



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS  
CORTOS DERIVADOS DEL PÉPTIDO 23688 SOBRE ALGUNOS  
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

Estudiante  
**Martha Gómez Jiménez**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Maestría en  
profundización en Microbiología

Bogotá D.C  
**Diciembre de 2020**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS  
CORTOS DERIVADOS DEL PÉPTIDO 23688 SOBRE ALGUNOS  
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

**Martha Gómez Jiménez**

Director

Gabriela Arévalo Pinzón., M.Sc. Ph.D

Docente Ocasional -Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Grupo de Biotecnología y Genética-UCMC

Coordinador Línea de Investigación Receptor-Ligando-

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

Co director

Adriana Barreto Santamaria., M.Sc

Investigador Línea de Investigación Receptor-Ligando-

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Maestría en Microbiología

Aprobado por el comité evaluador en cumplimiento de los requisitos exigidos para otorgar al título de **Magister en Microbiología de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

---

Dr.  
Jurado

---

Dra.  
Jurado

---

Dr.  
Jurado

A Dios, La Santísima Virgen María, mi Hija Jennifer Sierra y mi madre Amanda Jiménez,  
quienes con su apoyo incondicional en todo el proceso me fortalecieron en cada uno de los  
difíciles momentos de este camino

# Agradecimientos

Infinitas gracias a Dios por permitirme conocer personas de alta calidad humana, con el interés centrado en comunidad científica.

A mis asesoras, quienes son personas integrales, con el compromiso de transmitir sus aprendizajes, con todo el empeño de su juventud.

A mi familia con especial interés a mi gran hija, a quién adoro y quién ha sido testigo de mi gran esfuerzo y lucha para llegar hasta este punto de mi carrera profesional.

A mi mamá cuyas soledades se compensaban, con en el cariño que siempre me ha expresado en mi existir.

A las directivas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por permitir concluir sueños y esperanzas, por acompañarme en él nunca es tarde para recomenzar procesos de aprendizaje.

# Contenido

1.	Introducción.....	14
2.	Marco conceptual y generalidades .....	16
2.1	Definición de Antimicrobiano.....	16
2.2	Resistencia antimicrobiana (RAM).....	17
2.3	Microorganismos de importancia clínica .....	18
2.3.1	Composición de la pared y membraba de bacterias Gram positivas y Gram-negativas .....	20
2.3.3	Estructura general de <i>Candida albicans</i> .....	22
2.4	Estrategias para combatir a los microorganismos resistentes y mitigar el desarrollo de resistencia.....	23
2.4.1.	Desarrollo de políticas de prevención y buenas prácticas hospitalarias: .....	23
2.4.2.	Investigación de nuevas alternativas terapéuticas.....	25
2.5	Péptidos antimicrobianos-PAMs: Una opción con alto potencial clínico.....	27
2.5.1	Clasificación de los PAMs.....	28
2.5.2	Mecanismos de acción de los PAMs.....	31
2.5.3	Limitaciones de los PAMs y soluciones. ....	33
2.5.4	Antecedentes de los péptidos a estudiar.....	34
3.0	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo general .....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4.0	Hipótesis y pregunta de investigación .....	37
5.0	Diseño Metodológico .....	38
5.1	Selección y obtención péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688.....	38
5.2	Mantenimiento y reactivación de microorganismos ATCC.....	40
5.2.1	Mantenimiento .....	40
5.2.2	Reactivación.....	40
5.3	Comprobación de las curvas de calibración de las cepas bacterianas .....	40
5.4	Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos mediante microdilución en caldo .....	41
5.4.1	Actividad contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>E. coli</i> ATCC 25922 .....	41
5.5	Determinación colorimétrica de la CMI mediante la técnica de MTT .....	42

5.6	Determinación de la actividad antifúngica de cada uno de los péptidos.....	43
5.7	Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688 .....	43
5.8	Determinación de la actividad citotóxica de los péptidos cortos sintéticos .....	44
5.9	Cálculo del índice terapéutico (CMH/MIC).....	45
6.0	Consideraciones éticas .....	46
7.	Resultados.....	46
7.1	Obtención de péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688.....	46
7.2	El péptido 41781 tiene características antimicrobianas similares al péptido original 23688.....	48
7.3	El péptido 41781 presentó actividad bactericida a la CMI .....	50
7.4	Ninguno de los péptidos evaluados presenta actividad anti-fúngica contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	50
7.5	El péptido 41781 redujo significativamente la actividad hemolítica respecto al péptido original. ....	51
7.6	Ninguno de los péptidos evaluados es citotóxico a la concentración mínima inhibitoria. ....	52
8.	Discusión .....	54
	Conclusiones.....	60
	Perspectivas .....	61
	Referencias .....	62

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Arquitectura de la pared bacteriana.....	21
<b>Figura 2.</b>	Arquitectura de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	23
<b>Figura 3.</b>	Distintas vistas de la estructura $\alpha$ -hélice..	29
<b>Figura 4.</b>	Representación esquemática de secuencias peptídicas en la rueda helicoidal.	30
<b>Figura 5.</b>	Clasificación de los PAMs según su estructura.....	31
<b>Figura 6.</b>	Mecanismos de acción de los PAMs..	32
<b>Figura 7.</b>	Representación de la rueda helicoidal, estructura secundaria y momento hidrofóbico del péptido 23688 y sus derivados..	48
<b>Figura 8.</b>	Actividad hemolítica del péptido 23688 y sus derivados cortos..	51
<b>Figura 9.</b>	Selección del número óptimo de células para el ensayo de citotoxicidad.....	53
<b>Figura 10.</b>	Citotoxicidad de los péptidos 23688 y 41781 frente a células Vero.....	54



## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales microorganismos clasificados como patógenos prioritarios por la OMS.....	19
<b>Tabla 2.</b> Péptidos cortos derivados de la secuencia del PAM 23688. Se muestra la secuencia y longitud de los péptidos en estudio. ....	39
<b>Tabla 3.</b> Características fisicoquímicas de los péptidos cortos derivados del 23688.....	47
<b>Tabla 4.</b> Actividad antimicrobiana del péptido 23688 y sus derivados contra la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	49
<b>Tabla 5.</b> Actividad antimicrobiana del péptido 23688 y sus derivados cortos contra la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	49
<b>Tabla 6.</b> Actividad antifúngica del péptido 23688 y sus derivados cortos contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	50
<b>Tabla 7.</b> Actividad hemolítica de los péptidos 23688 y sus derivados cortos.....	52

# Lista de símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\mu\text{L}$	Microlitros	$10^{-6}$ L	Volumen
$\mu\text{M}$	Micro molar	$10^{-6}$ molar.	Peso

## Abreviaturas

	Definición
AWARE Access, Watch and Reserve	Access, Watch and Reserve
$\mu\text{M}$	Micro molar
BLEE	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido CMH
CMB	Concentración mínima bactericida
CMH	Concentración Mínima Hemolítica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DDD	Dosis Diaria Media
DPA	Base de datos de péptidos antimicrobianos
ESAC-Net	European surveillace of antimicrobial Consumption network consumtion
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y agricultura
FDA	Food and Drug Administration
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IQVIA	Industria Multinacional estadounidense, que presta servicios de tecnología en salud e investigación Clínica
MDR	Multidrogo Resistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente

MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OIE	Organización mundial de sanidad animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la salud
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PBP	Penicilin binding Protein
RAM	Resistencia Antimicrobiana
RPPs	Proteínas de Protección Ribosomal
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
XDR	Extremadamente Resistente

# Resumen

## Introducción

El incremento de la resistencia antimicrobiana ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Dentro de las estrategias investigadas, se encuentra el estudio sobre pequeñas moléculas proteicas denominadas péptidos antimicrobianos (PAMs). Pese a su gran relevancia, algunos de ellos además de su actividad sobre microorganismos han presentado actividad sobre células humanas, por lo que distintas estrategias han sido aplicadas sobre estas secuencias para mejorar su selectividad. Recientes estudios, han mostrado que el péptido 23688 tiene actividad contra *Escherichia coli*, pero presenta actividad citotóxica.

## Metodología

Mediante análisis bioinformático se seleccionaron tres péptidos cortos derivados del 23688 y se evaluó su actividad antibacteriana y antifúngica mediante microdilución en caldo. La actividad citotóxica de estos péptidos se evaluó frente a eritrocitos y células epiteliales.

## Resultados

El análisis bioinformático muestra que los péptidos derivados presentan características fisicoquímicas y estructurales similares a las del péptido 23688. Sin embargo, el péptido 41781 fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *E. coli* a la misma concentración mínima inhibitoria (CMI) del 23688 pero con una actividad bactericida superior. Así mismo, el péptido 41781 fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* contrario a lo observado para los demás péptidos y no presentó actividad hemolítica y citotóxica a la CMI. Ninguno de los péptidos fue activo frente a *Candida albicans*.

## Conclusiones

De los péptidos evaluados, solo el péptido 41781 de 16 aminoácidos mostró tener una actividad selectiva por bacterias, destacando su utilidad para el desarrollo de terapias antimicrobianas.

# Abstract

## Introduction

The increase in antimicrobial resistance has forced the search for new therapeutic options, being the study of anti-microbial peptides (AMPs) one of them. Despite their high ability to destroy pathogens, some AMPs also display toxicity towards human cells, so different strategies are being used to improve their selectivity. Recent studies have shown that peptide 23688 shows a good antimicrobial activity against *Escherichia coli*, but also displays a cytotoxic effect against human cells.

## Methodology

Three short peptides derived from peptide 23688 were selected by bioinformatics analysis. Their antimicrobial and antifungal activity was assessed in broth microdilution assays. Cytotoxic activity against erythrocytes and epithelial cells was also determined.

## Results

23688-derived peptides displayed similar physicochemical and structural characteristics regarding the parental peptide. However, peptide 41781 displayed a similar minimum inhibitory concentration (MIC) against *E. coli* but with a higher bactericidal effect. Likewise, it displayed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, as opposed to other peptides here tested. No hemolytic or cytotoxic effect was observed for peptide 41781 at the MIC assessed. None of the peptides tested had any effect against *Candida albicans*.

## Conclusions

Only the 16-mer peptide 41781 displayed a high antibacterial selectivity among the peptides tested, highlighting its potential role in developing novel antimicrobial therapies.

# 1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) es uno de los principales retos que se afrontan actualmente para tratar enfermedades infecciosas en el mundo. En el ámbito clínico, los antibióticos son la principal herramienta terapéutica para combatir microorganismos infecciosos (Pérez López, 2020). Desde su aparición la efectividad de estos agentes describe grandes hazañas, pero el uso irracional ha desencadenado la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes. Si bien, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno evolutivo natural que puede ser acelerado por factores epidemiológicos y biológicos, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha intensificado su desarrollo (Laura Cati, 2019). Como consecuencia, se ha generado un problema de profundas dimensiones que ha sido reconocido como una de las mayores amenazas para la salud humana y para los sistemas de salud en el manejo de las enfermedades infecciosas.

Frente a esta problemática, se han propuesto diversas estrategias de contención que involucran principalmente el desarrollo de políticas para controlar la distribución y uso de antibióticos y la prioridad en la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Dentro de éstos nuevos agentes, cabe resaltar el desarrollo de unas moléculas denominadas péptidos antimicrobianos (PAM)s, moléculas que han mostrado acciones rápidas sobre microorganismos, distintos blancos y mecanismos de acción diferentes a los mecanismos clásicos de los antimicrobianos convencionales (Arredondo, 2000) (González García, 2017) (B. Rivas-Santiago, E. Sada, R. Hernández-Pando, & V. Tsutsumi, 2006a).

Los PAMs de origen natural son considerados la primera línea de defensa inmunológica y se sintetizan en piel, mucosas de vías aéreas y digestivas encargadas de establecer barreras de protección para la instauración de infecciones (Rivera, Ramos, & Desgarenes, 2007). Los PAMs naturales han mostrado un importante potencial para combatir microorganismos resistentes a los antimicrobianos disponibles, pero también presentan algunas limitaciones como su baja selectividad, disminuida estabilidad y altos costos de manufactura. Por esto, la obtención de PAMs sintéticos, diseñados a partir de

secuencias naturales o diseño *de novo* representan una nueva generación de moléculas con alta versatilidad de estudio a nivel de laboratorio.

En este contexto, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC, desde hace varios años se encuentra trabajando en la identificación y diseño de nuevos PAMs a partir de una amplia biblioteca de péptidos sintéticos (Barreto-Santamaría et al., 2016; Barreto-Santamaria, Patarroyo, & Curtidor, 2019; Barreto-Santamaría et al., 2020). Dentro de estos estudios, se encontró que una secuencia de 17 residuos de longitud denominado 23688 fue activo contra bacterias *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ML-35 a una concentración mínima inhibitoria de 22 y 44  $\mu$ M respectivamente, pero con más de un 1% de hemólisis a las mismas concentraciones que inhibe las bacterias (Muñoz Camargo, 2017).

En busca de secuencias con elevada selectividad sobre microorganismos de importancia clínica y dando respuesta a la urgente necesidad de crear nuevos agentes antimicrobianos, en este trabajo se tomó como plantilla la secuencia del péptido 23688 para el diseño de nuevos péptidos. Diferentes estudios han propuesto estrategias para el mejoramiento de la selectividad de los PAMs, donde la reducción del tamaño del péptido resulta ser una alternativa sencilla, de bajo costo y con buenos resultados (Kim, Jang, Kim, & Cho, 2014) (Matsuzaki, 2009) (M. G. García et al., 2017). Con este propósito en mente, se seleccionaron tres péptidos cortos (16-14 residuos) y se evaluó, de cada uno, su capacidad inhibitoria (sobre *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*), hemolítica (glóbulos rojos humanos) y citotóxica (células Vero). En general, un nuevo péptido denominado 41781 mostró una mejor actividad bactericida que el péptido original, así como actividad contra *S. aureus*. Los datos de citotoxicidad mostraron que el péptido 41781 no fue hemolítico a la CMI evaluada, concluyendo una mejoría de su selectividad con un IT de 8 respecto al IT del péptido original con valor de 1. Estos datos destacan la secuencia del péptido 41781 como prometedora para avanzar en estudios con nanopartículas que incrementen su actividad antimicrobiana y estudios en infecciones inducidas en un modelo animal.

## 2. Marco conceptual y Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que las enfermedades infecciosas han sido y continúan siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo, convirtiéndose en un desafío epidemiológico de Salud Pública (Murray & Lopez, 1997). En el ámbito clínico las sustancias denominadas antimicrobianos son las moléculas de elección para combatir las infecciones. Estos antimicrobianos aparecen en el año 1900 con un auge hasta el año 2000, a partir de este año se observó un cese abrupto en la aprobación de nuevos antimicrobianos por la FDA, una de las causas de esta reducción de nuevos agentes antimicrobianos es que se han hecho poco rentables por la rápida aparición de resistencia antimicrobiana (Karp et al., 2017). Según el tipo de agente que atacan se han denominado como antibióticos, antimicóticos, antivirales y antiparasitarios (Diseases, 2010).

### 2.1 Definición de Antimicrobiano

Los antimicrobianos forman parte de los fármacos más comúnmente prescritos en el mundo. Son sustancias químicas de origen natural, semisintética o sintética que en concentraciones *in vivo*, eliminan o inhiben el crecimiento de diferentes microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos, al interactuar con un blanco específico (López-Pueyo, Barcenilla-Gaite, Amaya-Villar, & Garnacho-Montero, 2011).

Los antimicrobianos se pueden clasificar como de amplio espectro, cuando su actividad se extiende a un gran número de especies (Díaz-Ramírez et al., 2018), como los carbapenémicos, amoxicilina, piperacilina-tazobactam, entre otros (Fernández-Cuenca et al., 2019); o de espectro reducido, cuando solo presentan actividad sobre un pequeño grupo de especies como las cefalosporinas de primera generación, cuya actividad se refleja especialmente sobre los *Staphylococcus* resistentes a penicilina y sensibles a meticilina (Rodríguez-Riera, Tolón-Murguía, & López-López, 2013). Dependiendo del agente sobre el que actúan reciben distintas connotaciones, particularmente sobre bacterias reciben el



nombre de antibióticos (Mirabal Nápoles, Rodríguez Sánchez, Guerrero Ramírez, & Álvarez Muñoz). De acuerdo con su actividad pueden ser bactericidas o bacteriostáticos; los bactericidas causan la muerte bacteriana, mientras que los bacteriostáticos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, procesos que el microorganismo recupera al retirar el antimicrobiano (Seija & Vignoli, 2006).

## **2.2 Resistencia antimicrobiana (RAM)**

Aunque contamos con diferentes avances científicos que han revolucionado la forma de ver y comprender el mundo antimicrobiano, se han observado nuevas problemáticas, como la aparición de patógenos extremadamente resistentes a los antimicrobianos (Shehata, El-Ghattas, Kamel, Aly, & Hassan, 2012). En la supervivencia de los microorganismos se pueden observar diferentes mecanismos que se diseminan entre las poblaciones para su evolución, convirtiéndose en uno de los retos de la salud pública durante la última década (Chávez-Jacobo, 2020).

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como “la capacidad de un microorganismo de multiplicarse o sobrevivir, en presencia de un agente antimicrobiano” (Mitchell et al., 2020). La RAM ha surgido por la aparición de diferentes mecanismos de transformación de un microorganismo, donde las vías de adquisición de la resistencia se generan mediante mutaciones en el cromosoma o por el intercambio de genes de resistencia (Quiñones Pérez, 2017). Existen dos tipos de resistencia, la resistencia natural y la adquirida (Barbosa-Rengifo, Morales-Plaza, Amézquita-Abello, & Martínez-Buitrago, 2016).

La resistencia natural a los antimicrobianos, se define como una característica de selección natural a través de mecanismos al azar, propios de cada familia, donde logran proliferar los microorganismos que presentan este atributo que anula la acción del antimicrobiano (Calderón Rojas & Aguilar Ulate, 2017). Además, existe una resistencia natural o intrínseca en aquellas bacterias como el *Mycoplasma* que carecen de pared y por lo tanto no tienen un receptor para los betalactámicos (Angles, 2018). En la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de

antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas, pudiendo sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Mora & Fabián, 2019) (Celis Bustos, Rubio, & Camacho Navarro, 2017).

Por su parte, la resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN, este tipo de resistencia constituye en la actualidad un problema, se detecta con pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos, los cuales se atribuyen a cambios cromosómicos y mecanismos de transmisión de material genético extracromosómico (plásmidos, transposones o integrones). Como resultado el microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible (Fernández Riverón, López Hernández, Ponce Martínez, & Machado Betarte, 2003).

### **2.3 Microorganismos de importancia clínica**

A nivel mundial las organizaciones médicas como la OMS, han expresado grandes preocupaciones sobre el estado actual de la salud humana debido al incremento y aparición de nuevas resistencias antimicrobianas (Causse, de Luna, García-Mayorgas, Rodríguez, & Casal, 2006). En enero del 2013 el informe de Control y Prevención de Enfermedades reportó que más del 90% de las cepas de *S. aureus* en el Reino Unido y EE. UU presentaban resistencia a la penicilina, mientras que, en algunas comunidades, más del 50% de las cepas eran meticilino-resistentes (MRSA) (Huttner et al., 2013).

La OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han evidenciado que la RAM ha repercutido negativamente en la eficacia de los tratamientos de diferentes patologías infecciosas y en la contención de bacterias multi-resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), lo cual tiene un impacto directo sobre la mortalidad, estancia hospitalaria, propagación de la infección y costos asociados (Bassetti, Merelli, Temperoni, Astilean, & antimicrobials, 2013). A partir de este problema se ha mencionado la urgente necesidad de aplicar estrategias para combatir microorganismos de importancia clínica. Se estima que para el año 2050 se generarán más muertes a causa microorganismos resistentes que por diabetes, cáncer u otras patologías. En consecuencia y con el fin incentivar el desarrollo de alternativas para mitigar la RAM, la OMS publicó una lista en la que se enumeran los patógenos prioritarios en investigación y desarrollo de nuevos agentes.

En esta lista los microorganismos son clasificados según sus niveles de resistencia antimicrobiana en prioridad crítica, elevada o intermedia como se muestra en la tabla 1 (Lawe Davies & Bennet; Rello et al., 2019).

**Tabla 1.** Principales microorganismos clasificados como patógenos prioritarios por la OMS.

<b>Prioridad crítica:</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a los Carbapenemicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a los Carbapenemicos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistentes a los Carbapenemicos, productoras de ESBL
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	XDR
<b>Prioridad elevada:</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente a la claritromicina
<i>Campylobacter spp</i>	Resistente a las fluoroquinolonas
<i>Salmonella sp</i>	Resistentes a las fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
<b>Prioridad media:</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	sin sensibilidad a la penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a la ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Resistente a las fluoroquinolonas

En Colombia, según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), en el periodo entre 2012 y 2014 la resistencia bacteriana en unidades de cuidados intensivos se incrementó, alcanzando 26.3 % para *E. coli* frente a cefalosporinas de tercera generación, 14,6 % para *Klebsiella pneumoniae* frente a ertapenem, 38.8 % para *Pseudomonas aeruginosa* y más de 50% para *Acinetobacter baumannii* frente a carbapenemicos (Porrás Díaz & Salgado García, 2017). Estos resultados fueron respaldados por un estudio descriptivo de la Red de Vigilancia de Eventos Nosocomiales del Valle (RENOVA) con muestras tomadas en clínicas y hospitales de Cali, donde se observó una alta prevalencia de resistencia a los antimicrobianos en aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. aureus* (Buitrago et al., 2014).

También se ha evidenciado una creciente tasa de mortalidad por infecciones fúngicas causadas por *Candida* y *Aspergillus* (Lanternier et al., 2009). Las candidiasis son responsables del 90% de micosis invasoras a nivel mundial y cursan con sintomatologías que varían desde mínimas hasta sepsis fulminantes. Se encuentra alta prevalencia de *C. albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicales* y *Candida krusei* dependiendo de la región geográfica (Bastidaa, Valverdeb, Smithsonb, & Marcoc). Las infecciones por levaduras del género *Candida sp* afectan principalmente a pacientes hospitalizados que se encuentran inmunocomprometidos como pacientes en quimioterapia, con neoplasias hematológicas o en cuidados intensivos (Bassetti et al., 2013). Es así como el desarrollo de resistencia en *Candida* representa un reto importante a nivel terapéutico (Guirao Abad, 2016). Los tratamientos más utilizados contra estas levaduras son las equinocandinas y los azoles. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los diferentes antifúngicos ha dificultado mucho un tratamiento oportuno, aún más, cuando se observa el reducido número antifúngicos disponibles (P. N. Rodríguez, 2019).

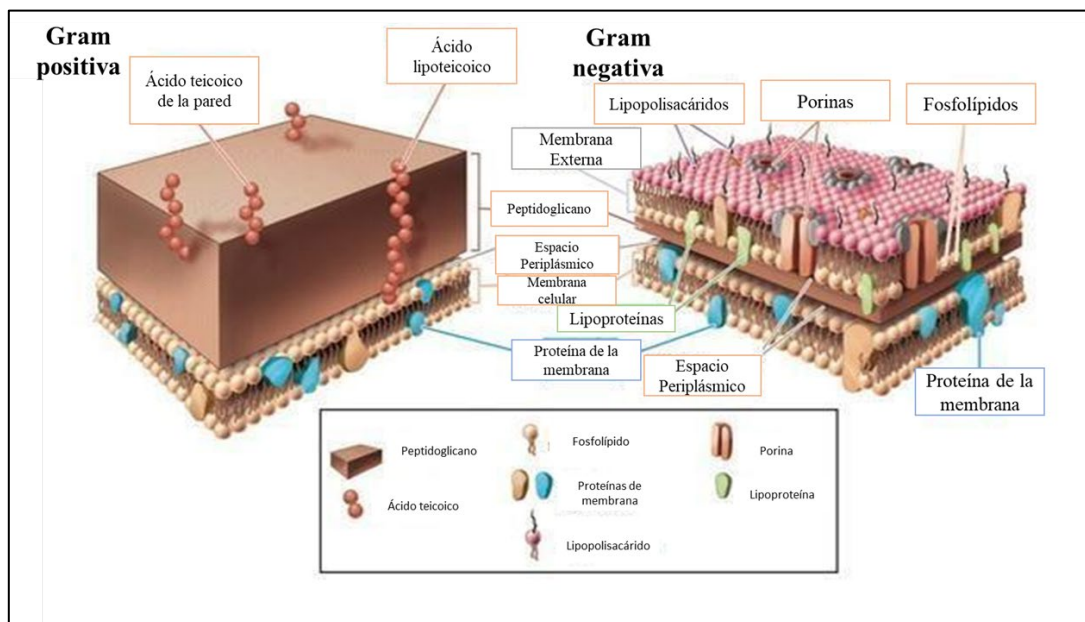
Así, los microorganismos que han generado mayor alerta debido a su resistencia frente a los antimicrobianos son en su mayoría bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos principalmente por *Candida* (Rondón Pérez, 2013) (Cubas Alberca & Huaripata Vásquez, 2019).

### **2.3.1 Composición de la pared y membraba de bacterias Gram positivas y Gram-negativas**

Las bacterias Gram positivas se componen estructuralmente por una pared celular de polímero (peptidoglicano o mureína) con un grosor de 0.02 a 0.06  $\mu\text{m}$ , cuya estructura se compone de dos aminoazúcares: la N- acetil glucosamina y el N-acetil murámico, que se encuentran unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, apilados en forma de capas múltiples (Pérez & Mota, 2006) (Figura 1). La pared bacteriana está además decorada por ácidos teicoicos, ácidos teucorónicos, ácidos lipoteicoicos, lipoglicanos y modificaciones polisacáridas. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos son polímeros aniónicos que poseen diferentes estructuras químicas en todas las bacterias Gram-positivas (excepto *Streptococcus pneumoniae*) que le confiere una carga negativa a la pared celular. Los ácidos teicoicos se pueden unir al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática (ácidos lipoteicoicos),

enlazando de esta forma el peptidoglicano a la membrana citoplasmática. En general, estos ácidos forman parte de los factores de virulencia de este tipo de microorganismos, debido a que actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos sobre las células del hospedero (Berdize, Eiró, González, Juan, & Vizoso, 2015) (Lucana Nina & Huanca Espinoza, 2014).

Por su parte, las bacterias Gram negativas tienen una envoltura celular trilaminar conformada por la membrana plasmática, el espacio periplásmico (que incluye una fina capa de peptidoglicano de 0.01  $\mu\text{m}$ ) y la membrana externa que contiene fosfolípidos y proteínas, que la unen al peptidoglicano. Esta membrana externa es una bicapa lipídica anfipática que contiene lipopolisacárido (LPS), una endotoxina constituida por tres partes: el lípido A, el polisacárido central o core y la cadena lateral O, el cual por su variabilidad se utiliza para la clasificación serológica de las bacterias (Vargas-Flores & Kuno-Vargas, 2015).



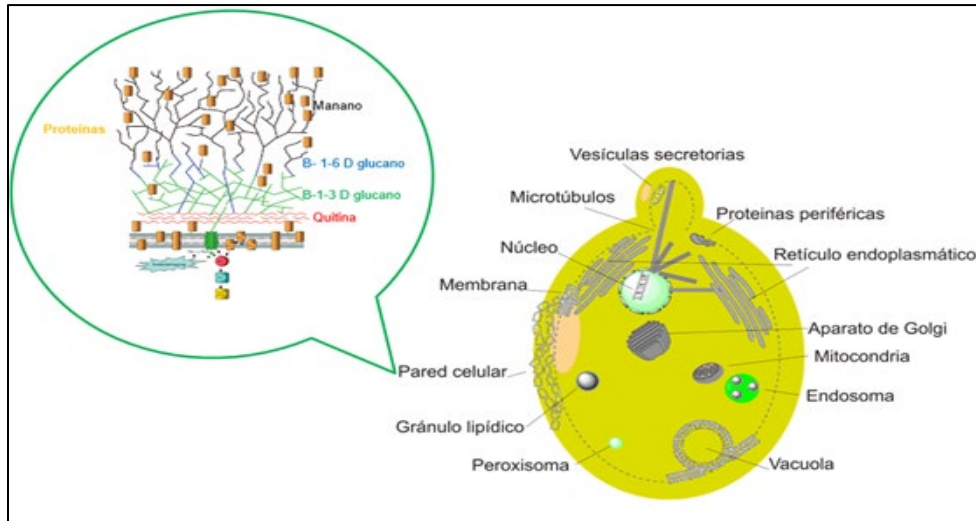
**Figura 1.** *Arquitectura de la pared bacteriana. Las bacterias Gram positivas contienen una placa gruesa de peptidoglicano de 0.02 a 0.06  $\mu\text{m}$ , ácidos lipoteicoicos. Por su parte, las bacterias Gram negativas contienen una fina capa de peptidoglicano de 0.01  $\mu\text{m}$  íntimamente unido las membranas internas, externa y las porinas (Cowan, 2018).*

Una de las funciones más importantes de la membrana externa es servir como barrera protectora, evitando o disminuyendo, la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar la bacteria y prevenir la pérdida de

constituyentes como las enzimas periplásmicas. La membrana externa es más permeable que la plasmática y permite el pasaje de pequeñas moléculas como glucosa y otros monosacáridos (Tafur, Torres, & Villegas, 2011). En esta membrana también hay porinas, proteínas integrales o transmembranales, que forman canales estrechos por los cuales pasan moléculas menores de 600 a 700 Dalton (Reyes, Saad, Galicia, Herrera, & Jiménez, 2009).

### **2.3.3 Estructura general de *Candida albicans***

La *C. albicans* es un hongo dimórfico oportunista altamente infecciosos y con la habilidad de infectar tejido queratinizado y de causar infecciones superficiales o sistémicas. Sus factores de virulencia le confieren la capacidad de adherencia al hospedero, y la secreción de enzimas degradativas le permite la formación de biopelículas (N. D. L. C. Rodríguez & Santa Vélez, 2012). A diferencia de las bacterias, la estructura fúngica de la *C. albicans* está dada por una célula eucariota, cuya envoltura está conformada por quitina, glucano y manano o galactomanano. El  $\beta$ -1,6 D-glucano juega un papel esencial en la organización estructural de la pared celular interconectando el  $\beta$ -1,3 D-glucano y la quitina. Por su parte, las proteínas generalmente se asocian a polisacáridos formando glicoproteínas dando origen a una estructura rígida (Figura 2).



**Figura 2.** *Arquitectura de la pared celular de C. albicans. La C. albicans es una célula eucariota con una pared celular compleja donde se muestra la quitina (rojo), el  $\beta$ -1,3D-glucano (verde), manano (marrón) y el  $\beta$ -1,6-D-glucano (azul) (Pontón, 2008).*

## 2.4 Estrategias para combatir a los microorganismos resistentes y mitigar el desarrollo de resistencia

En respuesta a la grave problemática mundial de la RAM, se han explorado diversas estrategias para combatir microorganismos resistentes y para mitigar el desarrollo y diseminación de esa resistencia. Esta problemática ha sido abordada desde dos frentes: por un lado, el desarrollo de estrategias de prevención y buenas prácticas hospitalarias; y, por otro lado, la investigación y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Quiñones Pérez, 2017).

### 2.4.1. Desarrollo de políticas de prevención y buenas prácticas hospitalarias:

#### 2.4.1.1. Control del uso de los antimicrobianos:

Actualmente distintas Organizaciones como la OMS han establecido lineamientos de vigilancia y control de uso de los antimicrobianos a través de sistemas como la clasificación ATCC (Clasificación Química Terapéutica Anatómica) y la unidad de medida técnica para el control de dosis de antimicrobianos (dosis diaria definida o DDD) (Romero-Prada, Marrugo-Figueroa, Acero, Arango-Bautista, & Alvis-Guzmán, 2014). Todo esto, con el fin de estandarizar las metodologías de medición, vigilancia y reporte del consumo de antimicrobianos a nivel mundial. De esta misma forma, en Colombia, el Gobierno Nacional

ha generado políticas de prevención, vigilancia epidemiológica y control de infecciones intrahospitalarias a través de la Secretaría de Salud de Bogotá y del Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA). Estas políticas están enfocadas al uso prudente de antibióticos, la vigilancia de la resistencia antimicrobiana y la prohibición de la venta de antibióticos sin fórmula médica u odontológica (Cortés, Álvarez, & Leal Al, 2004).

#### **2.4.1.2. Identificación de conductas y campañas educativas:**

Las entidades gubernamentales han sido enfáticas en la importancia de identificar conductas asociadas a la propagación y diseminación de la resistencia antimicrobiana con el fin de establecer estrategias para cambiar dichas conductas. Algunas de las conductas más frecuentes se relacionan con el mal uso de los antibióticos entre las que se incluye: la administración sin indicación médica, el uso de antibióticos como tratamiento para infecciones víricas, la disminución en la calidad de medicamentos para reducir su costo, las prescripciones erróneas, la práctica de algunos pacientes de compartir tratamiento, o las deficiencias de la prevención y el control de las infecciones (Laura Cati, 2019).

Para reducir estas conductas, la OMS, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la ACIN (Asociación Colombiana de Infectología), entre otras organizaciones, realizan alianzas para educar a la población general sobre el uso adecuado de los antibióticos, el control sobre manejo de estos antimicrobianos, y la concientización y capacitación en clínicas y hospitales (Correa Armijos, 2019).

#### **2.4.1.3. Modificación de sistemas de cría y producción animal:**

La contaminación ambiental que se genera por el inadecuado uso de los antibióticos en la ganadería, la acuicultura, la avicultura, los cultivos agrícolas, la cadena alimentaria y los seres humanos ponen en riesgo al ecosistema en general. Según la FAO el riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica el uso de antibióticos en animales está dado por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales (Food, 2016). Mediante estrategias de información, educación y entrenamiento, se desea aminorar el uso de antibióticos en este sector.



### **2.4.2. Investigación de nuevas alternativas terapéuticas**

A nivel mundial existe una preocupación por la rápida aceleración de la RAM y el bajo desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Debido a esto, distintas instituciones como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), colabora con investigadores académicos para identificar alternativas de tratamiento y prevención. Sin embargo, se necesita más innovación e investigación para identificar, desarrollar y evaluar nuevas terapias para tratar infecciones (Aldama, 2019). En la actualidad, las entidades gubernamentales comprenden, que el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para combatir infecciones microbianas es una necesidad. Esto ha llevado establecer políticas enfocadas al desarrollo de nuevas metodologías para el control de infecciones y al apoyo a la investigación y desarrollo de nuevas moléculas, debido al decaimiento en el desarrollo de nuevos antibióticos en las dos últimas décadas y a la escasez de alternativas terapéuticas (Dreser, Wirtz, Corbett, & Echániz, 2008). En consecuencia, los avances en biotecnología farmacéutica han exigido la regulación en los aspectos técnicos para la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos (Romero-Prada et al., 2014).

Actualmente diversos tipos de moléculas se encuentran en investigación y desarrollo para combatir microorganismos resistentes. Entre las estrategias más representativas se encuentra la investigación de metabolitos de plantas medicinales (Yáñez & Velasteguí, 2014), donde algunos de ellos ejercen actividad anticancerígena, antioxidante, inmunoestimulante, antivírica, bactericida y fúngica (Vélez, Jaramillo-Jaramillo, & Vélez, 2018). (Sanchez Perez, 2019). Por otro lado, las vacunas (Terzolo et al., 1993) (Serrano Machuca et al., 2009), el desarrollo de anticuerpos monoclonales (Merino & Gruppi, 2006) (Lozada-Requena & Núñez Ponce, 2020) y el uso de bacteriófagos (E. García & López, 2002) (Segundo-Arizmendi, Hernández-Baltazar, Villegas, & Torres-Angeles, 2015), han adquirido gran importancia para combatir microorganismos resistentes.

De forma interesante, el trasplante de microbiota fecal ha sido una opción terapéutica para reestablecer la microbiota intestinal y protegerse de la invasión de microorganismos resistentes, sin embargo se han encontrado algunos efectos adversos (Rodríguez de Santiago, García García de Paredes, Ferre Aracil, Aguilera Castro, & López San Román, 2015). La

promoción del uso de prebióticos, probióticos y simbióticos, para el restablecimiento de la flora intestinal (Molina Garcés, 2020) ha sido también de utilidad. Los prebióticos son ingredientes de la dieta que originan cambios que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino y los simbióticos combinan en sus formulaciones la unión de prebióticos y probióticos, lo que permite aprovechar más los beneficios de esa unión (Martínez-González & Andreo-Martínez, 2020).

Las nanopartículas por su parte, se han identificado como un nuevo enfoque para abordar este problema debido a su capacidad inherente de actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (de Juan Martín, 2020; Santos, Anzola, Forero, & Forero, 2020). Por ejemplo, se encontró que las nanopartículas de Oxido de Zinc inhiben *S. aureus* mientras que las nanopartículas de plata exhiben actividad antimicrobiana dependiente de la concentración contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Ramalingam, Parandhaman, & Das, 2016). Sin embargo, los mecanismos antibacterianos detallados de las nanopartículas no se han explicado a fondo, y los mismos tipos de nanopartícula a menudo presentan efectos distintos.

Por último los péptidos antimicrobianos-PAMs aparecen como una importante y versátil alternativa para combatir infecciones causadas por microorganismos multirresistentes (Romero García, 2018). Se han evaluado PAMs naturales y sintéticos como posibles agentes terapéuticos de nueva generación. Poseen múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y un bajo potencial para generar resistencia (López-Amor, 2016).

Actualmente, el uso de terapias combinadas, en las cuales confluyen diferentes metodologías han sido exploradas en distintos trabajos de investigación. Ejemplos de terapias combinadas son: la fusión de PAMs y nanopartículas magnéticas o biodegradables, donde se puede combinar las mejores propiedades de ambos, generando partículas antimicrobianas con mejor actividad, o la combinación sinérgica PAM-antibiótico, donde los PAMs realizan la disrupción de la membrana y facilitan la entrada y acción del

antibiótico tradicional (la Fuente-Salcido, Margarita, Villarreal-Prieto, Díaz León, & García Pérez, 2015).

## **2.5 Péptidos antimicrobianos-PAMs: Una opción con alto potencial clínico.**

Los PAMs fueron descritos por primera vez como parte de la defensa natural del hospedero. Ellos existen en distintos microorganismos como bacterias, hongos, animales y plantas. Estos PAMs son expresados por genes específicos del genoma y pueden ser constitutivos o inducidos por factores externos específicos (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006) (Del Cerro, 2015). Una vez son producidos, estos péptidos son almacenados en las células como pro-péptidos o péptidos maduros. El aislamiento de estas moléculas ha evidenciado su potencial terapéutico, pero también presentan algunas debilidades, como la baja estabilidad frente a enzimas y la baja selectividad sobre membranas celulares (Huerta-Cantillo & Navarro-García, 2016). Por ello, diversos estudios están enfocados a mejorar la selectividad y estabilidad de los PAMs, algunos mediante diversas modificaciones químicas, como: acortamiento o alargamiento de las moléculas, racemización (enánmeros) y sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones de la molécula (M. G. García, Galán, & Vicente, 2017). Gracias a estas modificaciones, algunos PAMs sintéticos ya han sido aprobados por la FDA y otros se encuentran en evaluación de la fase clínica (Giménez-Forcada & Delgado, 2020).

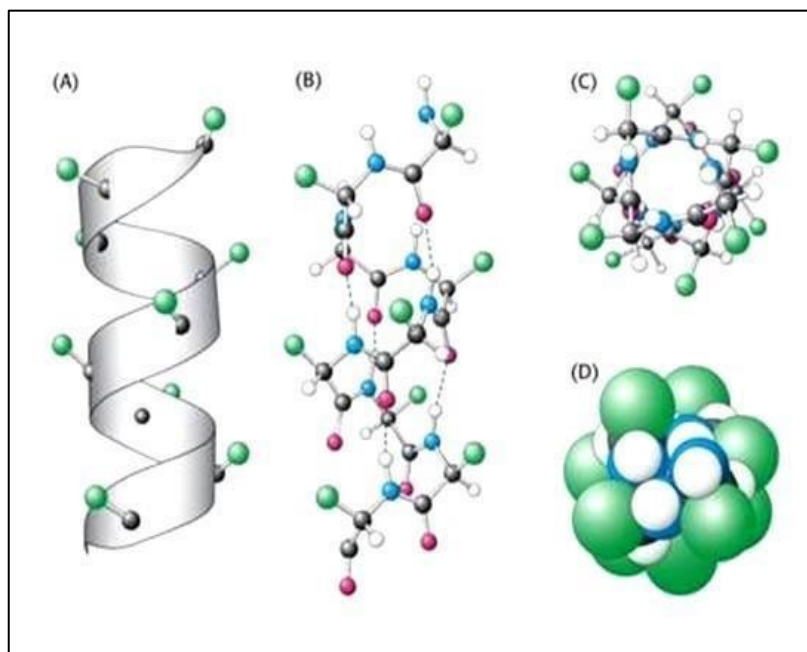
A pesar de su extremada diversidad en términos de longitud y composición, la mayoría de los PAMs son polipéptidos cortos (<50 residuos), en su mayoría catiónicos, con una carga neta de aproximadamente +3 y un contenido hidrofóbico superior al 42% (Mishra, Reiling, Zarena, & Wang, 2017). Estas dos últimas características (carga neta e hidrofobicidad) están directamente influenciando la capacidad anfipática de los PAMs. La anfipaticidad le confiere al AMP su flexibilidad conformacional, así como atracción electrostática entre estos PAMs catiónicos y las membranas aniónicas de los microorganismos (Kosikowska & Lesner, 2016).

### 2.5.1 Clasificación de los PAMs

Los PAMs se pueden agrupar de acuerdo con su fuente, actividad, características estructurales y de acuerdo con la presencia de un aminoácido en abundancia. Estructuralmente se pueden clasificar en cuatro grupos principales:

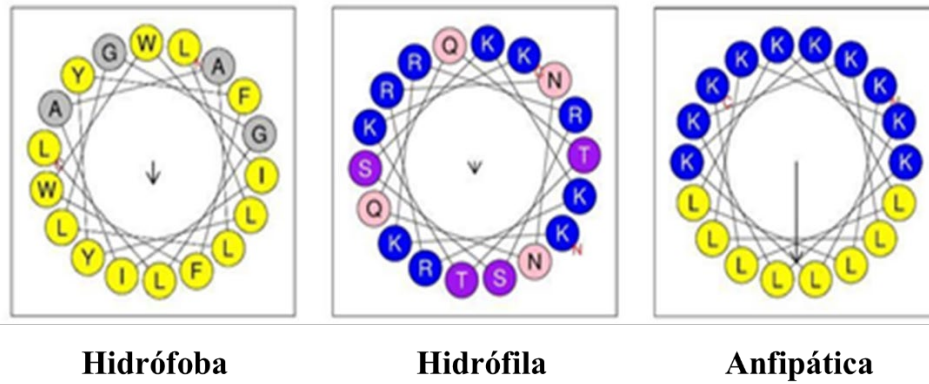
- a) **Hélices alfa:** Una hélice  $\alpha$  se forma cuando el péptido se enrolla sobre sí mismo mediante puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo  $\text{COO}^-$  del enlace peptídico del primer residuo ( $n$ ) y el grupo amino  $\text{NH}_3$  del enlace peptídico del quinto residuo ( $n+4$ ). De esta manera, las hélices  $\alpha$  completan una vuelta alrededor de su eje cada 3,6 aminoácidos (Fonte-Carballo et al., 2019) (Figura 3 y 5a). La mayoría de PAMs tienden a adquirir esta característica estructural, como por ejemplo las magaininas, las cuales son PAMs activos contra un amplio espectro de agentes microbianos. Estas han sido uno de los primeros PAMs ensayados clínicamente. Otro ejemplo es el péptido LL-37 el cual es un miembro de las catelicidinas obtenidas de los extractos de gránulos de neutrófilos bovinos

(Xhindoli et al., 2016) y las cecropinas un tipo de PAMs activo contra bacterias Gram-negativas y/o bacterias Gram-positivas.



**Figura 3.** Distintas vistas de la estructura  $\alpha$ -hélice. (A) Representación cinta de ribbons, se observan los radicales expuestos hacia el exterior de la cadena, (B) estructura molecular donde se evidencian los puentes de hidrogeno que permiten la formación de la hélice, (C) vista superior, (D) modelo del espacio relleno (Gopalakrishnan, Chakraborty, & Mahapatra, 2007).

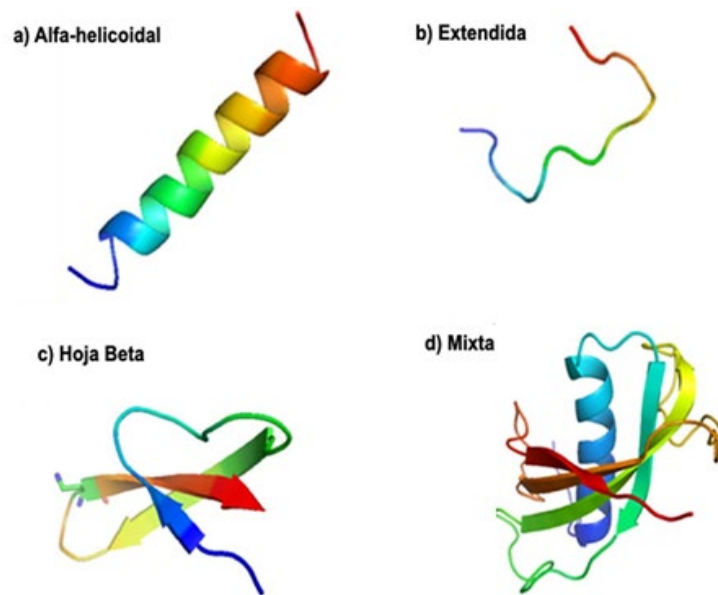
El esquema de la rueda helicoidal es una representación útil para determinar las posibles interacciones de un PAM  $\alpha$ -helical con otras moléculas. Una hélice  $\alpha$ , se pueden catalogar hidrófoba si está constituida por residuos apolares, hidrófila cuando los residuos son polares y anfipática cuando los residuos polares se agrupan en una cara y los apolares en otra (Figura 4) (Gopalakrishnan et al., 2007); (Rivas-Santiago et al., 2006a).



**Figura 4.** Representación esquemática de secuencias peptídicas en la rueda helicoidal. La proyección fue obtenida con el programa HeliQuest, donde se muestra la representación de una hélice hidrófoba, una hélice hidrófila y una hélice anfipática. Los residuos apolares se muestran en amarillo y los polares en azul. Las letras en rojo indican el extremo C terminal (C) y el extremo N terminal (N), y la flecha en el centro de la hélice indica la dirección y proporción de la cara apolar. El color rosa define aminoácidos polares sin carga (Q, N). Los residuos en gris (Hidrofobicidad intermedia), significa que pueden acomodarse en la cara polar o apolar.

- b) De estructura extendida:** Son péptidos lineales catiónicos que no presentan una estructura definida (Figura 5b). En esta categoría se encuentran algunos miembros de la familia de las catelicidinas, los cuales son conocidos por tener una estructura lineal más que una estructura secundaria debido a la presencia de residuos de prolinas. Dentro de esta familia se incluyen péptidos como las Indolicidinas producidas por leucocitos de bovinos de aproximadamente 13 residuos de longitud (Geitani, Moubareck, Xu, Karam Sarkis, & Touqui, 2020) (Chávez Salinas et al., 2018).
- c) Láminas Beta:** Comparado con las hélices  $\alpha$ , las láminas  $\beta$  son menos frecuentes en la conformación natural de las moléculas proteicas. Las láminas  $\beta$  están conformadas por dos o más hebras  $\beta$ , que se encuentran una junto a la otra mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . Estas hebras se pueden disponer en el mismo sentido (forma paralela) o en antisentido (forma antiparalela) (Figura 5c). Dentro de los PAMs con esta estructura se encuentran las defensinas humanas que fueron descubiertas en neutrófilos humanos como pequeñas moléculas catiónicas y más tarde fueron encontradas en insectos, plantas y mamíferos (Carrascoza, Zaric, & Silaghi-Dumitrescu, 2014).

- d) **De estructura mixta:** Son péptidos que tienen estructuras mezcladas, es decir que pueden involucrar regiones helicoidales, de hoja beta y extendidas en la secuencia (Figura 5d). Dentro de esta categoría se encuentra el péptido protegrina 1 de la familia de las catelicidinas, el cual tiene una longitud de 18 residuos y fue aislado de leucocitos de porcino con actividad antimicrobiana frente a un amplio rango de microorganismos. Particularmente esta secuencia contiene seis residuos de arginina y forma dos hebras  $\beta$ -antiparalelas con una  $\beta$ -turn (Steinberg et al., 1997) (Carrascoza et al., 2014).

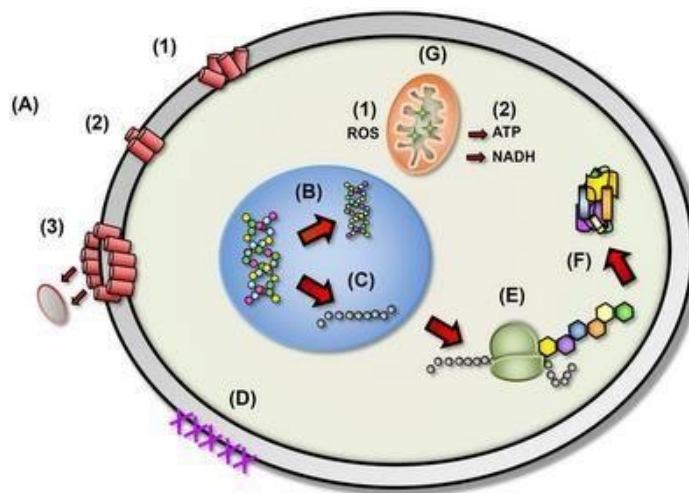


**Figura 5.** Clasificación de los PAMs según su estructura. Se muestra la representación esquemática de cada una de las estructuras de las PAMs. (A) hélice alfa. (B) extendida. (C) Estructura mixta. (D) Estructura de hoja beta (Sánchez & Ortega, 2016).

### 2.5.2 Mecanismos de acción de los PAMs

Es importante destacar que a diferencia de los antimicrobianos que actúan sobre actividades celulares específicas como la síntesis del peptidoglicano, síntesis de ADN o de proteínas, los PAMs actúan mayoritariamente sobre la membrana de lipopolisacáridos de los distintos microorganismos y en muy baja medida sobre blancos intracelulares (Figura 6). Esta interacción electrostática PAM-membrana provee a los PAMs con una ventaja frente a los antibióticos, resultando en una menor vulnerabilidad al desarrollo de resistencia

por parte de los microorganismos. La interacción de los PAMs con la membrana lipídica es posible gracias a su característica anfipática, lo que permite la atracción entre las cargas negativas de las membranas y la carga positiva de los residuos básicos de los PAMs. Esta interacción permite la acumulación de péptidos al interior de la bicapa, hasta llegar a un umbral en el cual se produce el colapso y la membrana se rompe (Carrascoza et al., 2014). Las membranas eucarióticas con un alto contenido de colesterol y una baja carga aniónica están fuera del alcance blanco de los PAMs.



**Figura 6.** Mecanismos de acción de los PAMs. Se representa A. Ruptura de la membrana celular 1) modelo duela del barril, 2) modelo del agujero del gusano y 3) modelo de la alfombra, B. Inhibición de la síntesis de ADN, C. Bloqueo de la síntesis de RNA, D. Inhibición de las enzimas que sintetizan la pared celular, E Inhibición de la actividad de los ribosomas, F. Inhibición de la actividad de las chaperonas, G. 1. Inhibición de la cadena respiratoria, 2. Ruptura de la membrana mitocondrial (Barbosa Pelegrini, del Sarto, Silva, Franco, & Grossi-de-Sa, 2011).

Se han descrito cuatro tipos de modelos de ruptura de membrana (Barbosa Pelegrini et al., 2011) que se describen como: 1) **Modelo de duela de barril** donde los péptidos se ubican en la membrana con los residuos hidrofóbicos orientados hacia el interior de la bicapa lipídica y los hidrófilicos orientados hacia la luz del poro (Figura. 6). 2) **Modelo de agujero de gusano o poro toroidal**, aquí los péptidos se reorientan en la membrana y arrastran a los lípidos con ellos mediante interacciones electrostáticas. La membrana sufre un doblez y forma un poro toroidal (Figura. 6). 3) **Modelo de alfombra** donde los péptidos actúan como detergentes, cubriendo la membrana electrostáticamente (en forma



monomérica u oligomérica). Esta "alfombra" de moléculas anfipáticas desplaza los fosfolípidos, alterando las propiedades de la membrana y generando su ruptura (Figura. 6.3) 4) **el modelo de agregado**, donde los péptidos se reorientan y se insertan dentro de la membrana verticalmente para formar estructuras similares a esferas y finalmente, 5) **el modelo de adelgazamiento de la membrana** donde los AMPs se insertan a un solo lado de la bicapa lipídica formando un espacio que debe ser ocupado por los lípidos de la membrana, conduciendo a una expansión de la membrana y por lo tanto a una reducción en el espesor de la bicapa para mantener el volumen constante.

### **2.5.3 Limitaciones de los PAMs y soluciones.**

Pese a sus excelentes características antimicrobianas, los PAMs presentan alta actividad citotóxica y hemolítica, esta última evidenciada por porcentajes de hemólisis altos o por concentraciones mínimas hemolíticas (CMH-concentración más baja del antimicrobiano que produce la lisis de los glóbulos rojos) bajas, las cuales son, incluso menores o iguales a la concentración mínima inhibitoria (CMI- concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento normal del microorganismo) de los PAMs, lo que hace muy peligroso su uso a nivel sistémico (Carreño & Lozano, 2013) (Hervé, 2015). Por otra parte, el aumento de los costos de producción y algunos problemas técnicos en el proceso de síntesis química limitan en algunos casos su fabricación. Así mismo, aquellos péptidos obtenidos de forma natural imponen retos para lograr siempre las mismas características naturales de producción. La estabilidad de los PAMs también se ha visto afectada por el pH, la fuerza iónica y la actividad de algunas proteasas presentes en los fluidos humanos como el suero.

Basados en estas limitaciones presentadas por los PAMs, distintos investigadores buscan mejorar la selectividad, aumentando la actividad antimicrobiana mientras se reduce significativamente la toxicidad sobre células humanas. Así mismo, se busca incrementar la estabilidad de los péptidos y reducir los costos de producción (J. Li et al., 2017). Con estos objetivos de estudio, el diseño racional de PAMs para lograr estos péptidos antimicrobianos

ideales se ha centrado en cinco aspectos claves: 1) longitud de la cadena; 2) carga neta; 3) hidrofobicidad; 4) anfipaticidad y 5) estructura secundaria.

Uno de los enfoques utilizados para mejorar la selectividad de los PAMs es el acortamiento de la molécula, de esta forma se reduce los costos de producción, se modifican algunas características fisicoquímicas y estructurales y se han encontrado resultados prometedores respecto al mejoramiento de la selectividad de los PAMs por membranas microbianas. Kang *y cols*, reportaron el incremento en la selectividad de un péptido de 25 aminoácidos, que presentaba actividad antimicrobiana sobre dos tipos de bacterias, con una hemólisis del 10%. Al acortar la molécula se obtuvo una secuencia de 11 residuos con similar actividad antimicrobiana y con reducida actividad hemolítica (1,8% la hemólisis) (Kang, Lee, Kim, & Hahm, 1996).

Otro estudio realizado por Lyu *y cols* en el 2016, muestra que al realizar el acortamiento del péptido Pmap-36 de 36 aminoácidos, el cual es activo contra bacterias y *Cándida*, se logró obtener un PAM de 18 residuos que mantiene la actividad antibacteriana, muestra una actividad antifúngica más potente y tiene una actividad hemolítica menor, pasando de una CMH de 4 a 128  $\mu\text{M}$  (Q. Li et al., 2016). En un estudio reciente Barreto-Santamaría *y cols*. reportaron que al remover tres aminoácidos de la región N-terminal del péptido de 20 residuos 35409, lograron obtener un péptido con actividad antibacteriana similar y actividad hemolítica reducida, pasando de una CMH de 1,56 para el péptido original, a una CMH mayor a 200  $\mu\text{M}$  (Barreto-Santamaría et al., 2020).

#### **2.5.4 Antecedentes de los péptidos a estudiar**

La Fundación Instituto de inmunología de Colombia-FIDIC se encuentra en la búsqueda de secuencias peptídicas sintéticas con actividad antimicrobiana sobre patógenos que hacen parte de la lista de prioridad de la OMS, especialmente de algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas como *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Con este objetivo, la línea de investigación Receptor-Ligando de la FIDIC, trabaja desde hace 8 años en el tamizaje, diseño y síntesis de secuencias peptídicas con capacidad antimicrobiana a partir de una amplia biblioteca de péptidos sintéticos.

A partir de estas investigaciones se han identificado varios péptidos con actividad antibacteriana. Entre ellos, se encontró que un péptido denominado 23688 (NFLKGKKVRKFGYIYIY) presenta actividad contra *E. coli* ATCC 35218 y ATCC 4382 con una CMI de 22 y 44  $\mu$ M, respectivamente y frente a distintos aislados clínicos de *E. coli*. Además, se encontró que este PAM es capaz de permeabilizar la membrana interna bacteriana, sugiriendo como blanco de acción de la membrana. Sin embargo, este péptido también presentó actividad hemolítica a la CMI (hemólisis del 4.6 %) y actividad citotóxica contra macrófagos humanos desde 44  $\mu$ M (C. M. Camargo, López, & Groot, 2014). Teniendo en cuenta el potencial antibacteriano de este péptido, el presente trabajo de investigación estuvo enfocado al acortamiento del péptido 23688 con el fin de mejorar sus selectivas sobre microorganismos.

## **3.0 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antimicrobiana y selectividad de péptidos sintéticos cortos derivados del péptido 23688 sobre algunos microorganismos de importancia clínica.

### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Establecer la concentración mínima inhibitoria de los péptidos sintéticos cortos derivados del 23688, sobre *S. aureus*, *E. coli*, y *C. albicans*.
- 2) Evaluar la concentración mínima hemolítica de los péptidos sintéticos cortos derivados del 23688.
- 3) Determinar la actividad citotóxica de los péptidos sintéticos cortos con actividad antimicrobiana, sobre un linaje celular de mamífero.

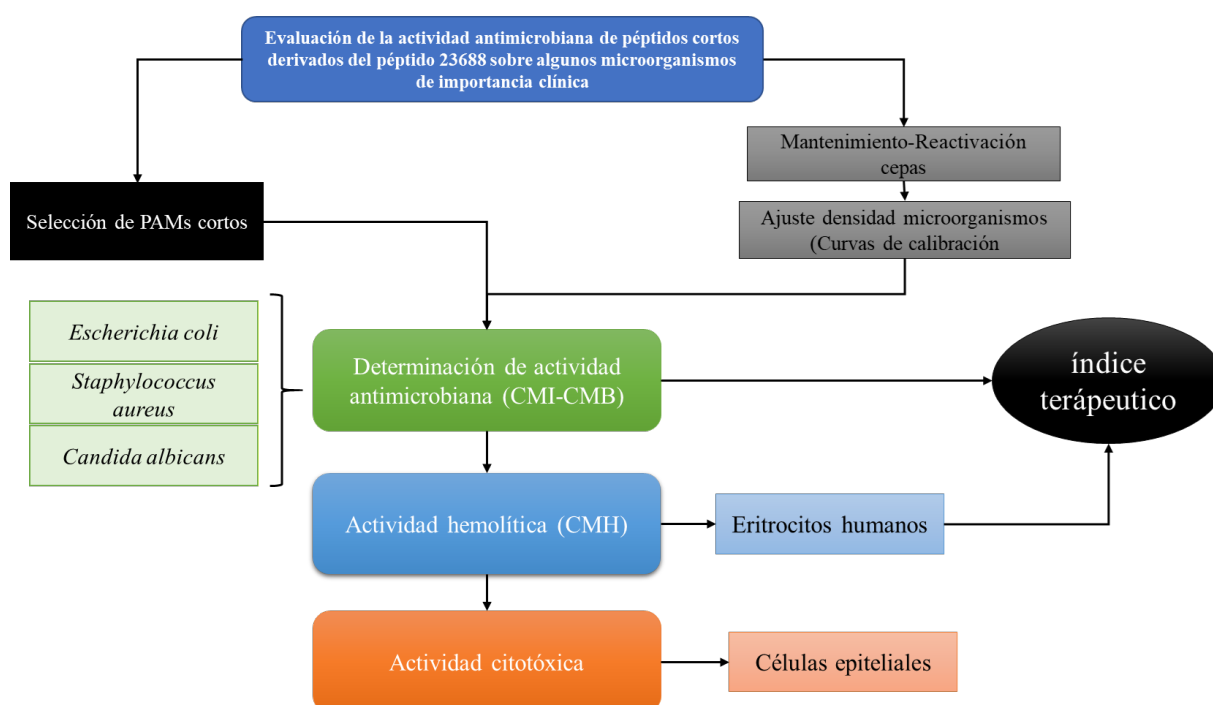
## 4.0 Hipótesis y Pregunta de investigación

Los péptidos cortos sintéticos, derivados del 23688, presentan actividad inhibitoria sobre los microorganismos de importancia clínica *S. aureus*, *E. coli*, y *C. albicans*, sin actividad hemolítica y/o citotóxica.

¿Cuáles péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688 presentan actividad antimicrobiana sobre microorganismos de importancia clínica como *S. aureus*, *E. coli*, y *C. albicans*, sin presentar actividad hemolítica y/o citotóxica?

## 5.0 Diseño Metodológico

Para el desarrollo de los objetivos planteados, se determinó la siguiente metodología que se resume en el siguiente esquema general:



### 5.1 Selección y obtención péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688

El péptido 23688 es un péptido de 17 aminoácidos (NFLKGKKVRKFGYIYIY) que ha mostrado, en previos trabajos, actividad sobre bacterias *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ML-35, a una concentración de 22  $\mu\text{M}$  y 44  $\mu\text{M}$ , pero con un porcentaje de hemólisis superior al 1% a dichas concentraciones (P. Camargo & Serrano, 2013). Basados en el potencial antimicrobiano de este péptido, la secuencia de aminoácidos del péptido 23688 fue utilizado como plantilla para el diseño de nuevos péptidos utilizando distintas herramientas bioinformáticas. Entre estas se utilizó la herramienta APD3 (Antimicrobial

Peptide Database 3) (<http://aps.unmc.edu/AP/>), la cual cuenta con cerca de 2169 PAMs antibacterianos, 172 antivirales, 105 anti-VIH, 959 antifúngicos, 80 antiparasitarios y 185 anticancerígenos (Wang, Li, & Wang, 2016) y es útil en la predicción de actividad antimicrobiana y de características fisicoquímicas. Por otro lado, se utilizó el servidor Anti-BP (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antibp/index.html>) el cual está optimizado para la predicción de actividad antimicrobiana (Lata, Sharma, & Raghava, 2007). Por su parte, la herramienta CAMP<sub>R3</sub> (Collection of Anti-microbial Peptides) (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) permite predecir cuál es el motivo funcional responsable de la actividad antimicrobiana. Para este caso, el servidor contiene información experimental con las señales específicas de actividad sobre la secuencia del péptido que han sido capturadas como patrones y modelos ocultos de Markov con cerca de 1386 PAMs representados en 45 familias (Waghu, Barai, Gurung, & Idicula-Thomas, 2016). Por último la herramienta Pep-fold (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) permitió predecir las estructuras secundarias de los péptidos en estudio (Shen, Maupetit, Derreumaux, & Tuffery, 2014), mientras que la herramienta HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (Wang et al., 2016) (Ondrus, 2020; D. Zhao et al., 2020) fue usada para realizar una representación de cada péptido mediante rueda helicoidal y predecir el momento hidrofóbico.

A partir de este análisis, se seleccionaron tres secuencias peptídicas cortas (<17 residuos) que fueron sintetizadas por el Grupo Funcional de Síntesis Química de la FIDIC mediante síntesis química en fase sólida utilizando la estrategia estándar t-Boc. Estos péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con una columna de fase inversa. La identidad de cada péptido fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF (Carreño & Lozano, 2013). Los péptidos obtenidos con pureza mayor al 90% fueron numerados con un código establecido por el Grupo de síntesis química de la FIDIC (Tabla 2).

**Tabla 2.** Péptidos cortos derivados de la secuencia del PAM 23688. Se muestra la secuencia y longitud de los péptidos en estudio.

Código	Secuencia	Longitud
23688 (original)	NFLKGKKVRKFGYIYIY	17

41781	- FLKGKKVRKFGYIYIY	16
42067	NFLKGKKVRKFGYI---	14
42068	- FLKGKKVRKFGYIY--	14

## 5.2 Mantenimiento y reactivación de microorganismos ATCC

### 5.2.1 Mantenimiento

Todas las cepas utilizadas en este estudio (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. albicans* ATCC 10231) fueron almacenadas en un microtubo con 200  $\mu$ L de glicerol estéril al 80% y 800  $\mu$ L de cultivo de cada microorganismo (L. P. B. Escobar, Ríos, Gómez, & Franco, 2016).

### 5.2.2 Reactivación

Las cepas bacterianas se tomaron de los gliceroles y se sembraron en una placa de agar LB (Bacto triptona 10 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L, cloruro de sodio 10 gr/L y agar 15g/L) o de agar Mueller Hinton (MHA) (extracto de carne 2.0 gr/L, hidrolizado de caseína 17.5 gr/L, almidón 1.5gr/L, agar 17 gr/L, pH 7.3). Estas placas fueron incubadas de 18 a 24 horas a 37°C. Al término de este tiempo, se tomaron 3 colonias morfológicamente iguales y se colocaron en 5 mL de caldo LB, en agitación constante (~280 rpm) a 37 °C, por~ 5 horas, dando cumplimiento al crecimiento hasta la fase logarítmica (L. P. B. Escobar et al., 2016).

## 5.3 Comprobación de las curvas de calibración de las cepas bacterianas

En la FIDIC se han estandarizado las curvas de crecimiento y calibración de las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (Barreto-Santamaría, 2019). En las curvas de calibración se relaciona la absorbancia del cultivo con las unidades formadoras de colonia por mL de solución (UFC/mL).

Para asegurar el cálculo apropiado del inóculo para los ensayos de actividad antimicrobiana de los péptidos, en este trabajo se llevó a cabo la comprobación de las curvas de calibración



disponibles en FIDIC. Para esto las dos cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 fueron crecidas hasta la fase logarítmica. Al cabo de este tiempo el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces y resuspendido con 5 mL de PBS 1X filtrado (8 gr NaCl, 2 gr KCl, 11 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3).

Este cultivo fue diluido hasta obtener un valor de absorbancia que se ubique en la mitad de la curva de calibración a comprobar (lectura de absorbancia a 620 nm en 270 µL). Luego de obtener este punto de la curva, el cultivo se diluyó serialmente en base 10 y se plaquearon diluciones que permitieran el conteo en placa. Estas placas fueron incubadas por 24 horas y luego del conteo se halló el valor teórico y el valor experimental de las UFC/mL. Con estos valores se determinó el porcentaje de variación de cada curva.

## **5.4 Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos mediante microdilución en caldo**

### **5.4.1 Actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922**

La actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos se evaluó sobre bacterias Gram positivas *S. aureus* ATCC 25923 y bacterias Gram negativas *E. coli* ATCC 25922. La CMI de los péptidos se evaluó utilizando una versión modificada del método de micro dilución en caldo del Comité de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) (Humphries, Hindler, Shaffer, & Campeau, 2019). Para esto, las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, se plaquearon por agotamiento en placas de agar LB, y se siguió el protocolo descrito en el numeral 5.3 para obtener un cultivo en fase exponencial, luego se ajustó la suspensión bacteriana A  $\approx 1 \times 10^6$  UFC/mL en medio líquido Mueller Hinton (MHB).

El ensayo de CMI se realizó en placas estériles de 96 pocillos de fondo plano. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 de los péptidos por duplicado, para obtener diferentes concentraciones en un volumen de 50 µL. Luego se adicionaron 50 µL de la suspensión bacteriana ( $\approx 1 \times 10^6$  UFC/mL en MHB) para obtener una concentración final de bacteria de  $\approx 5 \times 10^5$  UFC/mL y de 100 a 0,2 µM para los péptidos. Se utilizó medio MHB con bacterias como control de crecimiento, caldo MHB sin bacterias como control de

esterilidad y como control de inhibición del crecimiento bacteriano se utilizó vancomicina 64 mg/mL (glucopéptido) para el *S. aureus* ATCC 29223 y Ciprofloxacina (quinolona) 0,256 mg/mL, para la *E. coli* ATCC 25922.

La placa del ensayo se incubó durante 18 horas a 37°C, al cabo de esta incubación se realizó la lectura de la absorbancia a 620 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO), se realizaron tres replicas. La CMI se interpretó como la concentración más baja de péptido que impidió el crecimiento microbiano (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008).

Así mismo se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), para lo cual se tomaron 10 µL de muestra de cada pozo donde no se detectó crecimiento bacteriano en la placa de la CMI realizada. Esta alícuota se plaqueó sobre agar LB y se incubó de 18 a 24 horas a 37°C, luego de lo cual se verificó el crecimiento de colonias bacterianas. La concentración más baja de péptido en la que no se detectó crecimiento en el agar LB, fue tomada como la CMB. Se realizaron tres réplicas biológicas por duplicado (Julca Medina, 2015).

## **5.5 Determinación colorimétrica de la CMI mediante la técnica de MTT**

La técnica colorimétrica MTT fue utilizada como un método adicional al turbidimétrico para la medición de la actividad antibacteriana. Esta prueba colorimétrica con sales de tetrazolio permite estimar de manera indirecta la viabilidad de células presentes después de un tratamiento por medición de su función metabólica. El método está basado en la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido en células viables, por componentes de la cadena respiratoria (deshidrogenasas mitocondriales), a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (Escobar, Rivera, & Aristizábal, 2010; Ortega Campos, 2020).

Para este ensayo, se incubaron las cepas bacterianas con los péptidos siguiendo el protocolo de la sección 5.4.1. Al cumplir las 18 horas de incubación a 37°C, se adicionaron 10 µL de MTT (4,4 mg /mL en PBS 1X filtrado) a cada pozo de la microplaca. Esto se incubó 4 horas a 37°C y luego se adicionaron 100 µL de isopropanol mezclado con 5% de

HCl 1 M. El contenido de los pozos se mezcló por pipeteo, asegurando la disolución completa de los cristales de formazán y se leyó a 570 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO) (Escobar et al., 2010; Haddad et al., 1994).

## **5.6 Determinación de la actividad antifúngica de cada uno de los péptidos**

La actividad antifúngica de los péptidos sintéticos se evaluó sobre *C. albicans* ATCC 10231 mediante el ensayo de la concentración mínima fungicida (CMF), en medio líquido RPMI-1640, que contiene glutamina, rojo fenol como indicador, suero, y piruvato de sodio. La preparación del inóculo se realizó a partir de un microtubo almacenado con 200 µL de glicerol al 80% y 800 µL de cultivo de *C. albicans*. La levadura fue crecida en tubos de caldo Tripticasa soya (TSB), (peptona 3 gr/L, triptona 17 gr/L, cloruro de sodio 5.0 gr/L, glucosa 2.5 gr/L, fosfato di potásico de hidrogeno 2.5 gr/L, pH 7.3) durante toda la noche a 35 °C en agitación constante (100 rpm). La CMI de los péptidos se determinó utilizando una versión modificada del método de micro dilución en caldo del CLSI (Chang et al., 2008).

Brevemente, en placas estériles de 96 pozos, se hicieron diluciones seriadas de los péptidos 23688, 41781, 42067 y 42068, en medio RPMI a partir de 200 µM. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de la preparación del inóculo de *C. albicans* a una concentración de  $\approx 5 \times 10^5$  UFC/ mL para un inóculo final de  $2.5 \times 10^5$  UFC/mL por pozo. Esta placa se incubó en cámara húmeda a 35°C por 24 horas y luego se leyó la absorbancia a 530 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO). La CMI se consideró como la más baja concentración a la cual el crecimiento fúngico no se observa (B. Rivas-Santiago, E. Sada, R. Hernández-Pando, & V. J. S. p. d. M. Tsutsumi, 2006b). Se utilizó medio con levadura como control de crecimiento, medio solo como control de esterilidad y como control de inhibición del crecimiento se utilizó levadura tratada con fluconazol (64 mg/mL) (Alvarez, Zarelli, Pappano, & Debattista, 2004).

## **5.7 Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688**

La actividad hemolítica de los péptidos se determinó como la cantidad de hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos humanos (Alonso Geli, del Toro García, Falcón Dieguez, & Valdés Rodríguez, 2005). Para esto se obtuvo una muestra de sangre total con anticoagulante y se centrifugó a  $1000 \times g$ , durante 5 min a  $4^\circ C$ . A los eritrocitos obtenidos se les realizaron tres lavados y se resuspendieron en PBS 1x al 5%. La evaluación se realizó en placas de 96 pozos estériles, se tomaron 100  $\mu L$  de la suspensión de glóbulos rojos y se incubó con 100  $\mu L$  de los péptidos en dilución seriada partiendo de 200  $\mu M$  hasta 0.39  $\mu M$ . La placa se incubó durante 1 hora a  $37^\circ C$ , luego se centrifugó a  $1000 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ C$  y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa. La absorbancia de los sobrenadantes se leyó a 540 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO). Como controles negativos y positivos, se utilizaron glóbulos rojos con PBS 1X (0% de hemólisis) y glóbulos rojos con detergente tritón X-100 al 0.1% (100% de hemólisis).

La CMH, se determinó como la concentración más baja donde hay hemólisis superior o igual al 1%. Se hicieron tres ensayos independientes por duplicado (Barreto-Santamaría et al., 2016). El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{Abs de la muestra} - \text{Abs GRs})}{(\text{Abs GRs tritón} - \text{Abs GRs})} * 100$$

## **5.8 Determinación de la actividad citotóxica de los péptidos cortos sintéticos**

La evaluación del efecto citotóxico de los péptidos cortos sintéticos se realizó sobre la línea de células epiteliales de riñón denominada Vero. Se utilizó el método MTT descrito en la sección 5.5. En este ensayo, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Denizot & Lang, 1986).

Las células Vero fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco modification of Eagle's médium), suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico en ausencia de péptido para determinar inicialmente el número específico de células por pozo necesarias para iniciar el ensayo de citotoxicidad. Brevemente, diferentes cantidades de células fueron sembradas por triplicado en cajas de 96 pozos, luego de la formación de la

monocapa fueron incubadas con el reactivo de MTT y se midió la densidad óptica (DO) a 540nm. Se seleccionó la cantidad de células que generara una DO entre 0.75 y 1.

Una vez seleccionado el número de células Vero necesarias para el ensayo de citotoxicidad, estas fueron sembradas en placas estériles de 96 pozos. Esta placa se incubó a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas para permitir la adherencia celular en monocapa. Los péptidos se diluyeron en medio DMEM y se adicionaron a cada pozo con células a concentraciones finales de 100, 50 y 25µM. Esta mezcla células-péptido se incubó nuevamente a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas (Grela, Kozłowska, & Grabowiecka, 2018).

Posteriormente se añadieron 10 µL de MTT (5 mg/mL en PBS 1X), se incubó por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) concentrado. Se mezcló por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán fueran disueltos. Finalmente se leyó la DO a 540 nm y el porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = (DO \text{ células tratadas}) / (DO \text{ Células control}) * 100$$

Este ensayo se llevó a cabo tres veces por triplicado. Como blanco se usó DMSO. Como control negativo de viabilidad se usaron células tratadas con DMSO y como control positivo células sin tratamiento las cuales deben dar una lectura de DO mayor o igual a 1 (Vardanian, Kurzbaum, Farber, Butnariu, & Armon, 2018). Diferencias entre cada uno de los tratamientos fueron evaluadas estadísticamente mediante un ANOVA utilizando como prueba contrastes Dunnett mediante el programa Prisma v.5

## 5.9 Cálculo del índice terapéutico (CMH/MIC)

El índice terapéutico (IT) se refiere a la relación entre la dosis a la que un fármaco causa efecto tóxico y la dosis a la que produce el efecto terapéutico. En el caso de los PAMs, como aproximación al IT, se ha desarrollado una medida *in vitro* de la selectividad sobre los

patógenos, es decir la relación entre la mínima concentración que genera un efecto tóxico sobre células eucariotas (generalmente glóbulos rojos) y la mínima concentración que genera inhibición total del crecimiento bacteriano. Por tal motivo el IT es un parámetro ampliamente utilizado en el trabajo con PAMs que representa la especificidad de estos péptidos por membranas procariotas versus membranas eucariotas (Sun et al., 2016). De esta forma, el IT es calculado con la siguiente relación:

$$IT = \frac{CMH}{CMI}$$

donde CMH es la concentración mínima hemolítica y CMI es la concentración mínima inhibitoria del péptido sobre el microorganismo. De esta forma, un alto índice terapéutico indica una alta selectividad por microorganismos

## 6.0 Consideraciones éticas

No existe conflicto de intereses, el equipo de investigadores asume el rol de cada investigación con los riesgos mínimos, controlados por la entidad y la conciencia del investigador, frente al compromiso adquirido con la FIDIC. Las muestras de sangre utilizadas para la obtención de glóbulos rojos en este proyecto fueron obtenidas con un mínimo de riesgo en las personas sanas quienes dieron su consentimiento por escrito. Todos los protocolos se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki.

## 7. Resultados

### 7.1 Obtención de péptidos cortos sintéticos derivados del péptido 23688

A partir de la secuencia del péptido 23688 (NFLKGKKVRKFGYIYIY) y con las herramientas Bioinformáticas APD3, CAMP<sub>3</sub> y AntiBP se seleccionaron tres péptidos cortos con una alta probabilidad de poseer actividad antimicrobiana. Los tres péptidos sintéticos fueron denominados como 41781 (-FLKGKKVRKFGYIYIY), 42067 (NFLKGKKVRKFGYI---) y 42068 (-FLKGKKVRKFGYIY--) (Tabla 3). El péptido 41781

se obtuvo removiendo la Asparagina (N) del extremo amino terminal del péptido 23688, generando una secuencia de 16 residuos, quedando una fenilalanina hacia el amino terminal del péptido, este residuo es un aminoácido esencial cuya cadena lateral contiene un anillo bencénico, residuo de carácter apolar, que refuerza la teoría de los mecanismos de acción con las membranas bacterianas de carácter aniónico, al interactuar con un péptido con extremos hidrofóbicos le confiere mejores propiedades de acción (Jaramillo, 2006). Por otra parte, al péptido 42067 se le removieron tres residuos dos tirosinas y una isoleucina (YIY) hacia el extremo carboxi terminal (14 residuos) mientras que el péptido 42068 se obtuvo truncando una Asparagina (N) hacia el amino terminal y una isoleucina (I) y una tirosina (Y) hacia el extremo carboxi-terminal, generando un péptido de 14 residuos.

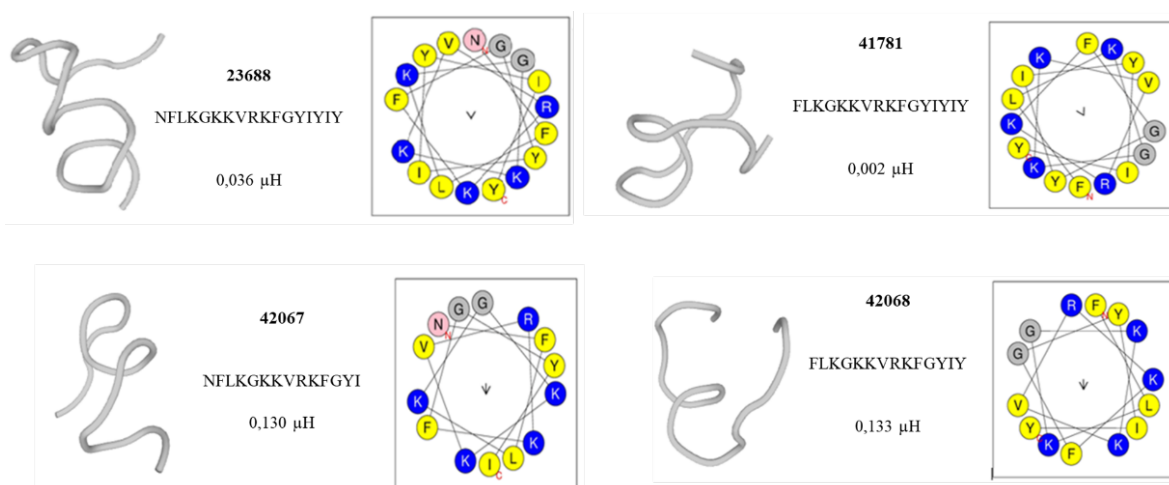
**Tabla 3.** Características fisicoquímicas de los péptidos cortos derivados del 23688.

Péptido	Secuencia	L	Peso Molecular (Dalton)	Carga neta	% de aa Hidrofóbicos	Momento Hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ )	Predicción de estructura secundaria	Predicción de actividad
23688 original	NFLKGKKVRKFGYIYIY	17	2137	+5	35%	0.036	$\alpha$ -hélice	PAM
41781	-FLKGKKVRKFGYIYIY	16	2023	+5	37%	0.002	$\alpha$ -hélice	PAM
42067	NFLKGKKVRKFGYI---	14	1698	+5	35%	0.130	$\alpha$ -hélice	PAM
42068	-FLKGKKVRKFGYIY--	14	1747	+5	35%	0.133	$\alpha$ -hélice	PAM

Diferentes estudios han mostrado que algunas características fisicoquímicas tales como la carga neta, estructura, tamaño, hidrofobicidad y anfipaticidad de la molécula pueden incrementar o disminuir la actividad antimicrobiana de los PAMs (Edwards et al., 2016; Hollmann et al., 2016). Al evaluar las características fisicoquímicas y estructurales con las diferentes herramientas bioinformáticas mencionadas en la sección de metodología, se encontró que no hay diferencias entre los distintos péptidos respecto a carga neta y predicción de estructura secundaria. Un leve incremento del porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos (37%) fue observado para el péptido 41781 respecto a los demás péptidos (35%). Así mismo, todos los péptidos presentaron valores de momentos hidrofóbicos ( $\mu\text{H}$ ) bajos que se

correlacionan con una baja anfipaticidad (Tabla 3, figura 7), sin embargo, el péptido 41781 presentó un  $\mu\text{H}$  cercano a cero (Figura 7).

Reportes en la literatura han mostrado que la mayoría de PAMs catiónicos tienden a adoptar estructuras anfipáticas (una cara apolar y una cara polar) que le confiere una excelente capacidad de interacción con los lípidos de las membranas bacterianas. Sin embargo, una elevada anfipaticidad podría eventualmente conducir también a una actividad citotóxica (Mihajlovic & Lazaridis, 2012). Como se observa en la figura 8, todos los péptidos incluyendo el 23688 presentaron baja anfipaticidad.



**Figura 7.** Representación de la rueda helicoidal, estructura secundaria y momento hidrofóbico del péptido 23688 y sus derivados. Se observa la rueda de Edmundson de cada uno de los péptidos en estudio obtenida mediante el programa HeliQuest. Los residuos polares se muestran en azul, residuos no polares en color amarillo y la asparagina (N) en rosado. A la derecha de cada rueda helicoidal se muestra la estructura secundaria predicha por Pepfold para cada péptido. Finalmente se muestra el valor del momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) para cada secuencia. El  $\mu\text{H}$  es una medida de la anfipaticidad y es definida como la suma vectorial de la hidrofobicidad individual de los aminoácidos normalizados a una helice  $\alpha$  ideal (Eisenberg, Weiss, & Terwilliger, 1984).

## 7.2 El péptido 41781 tiene características antimicrobianas similares al péptido original 23688.

Para evaluar si los tres péptidos seleccionados derivados del 23688 tienen actividad antibacteriana sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, se determinó la CMI. De los tres péptidos seleccionados solo el péptido 41781 fue capaz de inhibir el crecimiento



bacteriano similar al 23688 con una CMI de 12.5  $\mu\text{M}$  sobre *E. coli* 25922 (Tabla 4). De forma interesante, el péptido 41781 fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* con una CMI de 50  $\mu\text{M}$  distinto a lo reportado para el péptido 23688, el cual solo tiene actividad sobre bacterias Gram-negativas (Tabla 5).

**Tabla 4.** Actividad antimicrobiana del péptido 23688 y sus derivados contra la cepa *E. coli* ATCC 25922

<b>Péptido/Antibiótico</b>	<b>CMI (Turbidimetría)</b>	<b>CMI (Colorimetría)</b>	<b>CMB</b>
<b>23688 (Original)</b>	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>41781</b>	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5-25 $\mu\text{M}$
<b>42067</b>	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>42068</b>	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>Control (Ciprofloxacina)</b>	0,008 $\mu\text{g/mL}$	0,008 $\mu\text{g/mL}$	0,008 $\mu\text{g/mL}$

Teniendo en cuenta que se ha reportado que algunos PAMs pueden precipitarse en medios de cultivo bacteriano como el MHB (Cassana Rojas, 2016), la CMI para estos péptidos fue confirmada utilizando una técnica colorimétrica que mide la viabilidad celular bacteriana por la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán. En general, no se encontraron diferencias en la CMI entre el método el colorimétrico y el método convencional turbidimétrico (Tablas 4 y 5).

**Tabla 5.** Actividad antimicrobiana del péptido 23688 y sus derivados cortos contra la cepa de *S. aureus* ATCC 25923

<b>Péptido/Antibiótico</b>	<b>CMI (Turbidimetría)</b>	<b>CMI (Colorimetría)</b>	<b>CMB</b>
<b>23688 (Original)</b>	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>41781</b>	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>42067</b>	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>42068</b>	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
<b>Control (vancomicina)</b>	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$

### 7.3 El péptido 41781 presentó actividad bactericida a la CMI

Para determinar si la actividad de los péptidos 23688 y 41781 es de tipo bactericida o bacteriostático se determinó la concentración mínima bactericida (CMB). Este ensayo, consistió en transferir a un medio de cultivo sólido una alícuota de los pozos que, durante el ensayo de CMI no presentaran crecimiento. Aquella concentración desde donde no se observó crecimiento bacteriano fue considerada como la CMB. Esto significa que las bacterias han muerto durante el ensayo de CMI y no han podido recuperarse en un medio libre de péptido. La CMB para el péptido 41781 contra *E. coli* fue igual que la CMI, lo que indica su efecto bactericida (Tabla 4). Por el contrario, el péptido 23688 presentó una CMB mayor a 100  $\mu\text{M}$  que difiere de la CMI (12,5  $\mu\text{M}$ ), indicando que su efecto es de tipo bacteriostático. No se midieron las CMB de los péptidos 42067 y 42068 debido a que sus CMI estuvieron por encima de 100  $\mu\text{M}$ .

### 7.4 Ninguno de los péptidos evaluados presenta actividad anti-fúngica contra *C. albicans* ATCC 10231

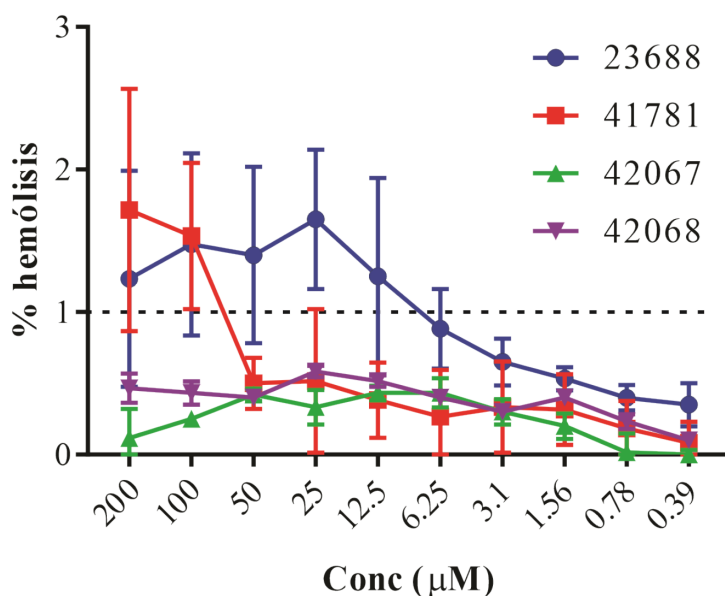
Se ha reportado que algunos PAMs presentan un amplio espectro de actividad sobre microorganismos. Para evaluar el espectro de actividad del péptido 23688 y sus derivados cortos, cada péptido fue ensayado sobre *C. albicans* ATCC 10231. Como se muestra en la tabla 6, el péptido 23688 no presentó actividad antifúngica a las concentraciones evaluadas (100-0,2  $\mu\text{M}$ ). De igual forma, ninguno de los péptidos cortos fue capaz de inhibir el crecimiento de la *C. albicans* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Actividad antifúngica del péptido 23688 y sus derivados cortos contra *C. albicans* ATCC 10231

<i>C. albicans 10231</i>	
<b>23688 (original)</b>	>100 $\mu\text{M}$
<b>41781</b>	>100 $\mu\text{M}$
<b>42067</b>	>100 $\mu\text{M}$
<b>42068</b>	>100 $\mu\text{M}$
<b>Fluconazol</b>	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 7.5 El péptido 41781 redujo significativamente la actividad hemolítica respecto al péptido original.

Una de las principales limitantes para el uso de PAMs es su elevada capacidad hemolítica. Afortunadamente, distintas modificaciones como el acortamiento de péptidos, modificaciones específicas sobre sus propiedades fisicoquímicas y cambios estructurales pueden ayudar a disminuir su propiedad hemolítica. Por lo tanto, para evaluar si el acortamiento de los péptidos disminuyó la actividad hemolítica del péptido original 23688, se evaluó en un ensayo de hemólisis la actividad de los péptidos cortos sobre eritrocitos humanos. Aquella concentración donde el péptido empieza a producir más del 1% de hemólisis fue considerada la CMH.



**Figura 8.** Actividad hemolítica del péptido 23688 y sus derivados cortos. Glóbulos rojos humanos fueron incubados con diluciones seriadas en base 2 de cada uno de los péptidos. Se observa que el péptido original 23688 (línea azul), genera hemólisis mayor al 1% desde la concentración de 12,5 µM mientras que el péptido 41781 (línea roja), supera el 1% de hemólisis solo hasta una concentración de 100 µM. Eritrocitos tratados con tritón X-100 al 0,1% fueron tomados como el 100% de hemólisis y a partir de allí se calculó el porcentaje de hemólisis para cada péptido (ver metodología).

Como se observa en la figura 8, la CMH para el péptido 23688 fue de 12,5 µM similar a la CMI, lo que confirma la capacidad hemolítica y la falta de selectividad de este péptido

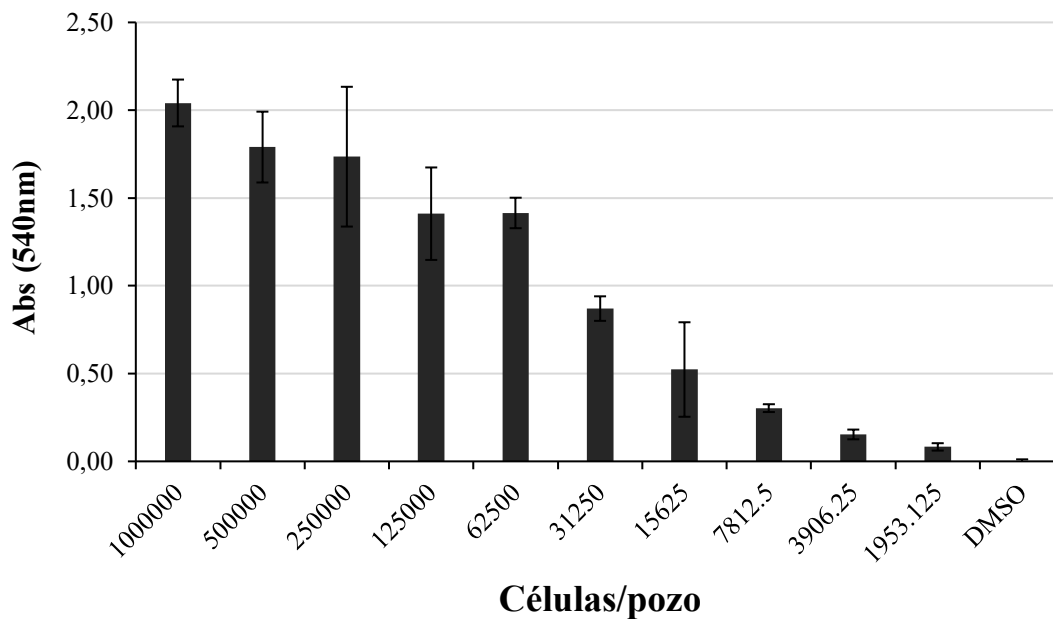
con un índice terapéutico (IT) de 1. Interesantemente, el péptido 41781 presentó una CMH de 100  $\mu\text{M}$ , es decir ocho veces por encima de la CMI contra *E. coli* (Tabla 4 y 7). Este resultado muestra la disminución del patrón hemolítico y un mejoramiento de la selectividad de este nuevo PAM el cual presenta un IT de 8 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Actividad hemolítica de los péptidos 23688 y sus derivados cortos. La CMH se tomó como la mínima concentración de péptido que produce hemólisis mayor al 1% en los eritrocitos humanos.

<b>Péptido/Antibiótico</b>	<b>% de Hemólisis a la CMI</b>	<b>CMH (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>23688 (Original)</b>	>1	12.5
<b>41781</b>	<1	100
<b>42067</b>	-	>200
<b>42068</b>	-	>200

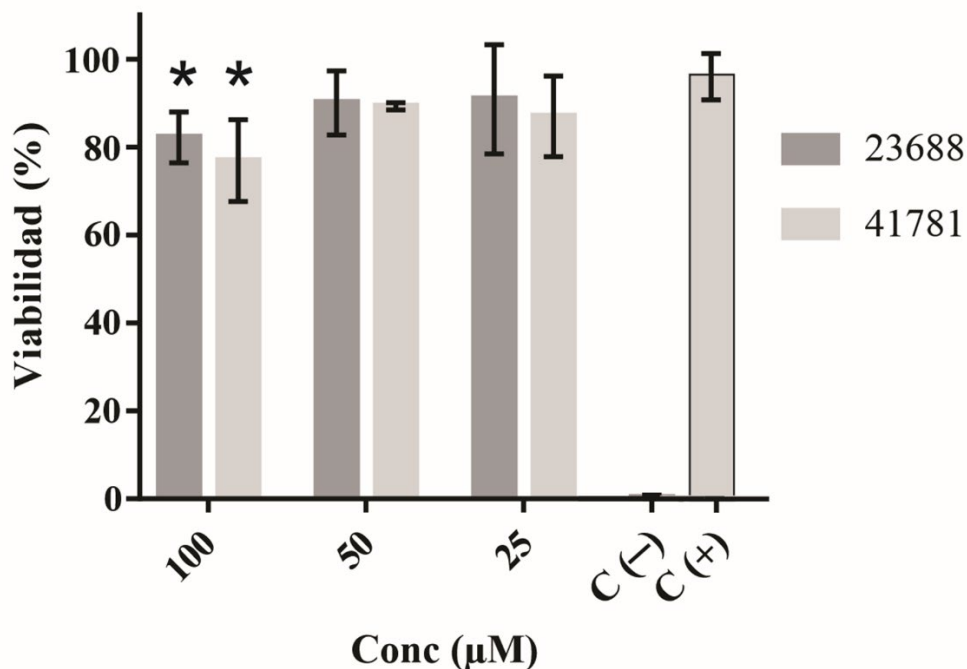
### **7.6 Ninguno de los péptidos evaluados es citotóxico a la concentración mínima inhibitoria.**

La citotoxicidad de los péptidos 23688 y 41781 fue evaluada frente a células epiteliales Vero, derivadas del mono *Chlorocebus sp.* utilizando el método colorimétrico de MTT a tres diferentes concentraciones. Para este ensayo se estableció que la concentración apropiada de células Vero era de 30,000 células por pozo (Figura 9).



**Figura 9.** Determinación del número de células para los ensayos de citotoxicidad. La selección del número óptimo de células para el ensayo de citotoxicidad se determinó leyendo la densidad óptica a 540 nm y eligiendo el número que tenía una DO entre 0,75 y 1.

En general, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas para los dos péptidos ensayados a una concentración de 100 $\mu$ M, lo que muestra su bajo potencial citotóxico (Figura 10) y esta 8 veces por debajo de la CMI de los péptidos 23688 y 41781.



**Figura 10.** Citotoxicidad de los péptidos 23688 y 41781 frente a células Vero. \* indica los tratamientos que mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control positivo de viabilidad (células sin tratamiento-100%).

## 8. Discusión

Ante el incremento de la resistencia antimicrobiana, se han adoptado estrategias de búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que combatan estos microorganismos. Dentro de los agentes investigados para este fin se encuentran los PAMs, moléculas que han generado impacto científico, económico y social debido a sus ventajas en comparación con otros agentes antimicrobianos (Correa Gómez, 2012). De hecho, los PAMs naturales y sintéticos han mostrado resultados prometedores contra una serie de bacterias clínicamente relevantes. Aun así, esta clase de antimicrobianos ha fallado continuamente en ensayos clínicos, donde una de sus principales desventajas es la baja selectividad celular. En este contexto, el diseño racional de PAMs mediado por la modificación de características fisicoquímicas como el acortamiento de secuencias o los cambios estructurales apoyados en métodos computacionales han sido herramientas utilizadas para el mejoramiento selectivo de los nuevos PAMs (Cardoso et al., 2019; Chen et al., 2005).

Previos estudios desarrollados en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC mostraron que una secuencia de 17 aminoácidos derivada de una biblioteca de péptidos sintéticos tiene actividad antibacteriana contra *E. coli* con CMI entre 22 y 44  $\mu\text{M}$  (P. Camargo & Serrano, 2013). Desafortunadamente, esta secuencia peptídica fue capaz de lisar los glóbulos rojos humanos en cerca del 4,6% a 44  $\mu\text{M}$  y presentó actividad citotóxica contra macrófagos humanos de la línea U937 a esta misma concentración. Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en producir péptidos cortos derivados del péptido original 23688 con el fin de obtener moléculas con mayor selectividad por microorganismos. Teniendo en cuenta que, existen distintas estrategias racionales para la obtención de nuevos PAMs, este trabajo de investigación se basó en la evaluación y caracterización de secuencias cortas, de menos de 17 residuos de longitud. Esta estrategia a diferencia de las demás, busca el mejoramiento de la selectividad, estrategia que a su vez permite reducir el costo de producción de la secuencia y mejorar la estabilidad de la molécula frente a proteasas (Barreto-Santamaría et al., 2020).

Para el cumplimiento de los objetivos, inicialmente se utilizaron herramientas bioinformáticas de diseño, predicción y caracterización de PAMs. De esta forma, se seleccionaron tres péptidos cortos derivados del 23688, los cuales carecen de algunos residuos al extremo amino y/o carboxilo terminal de la secuencia original (Tabla 2). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron sintetizadas y purificadas para los ensayos experimentales con purezas superiores al 90%. Las secuencias fueron denominadas como 41781, 42067 y 42068.

Teniendo en cuenta que propiedades fisicoquímicas como la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la carga neta de los PAMs, sumado a las características estructurales, parecen ser las fuerzas que impulsan la interacción con la membrana citoplasmática microbiana cargada negativamente (Ebbensgaard, Mordhorst, Overgaard, Aarestrup, & Hansen, 2018), se determinaron estas propiedades para cada uno de los péptidos en estudio. En general todos los péptidos son moléculas catiónicas con una carga +5, con tendencia  $\alpha$ -helicoidal, hidrofobicidad  $\geq 35\%$ , baja anfipaticidad y una longitud entre 14 y 16 aminoácidos (Tabla 3). Al relacionar estas características con la actividad antimicrobiana presentada a nivel experimental, se encontró que, si bien hay un mantenimiento de la carga neta y

tendencia estructural entre todos, solamente el péptido original y el derivado 41781 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* a una MIC de 12,5  $\mu\text{M}$  (Tabla 4). Previos estudios han mostrado que cuando los péptidos se encuentran con carga entre +2 a +6 presentan una buena actividad antimicrobiana (Rivas-Santiago et al., 2006a; Tavares et al., 2020; Téllez & Castaño, 2010; Zelezetsky et al., 2005). Estos PAMs cargados positivamente interactúan fuertemente con las membranas bacterianas, las cuales contienen un alto porcentaje de moléculas cargadas negativamente como fosfatidilglicerol y cardiolipina o ácidos lipoteicoicos en el peptidoglicano de Gram-positivas (Huang, Huang, & Chen, 2010) y lipopolisacárido de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (P. Li et al., 2006). Por otro lado, aunque los PAMs pueden adoptar diferentes conformaciones estructurales como hojas  $\beta$ , estructuras random coil y estructuras mixtas, muchos de ellos tienden a adquirir estructuras  $\alpha$ -helicoidales (Huang et al., 2010). Sin embargo, en este caso a pesar de mantener la carga, e incluso la tendencia estructural, se encontraron cambios en la actividad antibacteriana, evidenciando que otras características como la longitud o la estructura primaria tuvieron mayor impacto en esta actividad. Esto es apoyado por el hecho de que los péptidos 42067 y 42068, con características fisicoquímicas iguales o similares al 23688, no presentaron ningún tipo de actividad antimicrobiana a las concentraciones evaluadas en el estudio. Este sugiere que la eliminación de los residuos de tirosina e isoleucina al extremo carboxilo-terminal son esenciales para la actividad antimicrobiana y/o que el péptido requiere longitudes mayores a 14 aminoácidos para mantener la actividad.

Cuando se evaluó si, la actividad antibacteriana tenía un efecto bacteriostático o bactericida se encontró que el péptido 41781 es capaz de matar las bacterias Gram-negativas *E. coli* a la CMI, diferente a lo encontrado para el péptido original, el cual presenta solo actividad bacteriostática (Tabla 4). De forma interesante el péptido 41781 fue el único capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas *S. aureus* a 50 $\mu\text{M}$  (Tabla 5). Si bien ambos péptidos son similares en sus características fisicoquímicas, el péptido 41781 presentó un incremento del 2% en el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos y  $\mu\text{H}$  cercano a cero (rango de 0-3,26), lo que se correlaciona con una muy baja anfipaticidad. Se ha correlacionado que porcentajes de hidrofobicidad hasta del 50% son adecuados, teniendo en cuenta que los péptidos necesitan de esta propiedad para poder interactuar con las



membranas, pero que valores por encima de este porcentaje pueden disminuir la selectividad, haciendo a los péptidos más hemolíticos (Barreto-Santamaría et al., 2020) (J. Zhao, Zhao, Liang, Zhang, & Zheng, 2013). Previos trabajos han mostrado que la naturaleza anfipática de los PAMs, que se traduce en una cara polar y apolar de la molécula es un prerrequisito para la actividad de los PAMs (Téllez & Castaño, 2010) (Guevara Agudelo, 2017; Martín Quirós, 2014; Vaezi et al., 2020). Sin embargo, la anfipaticidad a menudo se correlaciona con un incremento simultáneo de la actividad bactericida y citotóxica (Viteri Dávila, 2020). En nuestro caso, la leve disminución del  $\mu\text{H}$  (valor representativo de la anfipaticidad) mantuvo actividad antimicrobiana, e incluso la potenció, lo que se puede evidenciar mediante el incremento en la actividad bactericida sobre *E. coli* y la actividad inhibitoria sobre *S. aureus*. Además, la remoción de la asparagina del péptido 23688 dio lugar a una disminución significativa de la actividad hemolítica y citotóxica en el péptido 41781.

Aunque previos estudios de relación estructura actividad sobre péptidos  $\alpha$ -helicoidales han propuesto que la actividad de los PAMs y la especificidad es modulada por las propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad,  $\mu\text{H}$  y carga neta, es este estudio observamos una elevada heterogeneidad y baja correlación entre lo reportado en algunos estudios y lo encontrado para la actividad antimicrobiana del péptido 41781. En este caso, péptidos con características muy similares mostraron resultados diversos de actividad y selectividad. De hecho, estas características tampoco logran explicar la relativa eficacia antimicrobiana del péptido 41781 en comparación con la actividad del péptido 23688. Estudios enfocados a evaluar los mecanismos de acción de estos péptidos y otras modificaciones fisicoquímicas más fuertes podrían contribuir de manera significativa a la correlación con las características fisicoquímicas y a proponer nuevas estrategias que contribuyan a la búsqueda de nuevos PAMs.

Algunos autores han propuesto, que péptidos que actúan sobre bacterias pueden ser activos contra microorganismos de más alta complejidad como los hongos (Cabello-Ruiz, Núñez-González, & Torres de la Cruz, 2016; Luz Mínguez, 2020). Para determinar la capacidad antifúngica de los péptidos sobre una de las levaduras más comunes en la práctica clínica, se llevó a cabo la determinación de la CMI para cada uno de los péptidos frente a una

cepa de *Cándida albicans*. Los resultados mostraron que ninguno de los péptidos fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* a las concentraciones evaluadas en el estudio. Estos resultados sugieren una elevada selectividad de los péptidos 23688 y 41781 por membranas bacterianas en particular por bacterias Gram-negativas. Estos hallazgos, también son de gran interés en la búsqueda de tratamientos altamente específicos por especies y cepas microbianas concretas, como han propuesto diversos autores (Olascoaga-Del Angel et al., 2018).

Aunque no es claro por qué el péptido 41781 tiene mayor actividad y selectividad por la membrana de las Gram-negativas que por la de otros patógenos como las Gram-positivas, se ha descrito que, en contraste a la capa grande de peptidoglicano encontrada en bacterias Gram-positivas, la capa de peptidoglicano en las Gram-negativa es mucho más delgada y menos entrecruzada. En adición la bacteria Gram-negativa posee una membrana externa por encima del peptidoglicano formada por lipopolisacárido, el cual es decorado con un alto número de grupos fosfatos, cargados negativamente, que participan en puentes salinos con cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que da como resultado una red electrostática (Nikaido, 2003). La actividad del péptido 41781 es particularmente interesante debido a que es uno de los patógenos que encabezan la lista de prioridad en investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos y por el reto estructural y biológico que supone la envoltura celular de Gram-negativas para la acción de los antimicrobianos (Lawe Davies & Bennet; Needham & Trent, 2013; Rello et al., 2019).

En conclusión, se puede mencionar que este trabajo reporta por primera vez la actividad antimicrobiana de un péptido de 16 residuos derivado del 23688. Este péptido mostró propiedades antimicrobianas mejoradas, dirigidas principalmente frente a *E. coli* y en menor medida contra *S. aureus*. Pese a mantener características físicoquímicas similares con el péptido original, el péptido 41781 no fue hemolítico ni citotóxico a la CMI contra las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Así, al calcular el IT de la secuencia, a partir de la CMI contra *E. coli* y de la CMH identificadas en este estudio, se hizo evidente el cambio de selectividad, pasando de un IT de 1 (23688) a un IT de 8, lo que muestra el mejoramiento.

Todo lo anterior pone en evidencia la relevancia de la secuencia del péptido 41781 para ser considerado en próximos estudios.

## Conclusiones

1. Los péptidos 23688, 41781, 42067 y 42068 presentan características fisicoquímicas similares. En particular, el péptido 41781 presentó cambios sutiles que involucran un 2% más de aminoácidos hidrofóbicos y un  $\mu\text{H}$  cercano a cero.
2. De los péptidos derivados solo el 41781 presentó actividad antibacteriana con una CMI de 12,5  $\mu\text{M}$  frente a *E. coli* y de 50  $\mu\text{M}$  frente a *S. aureus*.
3. Ninguno de los péptidos presentó actividad antifúngica a las concentraciones evaluadas en este estudio.
4. La concentración mínima hemolítica del 41781 fue de 100  $\mu\text{M}$ , ocho veces mayor que la CMI frente a *E. coli*, mientras que la CMH del 23688 fue de 12,5  $\mu\text{M}$  (igual a la CMI).
5. Los péptidos 23688 y 41781 fueron citotóxicos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  ocho veces mayor que la CMI sobre *E. coli*.

## Perspectivas

- Evaluar la actividad del péptido 41781 sobre otras ATCC Gram-negativas y Gram-positivas, así como, sobre aislados clínicos con diferentes perfiles de resistencia.
- Evaluar la estabilidad del péptido 41781.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido 41781 asociado a nanopartículas biodegradables como el quitosano, así como con nanopartículas metálicas, en búsqueda de mejorar aún más su actividad antimicrobiana.
- Determinar la actividad antibiofilm del péptido 41781 sobre microorganismos formadores de biofilm.

## Referencias

- Aldama, P. C. (2019). Normas de prevención y control de brotes infecciosos intrahospitalarios (3a parte).
- Alonso Geli, Y., del Toro García, G., Falcón Dieguez, J. E., & Valdés Rodríguez, Y. C. (2005). Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(1), 1-1.
- Alvarez, M. D. L. A., Zarelli, V. E., Pappano, N. B., & Debattista, N. B. (2004). Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. *J Biocell*, 28(1), 31-34.
- Angles, E. J. R. M. H. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana: ¿hacia dónde vamos? , 29(1), 3-4.
- Arredondo, J. L., & Damián, R. F. (2000). *Temas actuales en infectología*. Retrieved from
- Barbosa-Rengifo, M. M., Morales-Plaza, C. D., Amézquita-Abello, M. C., & Martínez-Buitrago, D. M. J. R. C. d. O. y. G. (2016). Vigilancia de morbilidad materna extrema en una institución de referencia en Cali, Colombia, 2013-2014. 67(3), 207-214.
- Barbosa Pelegrini, P., del Sarto, R. P., Silva, O. N., Franco, O. L., & Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry research international*, 2011.
- Barreto-Santamaría, A. (2019). *Evaluación de la actividad antibacteriana y citotóxica de péptidos derivados de la secuencia PfRif (321-340): RYRRKKMKKALQYIKLLKE*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá,
- Barreto-Santamaría, A., Curtidor, H., Arévalo-Pinzón, G., Herrera, C., Suárez, D., Pérez, W. H., & Patarroyo, M. E. J. F. i. m. (2016). A new synthetic peptide having two target of antibacterial action in *E. coli* ML35. 7, 2006.
- Barreto-Santamaría, A., Patarroyo, M. E., & Curtidor, H. (2019). Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 56(6), 351-373. doi:10.1080/10408363.2019.1631249
- Barreto-Santamaría, A., Rivera, Z. J., García, J. E., Curtidor, H., Patarroyo, M. E., Patarroyo, M. A., & Arévalo-Pinzón, G. J. M. (2020). Shorter Antibacterial Peptide Having High Selectivity for *E. coli* Membranes and Low Potential for Inducing Resistance. 8(6), 867.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C., Astilean, A. J. A. o. c. m., & antimicrobials. (2013). New antibiotics for bad bugs: where are we? , 12(1), 22.
- Bastidaa, M. T., Valverdeb, M., Smithsonb, A., & Marcoc, F. sepsis fulminante por *C. canimorsus* valorando la potencial utilidad diagnóstica de MALDI-TOF. Se trata de una mujer de 78 años sin hábitos tóxicos ni antecedentes epidemiológicos, afectada de diabetes mellitus, que consultó por alteración del nivel de conciencia y fiebre de pocas.
- Berdize, N., Eiró, N., González, L. O., Juan, G., & Vizoso, F. (2015). Análisis de factores celulares y moleculares de la frontera tumoral relacionados con la afectación de los ganglios centinela y no centinela en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 28(4), 160-167.
- Buitrago, E. M., Hernández, C., Pallares, C., Pacheco, R., Hurtado, K., & Recalde, M. J. I. (2014). Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali-Colombia. 18(1), 3-11.
- Cabello-Ruiz, E. D., Núñez-González, M. A., & Torres de la Cruz, V. M. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. *Omnia Science Monographs*.

- Calderón Rojas, G., & Aguilar Ulate, L. J. R. M. d. C. R. Y. C. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *73*(621), 757-763.
- Camargo, C. M., López, V., & Groot, H. J. H. A. C. U. (2014). El secreto antimicrobiano de las histonas. (16), 14-16.
- Camargo, P., & Serrano, A. (2013). *Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos 29009 y 23688 sobre Staphylococcus aureus ATCC 29213 y Escherichia coli ATCC 35218*. (Bacteriología y Laboratorio clínico), Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia.
- Cardoso, M. H., Orozco, R. Q., Rezende, S. B., Rodrigues, G., Oshiro, K. G. N., Candido, E. S., & Franco, O. L. (2019). Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? *Front Microbiol*, *10*, 3097. doi:10.3389/fmicb.2019.03097
- Carrascoza, F., Zaric, S., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2014). Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited. *Journal of Molecular Graphics Modelling*, *50*, 125-133.
- Carreño, L. F., & Lozano, J. M. (2013). Exploración estructural de perfiles de actividad antibacteriana y hemolítica de análogos no naturales del péptido antimicrobiano Mastoparán MP-8. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *42*(1), 56-79.
- Cassana Rojas, L. R. (2016). Eficacia antibacteriana in vitro del gel natural de Aloe Barbadensis, Clorhexidina e hidroxido de Calcio sobre enterococcus faecalis ATCC 29212.
- Causse, M., de Luna, F. F.-Á., García-Mayorgas, A., Rodríguez, F., & Casal, M. J. R. E. Q. (2006). Sensibilidad a los antimicrobianos de Enterococcus faecalis aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España). *19*(2), 140-143.
- Celis Bustos, Y. A., Rubio, V. V., & Camacho Navarro, M. M. J. R. C. d. B. (2017). Evolutionary origin of antibiotic resistance, a historical perspective. *19*(2), 105-117.
- Chang, Y.-R., Lee, H.-Y., Chen, K., Chang, C.-C., Tsai, D.-S., Fu, C.-C., . . . Han, C.-C. (2008). Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nature nanotechnology*, *3*(5), 284-288.
- Chávez-Jacobo, V. M. J. T. R. E. e. C. Q.-B. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *23*.
- Chávez Salinas, S., Reyes, C., Sánchez Ovando, T., Valdes Pérez, N. J., Barrales Cureño, H. J., Cortes Ruiz, J. A., . . . López Valdez, L. G. (2018). Cuantificación de la efectividad de la indolicidina y protegrina-4 por medio de análisis de parámetros cinéticos. *Mexican journal of biotechnology*, *3*(1), 23-42.
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J Biol Chem*, *280*(13), 12316-12329. doi:10.1074/jbc.M413406200
- Correa Armijos, C. A. (2019). Incidencia de resistencia bacteriana en pacientes con bacteriemia en el hospital teófilo dávila en el año 2018.
- Correa Gómez, E. (2012). Evaluación de péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos. *Escuela de Biociencias*.
- Cortés, J., Álvarez, C., & Leal Al, G. J. C. M. I. (2004). Antimicrobial resistance in big hospitals in Bogota, Colombia, 2001-2003. *10*(S3), 1-86.
- Cowan, M. K. (2018). *Microbiology: a systems approach*: McGraw-Hill.
- Cubas Alberca, N. L., & Huaripata Vásquez, Y. E. (2019). Susceptibilidad Bacteriana en Cultivos de Pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2016-2018.
- de Juan Martín, F. J. B. d. I. S. d. P. d. A., La Rioja y Soria. (2020). Enfermedades infecciosas en pediatría: cambios y avances en los últimos 50 años. (50), 34-38.
- Del Cerro, C. (2015). Desarrollo de herramientas moleculares para la producción de policétidos y péptidos no ribosomales.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, *89*(2), 271-277.
- Díaz-Ramírez, M., Salgado-Cruz, M. d. I. P., Medellín-Cruz, L. d. C., Cruz-Monterrosa, R., Rayas-Amor, A., Jiménez-Guzmán, J., & Cortés-Sánchez, A. D. J. J. A. (2018). ALIMENTOS ARTESANALES MEXICANOS: ASPECTOS NUTRIMENTALES. *11*(11), 59-65.

- Diseases, I. D. S. o. A. J. C. I. (2010). The 10x'20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *50*(8), 1081-1083.
- Dresler, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. J. s. p. d. m. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *50*, S480-S487.
- Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2018). Dissection of the antimicrobial and hemolytic activity of Cap18: Generation of Cap18 derivatives with enhanced specificity. *PLoS One*, *13*(5), e0197742. doi:10.1371/journal.pone.0197742
- Edwards, I. A., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Zuegg, J., Blaskovich, M. A., & Cooper, M. A. (2016). Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of beta-Hairpin Peptides. *ACS Infect Dis*, *2*(6), 442-450. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00045
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(1), 140-144. doi:10.1073/pnas.81.1.140
- Escobar, L., Rivera, A., & Aristizábal, F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, *17*(1), 67-74.
- Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Pascual, Á., Grupo, G., Garduño, E., Pérez, P. H., . . . Marí, J. M. N. J. E. I. y. M. C. (2019). Evolución de la resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de infecciones invasivas en el sur de España.
- Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. J. R. C. d. M. M. (2003). Resistencia bacteriana. *32*(1), 0-0.
- Fonte-Carballo, L., Gonzalez-Paramas, A. M., Rodríguez-de la Cruz, D., Diaz-Solares, M., Morales-Querol, D., Gonzalez-Sierra, L., . . . Lugo-Morales, Y. J. P. y. F. (2019). Quantification of free proline in the diet of the stingless bee livestock of the Matanzas and Mayabeque provinces. *42*(3), 204-208.
- Food, K. J. F. C. M., Seoul. (2016). Drug Administration (KFDA). 2009. 212-251.
- García, E., & López, R. J. R. E. d. Q. (2002). Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *15*(4), 306-312.
- García, M. G., Galán, I. J. S. J., & Vicente, I. F. E. M. J. R. C. d. M. T. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *69*(2), 1-13.
- Geitani, R., Moubareck, C. A., Xu, Z., Karam Sarkis, D., & Touqui, L. (2020). Expression and Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Defense of Airway Mucosa: Potential Implication in Cystic Fibrosis. *Front Immunol*, *11*, 1198. doi:10.3389/fimmu.2020.01198
- Giménez-Forcada, E., & Delgado, S. O. J. E. d. I. C. d. I. T. (2020). Geología médica: ¿ un nuevo espacio científico? , *27*(2), 140-140.
- González García, M., Javier San Juan Galán, II Fidel Ernesto Morales Vicente III Anselmo J. Otero González I. (2017). Antimicrobial peptides: their therapeutic potential. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Gopalakrishnan, S., Chakraborty, A., & Mahapatra, D. R. (2007). *Spectral finite element method: wave propagation, diagnostics and control in anisotropic and inhomogeneous structures*: Springer Science & Business Media.
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. J. A. h. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria— A review. *120*(4), 303-311.
- Guevara Agudelo, F. A. J. I. d. G. (2017). Evaluación de la actividad antibiopelícula de péptidos sintéticos análogos a catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. en Bogotá Colombia.
- Guirao Abad, J. P. J. P. d. i. (2016). Acción de validamicina A y los antifúngicos de uso clínico, micafungina y anfotericina B, sobre *Candida albicans*.
- Haddad, E., Whitfill, C., Ricks, C., Fredericksen, T., Rowe, D., Owen, L., . . . Thoma, J. (1994). Adaptation of the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. *Avian Diseases*, *755*-761.
- Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *26*(6), 753-763.
- Hollmann, A., Martinez, M., Noguera, M. E., Augusto, M. T., Disalvo, A., Santos, N. C., . . . Maffia, P. C. (2016). Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *141*, 528-536. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003



- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*, *1*(2), 143-152. doi:10.1007/s13238-010-0004-3
- Huerta-Cantillo, J., & Navarro-García, F. (2016). Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *J Investigación en Discapacidad*, *5*(2), 96-115.
- Humphries, R. M., Hindler, J. A., Shaffer, K., & Campeau, S. A. (2019). Evaluation of ciprofloxacin and levofloxacin disk diffusion and Etest using the 2019 Enterobacteriaceae CLSI breakpoints. *Journal of clinical microbiology*, *57*(3), e01797-01718.
- Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A., . . . control, i. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *2*(1), 31.
- Jaramillo, H. N., & Patiño, P. J. . (2006). Estructura de la membrana celular. In F. E. Biogénesis (Ed.).
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, *19*(3), 491-511. doi:10.1128/CMR.00056-05
- Julca Medina, Y. A. (2015). Determinación de la concentración mínima bactericida de los antibióticos virginiamicina, ampicilina y el extracto de lúpulo sobre *Lactobacillus* sp aislado del mosto de fermentación de la destilería de AGROINDUSTRIAS SAN JACINTO SAA.
- Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, K. L., & Hahm, K.-s. (1996). Structure–biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *J International journal of peptide protein research*, *48*(4), 357-363.
- Karp, B. E., Tate, H., Plumblee, J. R., Dessai, U., Whichard, J. M., Thacker, E. L., . . . disease. (2017). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: two decades of advancing public health through integrated surveillance of antimicrobial resistance. *14*(10), 545-557.
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2014). De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *J Antimicrob Chemother*, *69*(1), 121-132. doi:10.1093/jac/dkt322
- Kosikowska, P., & Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat*, *26*(6), 689-702. doi:10.1080/13543776.2016.1176149
- la Fuente-Salcido, D., Margarita, N., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. J. R. m. d. c. f. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *46*(2), 7-16.
- Lanternier, F., Boutboul, D., Menotti, J., Chandesris, M., Sarfati, C., Mamzer Bruneel, M., . . . Lecuit, M. J. T. I. D. (2009). Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bienersi* cases and review. *11*(1), 83-88.
- Lata, S., Sharma, B. K., & Raghava, G. P. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, *8*, 263. doi:10.1186/1471-2105-8-263
- Laura Cati, R. R. (2019). Factores asociados a multirresistencia antimicrobiana en neumonía intrahospitalaria Hospital Alberto Sabogal Sologuren Essalud 2017.
- Lawe Davies, O., & Bennet, S. L. OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.[Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [citado 29 de mayo de 2019]. In.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci*, *11*, 73. doi:10.3389/fnins.2017.00073
- Li, P., Sun, M., Wohland, T., Yang, D., Ho, B., & Ding, J. L. (2006). Molecular mechanisms that govern the specificity of Sushi peptides for Gram-negative bacterial membrane lipids. *Biochemistry*, *45*(35), 10554-10562. doi:10.1021/bi0602765
- Li, Q., Quan, L., Lyu, J., He, Z., Wang, X., Meng, J., . . . Li, H. J. O. (2016). Discovery of peptide inhibitors targeting human programmed death 1 (PD-1) receptor. *7*(40), 64967.
- López-Amor, A. J. D. c. (2016). ¿ Fin de la resistencia bacteriana? , 12.
- López-Pueyo, M., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., & Garnacho-Montero, J. J. M. I. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *35*(1), 41-53.
- Lozada-Requena, I., & Núñez Ponce, C. J. R. P. d. M. E. y. S. P. (2020). COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. *37*, 312-319.
- Lucana Nina, M. R., & Huanca Espinoza, R. M. J. R. d. A. C. I. (2014). Estructura bacteriana. *49*, 2589.
- Luz Mínguez, C. (2020). Actividad antifúngica y antitoxigénica in vitro y en alimentos de bacterias ácido lácticas.

- Martín Quirós, A. (2014). Desarrollo de péptidos fotoconmutables para el control de la actividad celular.
- Martínez-González, A. E., & Andreo-Martínez, P. J. R. d. P. y. S. M. (2020). Prebióticos, probióticos y trasplante de microbiota fecal en el autismo: una revisión sistemática.
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1788(8), 1687-1692. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.013
- Merino, M. C., & Gruppi, A. J. M. (2006). Origin and development of B1 lymphocytes. A cell population involved in defence and autoimmunity. *66*(2), 165-172.
- Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2012). Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1818(5), 1274-1283. doi:10.1016/j.bbamem.2012.01.016
- Mirabal Nápoles, M., Rodríguez Sánchez, J., Guerrero Ramírez, M., & Álvarez Muñoz, M. Modelo teórico para la evaluación de impacto en programas de salud pública. *Rev Hum Med [Internet]*. 2012 Ago [citado 13 Jul 2018]; 12 (2): 167-183. In.
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr Opin Chem Biol*, 38, 87-96. doi:10.1016/j.cbpa.2017.03.014
- Mitchell, M. E., Alders, R., Unger, F., Nguyen-Viet, H., Le, T. T. H., & Toribio, J.-A. J. B. p. h. (2020). The challenges of investigating antimicrobial resistance in Vietnam-what benefits does a One Health approach offer the animal and human health sectors? , 20(1), 1-12.
- Molina Garcés, D. D. (2020). *Caracterización de la microbiota de un producto probiótico*. Quito,
- Mora, A., & Fabián, R. (2019). *Determinación de la actividad anti fúngica de extractos de lantana camara frente a candida albicans*. Quito: UCE,
- Murray, C. J., & Lopez, A. D. J. T. I. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *349*(9064), 1498-1504.
- Needham, B. D., & Trent, M. S. (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 11(7), 467-481. doi:10.1038/nrmicro3047
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 593-656. doi:10.1128/mmb.67.4.593-656.2003
- Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., del Carmen Galicia-Sánchez, M., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., & Sánchez, J. I. J. G. m. d. M. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *154*(6), 681-688.
- Ondrus, A. E. (2020). Reporting Summary.
- Ortega Campos, J. F. (2020). Estudio fisicoquímico y biológico de complejos metálicos de platino y paladio con ligantes bioactivos contra Trypanosoma cruzi.
- Pérez López, E. M. (2020). Problemática de las enterobacterias productoras de carbapenemasas. Trabajo de revisión bibliográfica.
- Pírez, M., & Mota, M. J. T. d. b. y. v. m. (2006). Morfología y estructura bacteriana.
- Pontón, J. J. R. I. d. M. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *25*(2), 78-82.
- Porras Díaz, Y. N., & Salgado García, D. X. (2017). Perfil de susceptibilidad in vitro de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos frente a colistina, tigeciclina y fosfomicina.
- Quiñones Pérez, D. J. R. C. d. M. T. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *69*(3), 1-17.
- Ramalingam, B., Parandhaman, T., & Das, S. K. (2016). Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(7), 4963-4976. doi:10.1021/acsami.6b00161
- Rello, J., Eshwara, V. K., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R. G., Conway-Morris, A., . . . Zhang, Z. (2019). A global priority list of the TOP TEN resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 38(2), 319-323.
- Reyes, R. E., Saad, H. R., Galicia, C. S., Herrera, M. O., & Jiménez, R. C. J. R. L. d. M. (2009). Involved mechanisms in the variability of gram-negative bacteria O antigen. *51*(1-2), 32-43.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006a). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud pública de México*, 48(1), 62-71.

- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. J. S. p. d. M. (2006b). Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. *48*(1), 62-71.
- Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., & Desgarenes, C. P. J. D. R. M. (2007). Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *51*(2), 57-67.
- Rodríguez-Riera, Z., Tolón-Murguía, B. I., & López-López, M. A. J. R. C. C. B. (2013). Antibióticos cefalosporánicos: Actualidades y perspectivas. *44*(1).
- Rodríguez de Santiago, E., García García de Paredes, A., Ferre Aracil, C., Aguilera Castro, L., & López San Román, A. J. R. a. c. (2015). Trasplante de microbiota fecal: Indicaciones, metodología y perspectivas futuras. 225-234.
- Rodríguez, N. D. L. C., & Santa Vélez, C. J. C. M. (2012). FACTORES DE VIRULENCIA PARA LA INFECCIÓN DE TEJIDOS QUERATINIZADOS POR CANDIDA ALBICANS Y HONGOS DERMATOFITOS (Virulence factors of *Candida albicans* and dermatophytes in keratinized tissues infection). *26*(1), 43-55.
- Rodríguez, P. N. (2019). *Mecanismos de resistencia a azoles en especies de candida no-albicans*. Universitat Rovira i Virgili,
- Romero-Prada, M., Marrugo-Figueroa, R., Acero, G., Arango-Bautista, C., & Alvis-Guzmán, N. J. G. y. P. d. S. (2014). Impacto en el acceso a medicamentos en la población colombiana después de la actualización del plan de beneficios en el 2012. *13*(27).
- Romero García, J. L. (2018). Resistencias a diferentes antimicrobianos en cepas bacterianas procedentes de pescado.
- Rondón Pérez, R. G. (2013). Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas.
- Sánchez, A. T., & Ortega, T. d. J. A. J. N. (2016). Carne y productos cárnicos como fuente de péptidos bioactivos. *10*(2), 49-58.
- Sanchez Perez, J. A. (2019). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*-Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" UNMSM.
- Santos, N., Anzola, Y., Forero, S., & Forero, W. J. R. M. T. (2020). Cuatro tendencias nanotecnológicas que revolucionarán la medicina en Colombia. *11*.
- Segundo-Arizmendi, N., Hernández-Baltazar, E., Villegas, O., & Torres-Angeles, O. (2015). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia).
- Seija, V., & Vignoli, R. J. T. d. b. y. v. M. (2006). Principales grupos de antibióticos. *2*, 631-633.
- Serrano Machuca, J. J., Villarreal Ríos, E., Galicia Rodríguez, L., Vargas Daza, E. R., Martínez González, L., & Mejía Damián, A. F. J. R. P. d. S. P. (2009). Detección de anticuerpos circulantes en donantes de sangre en México. *26*, 355-359.
- Shehata, A. M., El-Ghattas, A., Kamel, M., Aly, A. M., & Hassan, A. (2012). *Overview of Polymer Flooding (EOR) in North Africa Fields-Elements of Designing a New Polymer/Surfactant Flood Offshore (Case Study)*. Paper presented at the North Africa Technical Conference and Exhibition.
- Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2014). Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Mini-protein Structure Prediction. *J Chem Theory Comput*, *10*(10), 4745-4758. doi:10.1021/ct500592m
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., . . . Fiddes, J. C. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother*, *41*(8), 1738-1742. doi:10.1128/AAC.41.8.1738
- Sun, S., Zhao, G., Huang, Y., Cai, M., Shan, Y., Wang, H., & Chen, Y. (2016). Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy. *Sci Rep*, *6*, 29145. doi:10.1038/srep29145
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. J. I. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *12*(3).
- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Padrão, J., Ribeiro, A. I., Zille, A., Amorim, M. T. P., . . . Felgueiras, H. P. J. A. (2020). Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *9*(6), 314.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. J. I. (2010). Péptidos antimicrobianos. *14*(1), 55-67.
- Terzolo, H. R., Paolicchi, F. A., Sandoval, V. E., Blackall, P., Yamaguchi, T., & Iritani, Y. J. A. d. (1993). Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. 310-314.

- Vaezi, Z., Bortolotti, A., Luca, V., Perilli, G., Mangoni, M. L., Khosravi-Far, R., . . . Stella, L. J. B. e. B. A.-B. (2020). Aggregation determines the selectivity of membrane-active anticancer and antimicrobial peptides: The case of killerFLIP. *1862*(2), 183107.
- Vardanian, A., Kurzbaum, E., Farber, Y., Butnariu, M., & Armon, R. J. F. m. (2018). Facilitated enumeration of the silicate bacterium *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov.(formerly *Bacillus mucilaginosus*) via tetrazolium chloride incorporation into a double agar-based solid growth medium. *63*(3), 401-404.
- Vargas-Flores, T., & Kuno-Vargas, A. (2015). Morfología bacteriana.
- Vélez, R., Jaramillo-Jaramillo, C., & Vélez, E. J. F.-U. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *2*(2), 31-39.
- Viteri Dávila, C. I. (2020). *Actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de Hyloscirtus lindae e Hyloscirtus pantostictus (Anura: Hylidae) sobre cepas tipo de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras*. PUCE-Quito,
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P., & Idicula-Thomas, S. (2016). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*, *44*(D1), D1094-1097. doi:10.1093/nar/gkv1051
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, *44*(D1), D1087-D1093.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. J. N. p. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *3*(2), 163.
- Xhindoli, D., Pacor, S., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., & Tossi, A. (2016). The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim Biophys Acta*, *1858*(3), 546-566. doi:10.1016/j.bbamem.2015.11.003
- Yáñez, G. I., & Velasteguí, J. R. (2014). INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES FRENTE A LOS MICROORGANISMOS.
- Zelezetsky, I., Pacor, S., Pag, U., Papo, N., Shai, Y., Sahl, H.-G., & Tossi, A. (2005). Controlled alteration of the shape and conformational stability of  $\alpha$ -helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. *Biochemical Journal*, *390*(1), 177-188.
- Zhao, D., Lu, K., Liu, G., Hou, J., Yuan, L., Ma, L., . . . He, J. (2020). PEP-FOLD design, synthesis, and characteristics of finger-like polypeptides. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, *224*, 117401.
- Zhao, J., Zhao, C., Liang, G., Zhang, M., & Zheng, J. (2013). Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities. *Journal of chemical information modeling*, *53*(12), 3280-3296.