 10 minutos.
- Luego la placa se lava cuatro veces con agua destilada desionizada para eliminar el exceso de colorante y se limpia la base externa de la placa con alcohol para evitar posibles interferencias con la lectura.
- A continuación la placa se deja secar a temperatura ambiente (10-30 minutos).
- Por último el colorante adherido a cada pozo fue solubilizado utilizando 200 μ L de ácido acético al 30 % en cada pozo. Cuantificado en el lector de Elisa a una longitud de onda de 570 y 420 nm.

Anexo 2: Curvas de crecimiento bacteriano cepas de bovinos y humanos

