



Efecto de los péptidos antimicrobianos derivados del LL37 en el crecimiento bacteriano y evaluación de la formación de biopelícula en cepas clínicas y ATCC de bacilos Gram negativos

Presentado por:

Jennifer Pasachova Garzón

Sara Ramírez Martínez

Asesora interna:

M.Sc. Liliana Constanza Muñoz Molina

Bacteriología y laboratorio clínico

Bogotá D.C 2019

Introducción



- **Infecciones asociadas a la atención en salud**
- **Enfermedades nosocomiales**
- **Unidad de cuidados intensivos**



1. ***E.coli***
Betalactamasas de clase C (Amp C)
2. ***K. pneumonia***
Carbapenemases (KPCs)
3. ***C. freundii***
Betalactamasas de tipo BLEE, AmpC y KPC
4. ***Proteus spp***
Betalactamasas de clase A
5. ***Salmonella spp***
Betalactamasas tipo BLEE

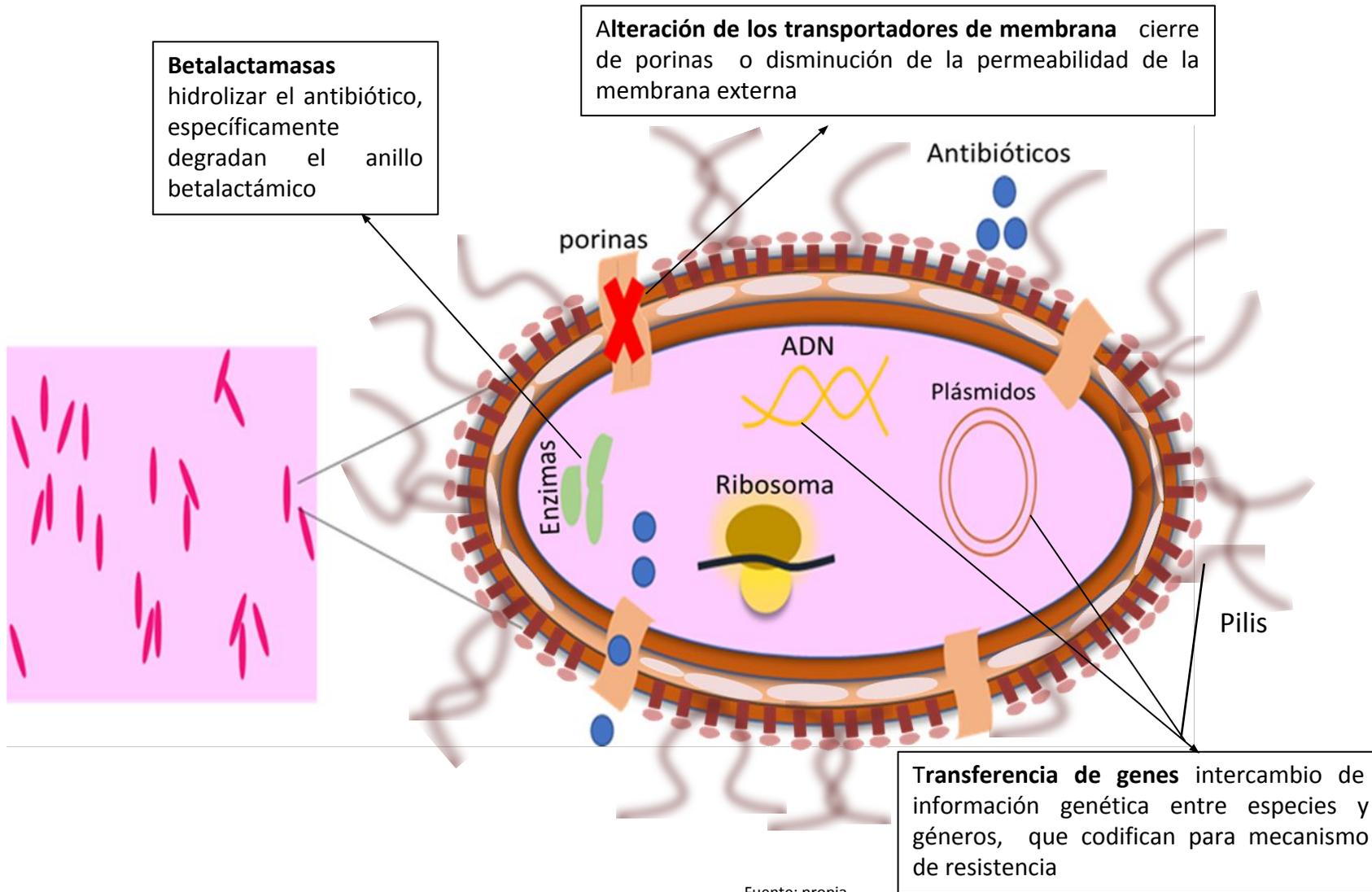


6. ***Yersinia spp***
Betalactamasas
7. ***Pseudomonas spp***
Bombas de expulsión, la transferencia horizontal de genes, producción de biopelícula
8. ***Acinetobacter spp***
Betalactamasas, las PMQR y las bombas de expulsión
9. ***Burkholderia spp***
betalactamasas clase AmpC, de bombas de flujo

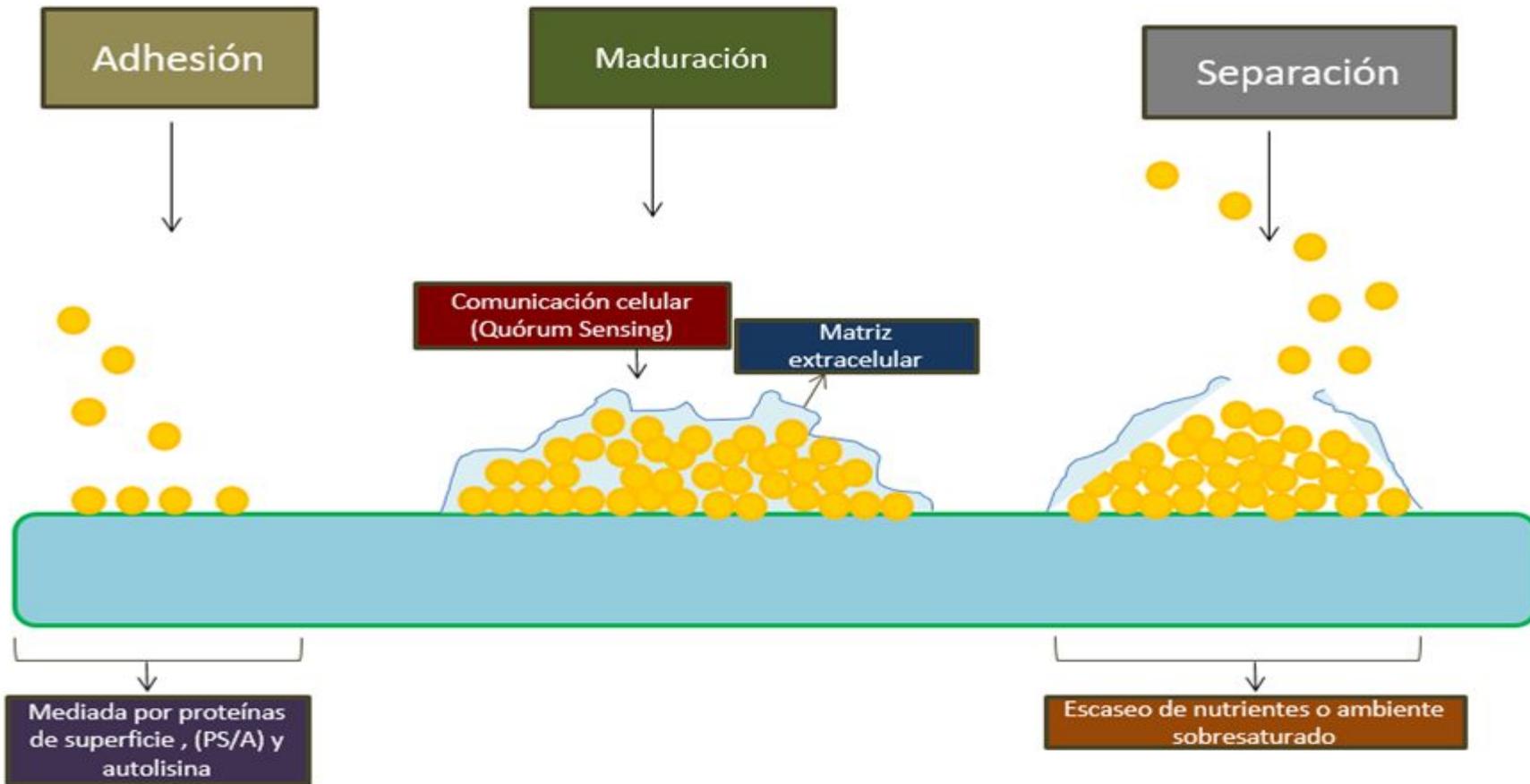


Péptidos antimicrobianos como terapia alternativa al tratamiento convencional

MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA



ETAPAS DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

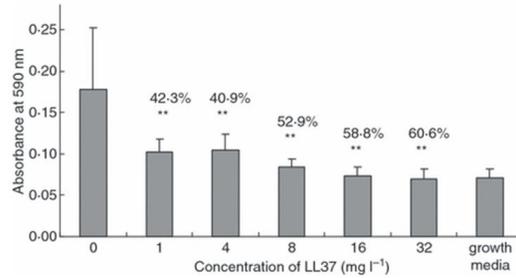


Fuente: propia

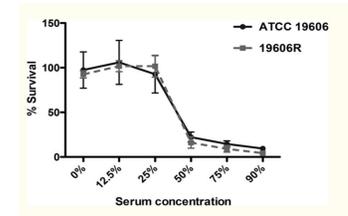
PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS



María Victoria O (2017)

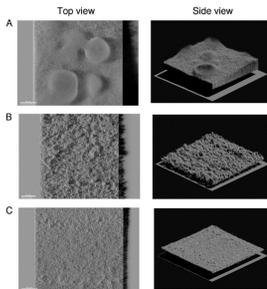


Hell E, y col (2010)

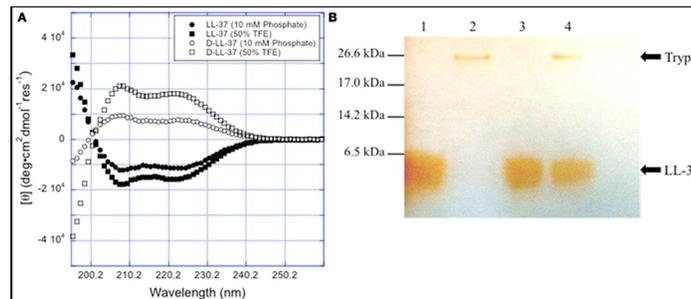


Moffatt J, (2013)

Verhage, J y col (2008)



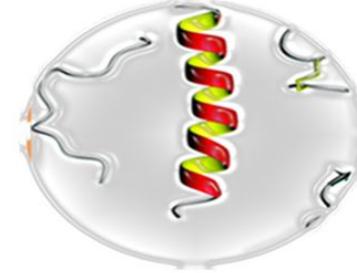
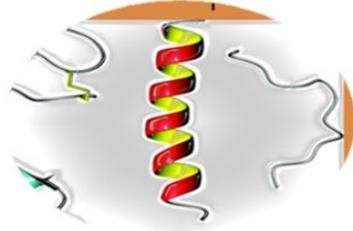
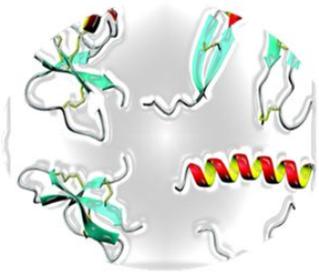
Dean S, y col (2011)



PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

LL37

D-LL37



1922 Alexander Fleming

1980 primeros trabajos

2000 péptidos hasta el año 2016

Clasificados según su estructura y aminoácidos

Precursora hCAP-18

Gen cromosoma 3

37 residuos leu-leu

Estructura α helicoidal, catiónico

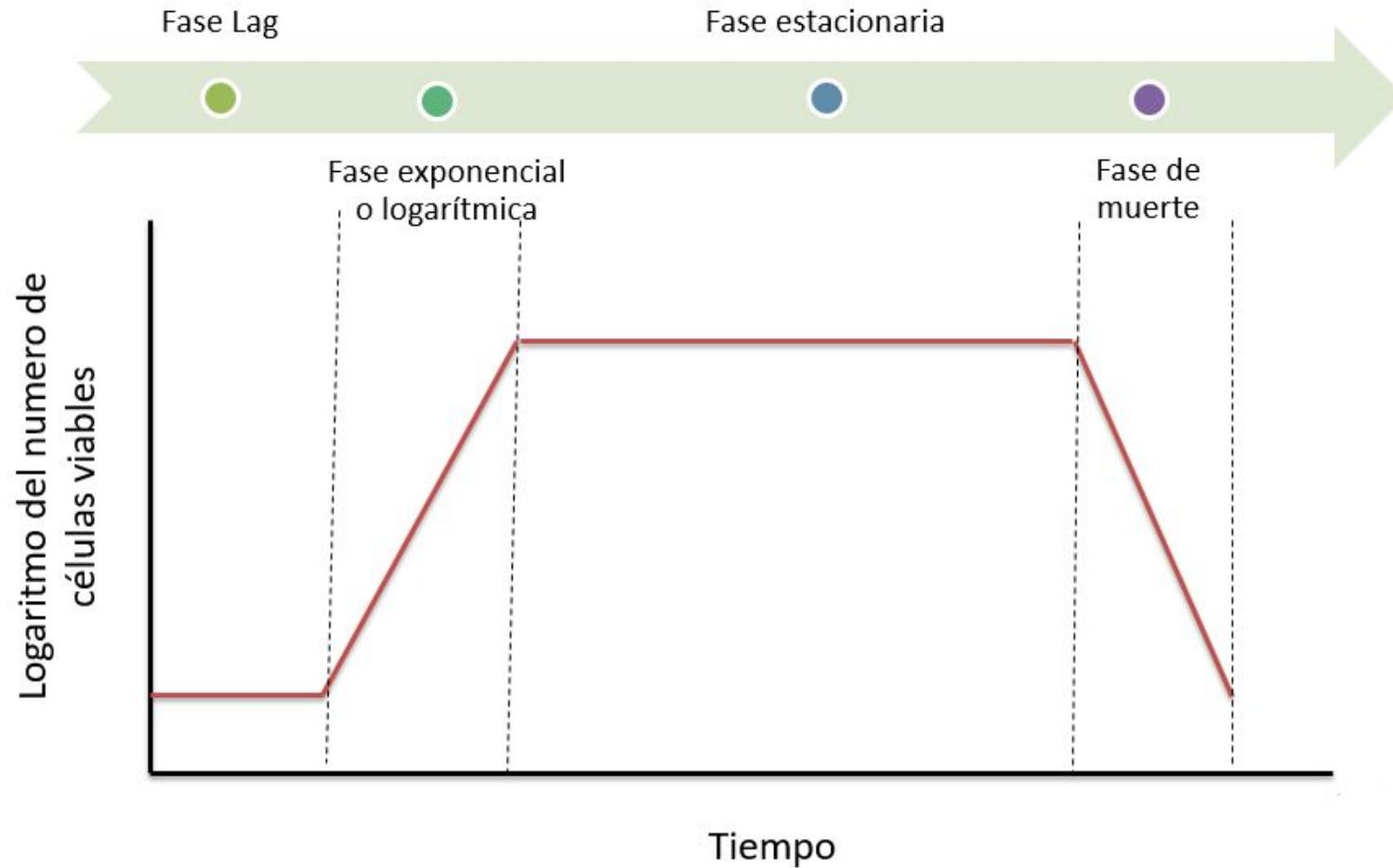
Producido por leucocitos, células del epitelio

Alta resistencia a las proteasas

Disminución en la citotoxicidad

mayor actividad inmunomoduladora

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO



Fuente: propia

Objetivo general

Identificar el efecto de los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC-2, D-LL37 y LL-37 en el crecimiento bacteriano de cepas clínicas y cepas ATCC de bacilos Gram negativos, así como evaluar la formación de biopelícula que producen cada uno de estos microorganismos.

Objetivos específicos

Evaluar el crecimiento que tienen los bacilos Gram negativo *E. coli spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.* y *Yersinia spp.*, en presencia de los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC-2, D-LL37 y LL-37.

Hacer una comparación entre cada uno de los péptidos utilizados, para determinar cuál de estos tiene mejor efecto inhibitorio, y a que concentración mínima actúan sobre cada una de las cepas

Evaluar la formación de la biopelícula producida por las cepas clínicas y ATCC de bacilos Gram negativos *E. coli spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.*,

Materiales y métodos

Cepas ATCC y cepas clínicas

Cepas ATCC

Escherichia coli

- *E. coli* 18239
- *E. coli* nativa

Citrobacter

- *C. freundii* nativa

Yersinia

- *Y. enterocolitica* 23715
- *Y. kristensenii* 33639

Proteus

- *P. vulgaris* 6380

Pseudomonas

- *P. aeruginosa* 9027
- *P. aeruginosa* nativa
- *P. putida* 31483
- *P. aeruginosa* PA01

Cepas ATCC

Burkholderia

- *B. cepacia* 25608

Salmonella

- *S. enterica* serovar Typhimurium 14028
- *S. typhi* nativa

Acinetobacter

- *Acinetobacter* sp. 49137
- *A. baumannii* nativa

Klebsiella

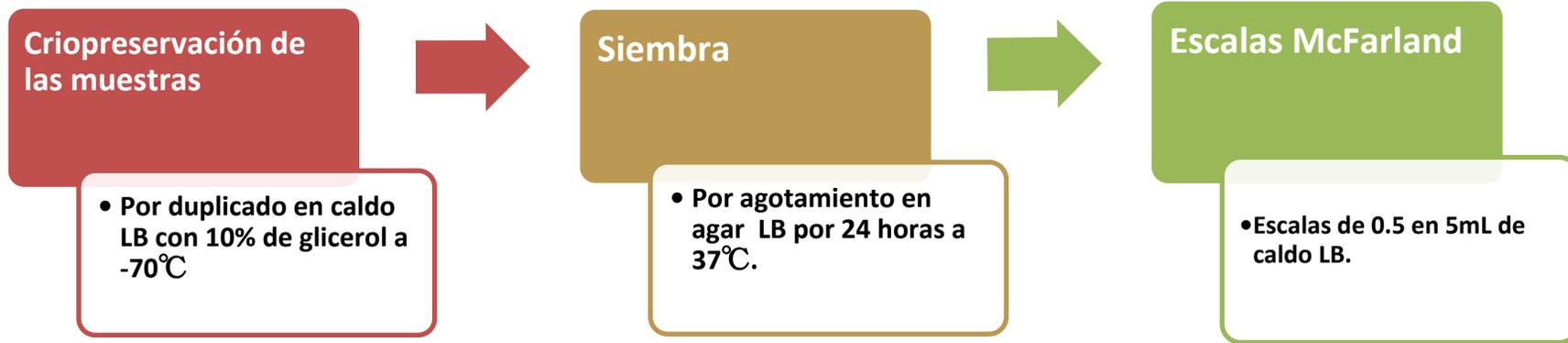
- *K. pneumoniae* 1705
- *K. pneumoniae* 1706

Cepas clínicas

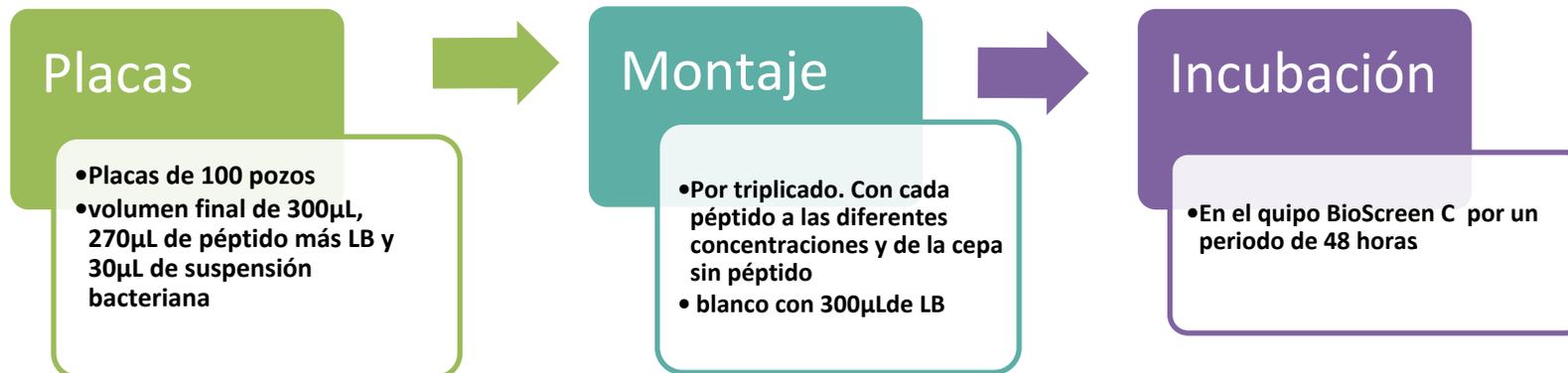
- *E. coli* hemocultivo
- *P. aeruginosa* hemocultivo
- *K. pneumoniae* hemocultivo

Metodología curvas de crecimiento

Preparación de las cepas



Curvas de crecimiento



Análisis estadístico



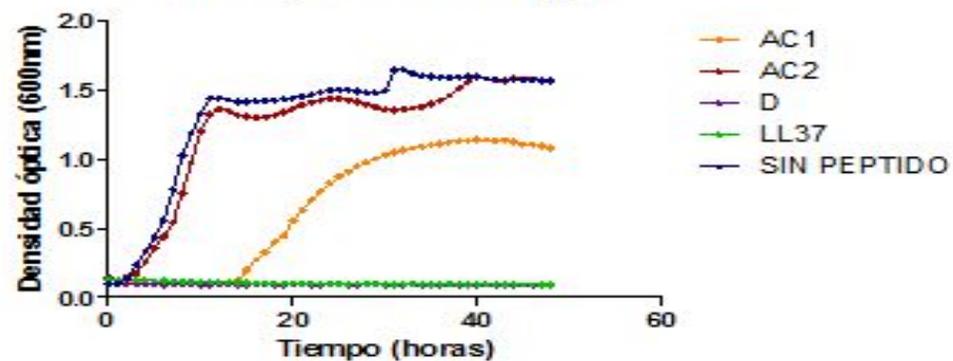
Cálculo de la desviación estándar
Coeficiente de variación



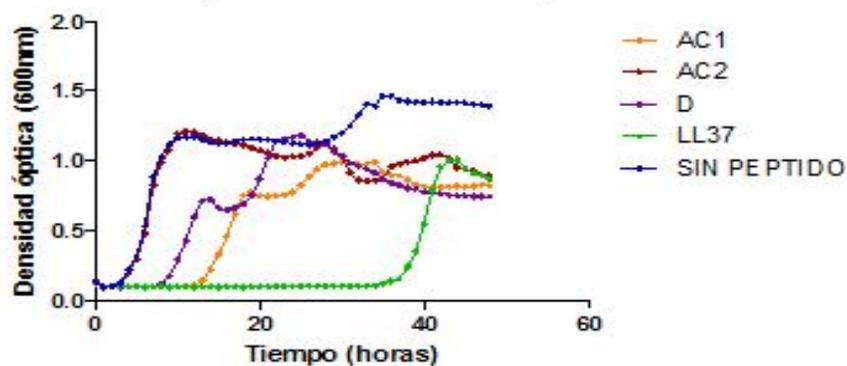
One-way ANOVA
Two way ANOVA.



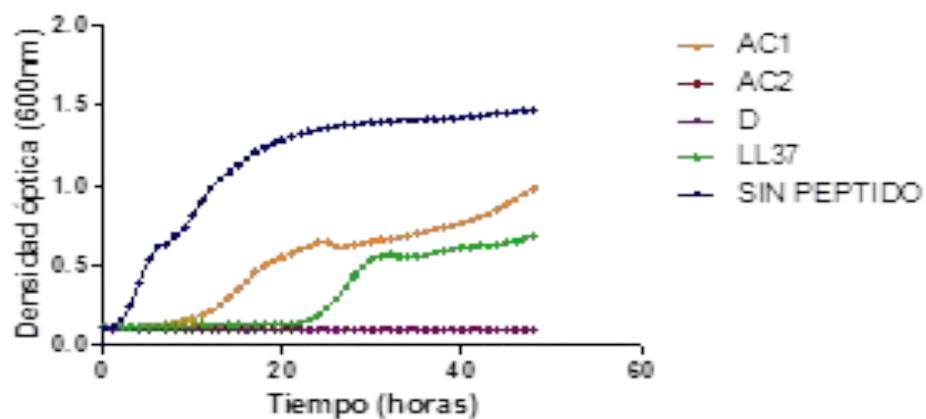
P. aeruginosa nativa 5 μ M



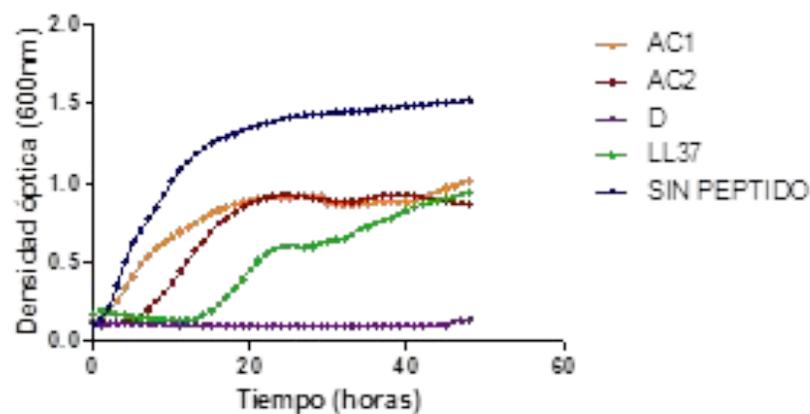
P. aeruginosa hemocultivo 5 μ M



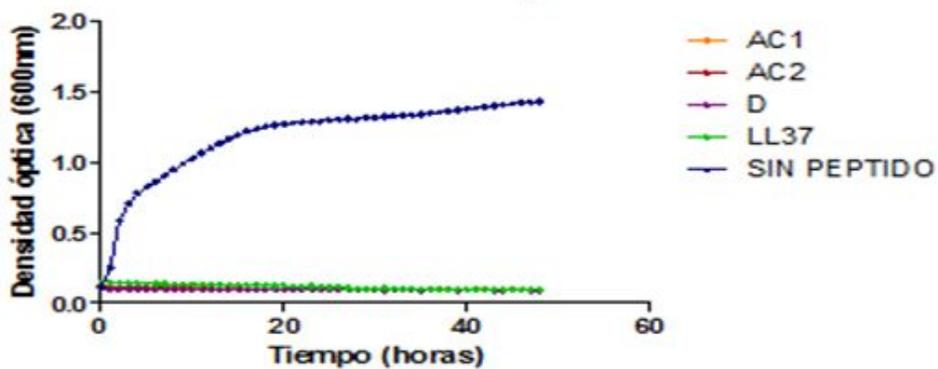
Y. kristensenii ATCC 33639 5 μ M



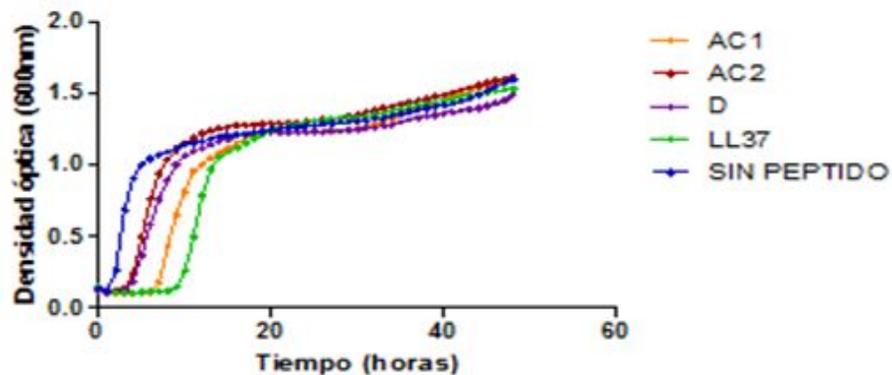
Y. enterocolitica ATCC 23715 5 μ M



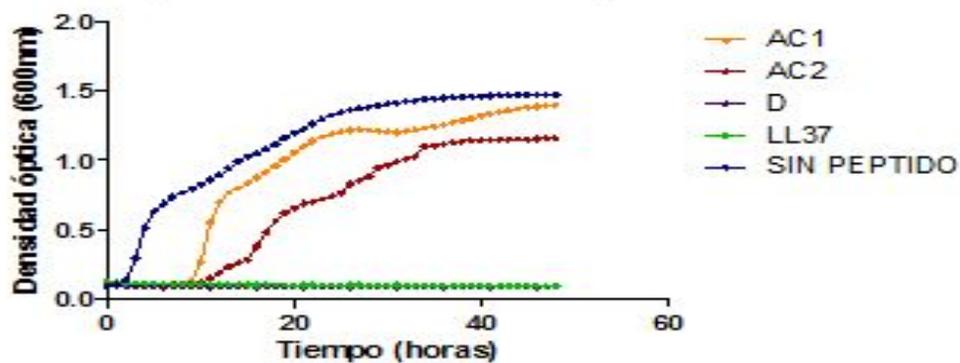
E. coli ATCC 18239 5 μ M



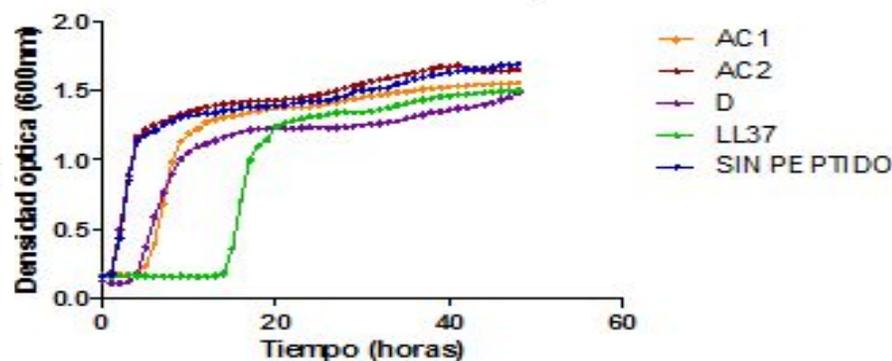
E. coli hemocultivo 5 μ M



K. pneumoniae ATCC 1706 5 μ M



Klebsiella hemocultivo 5 μ M



Significancia estadística

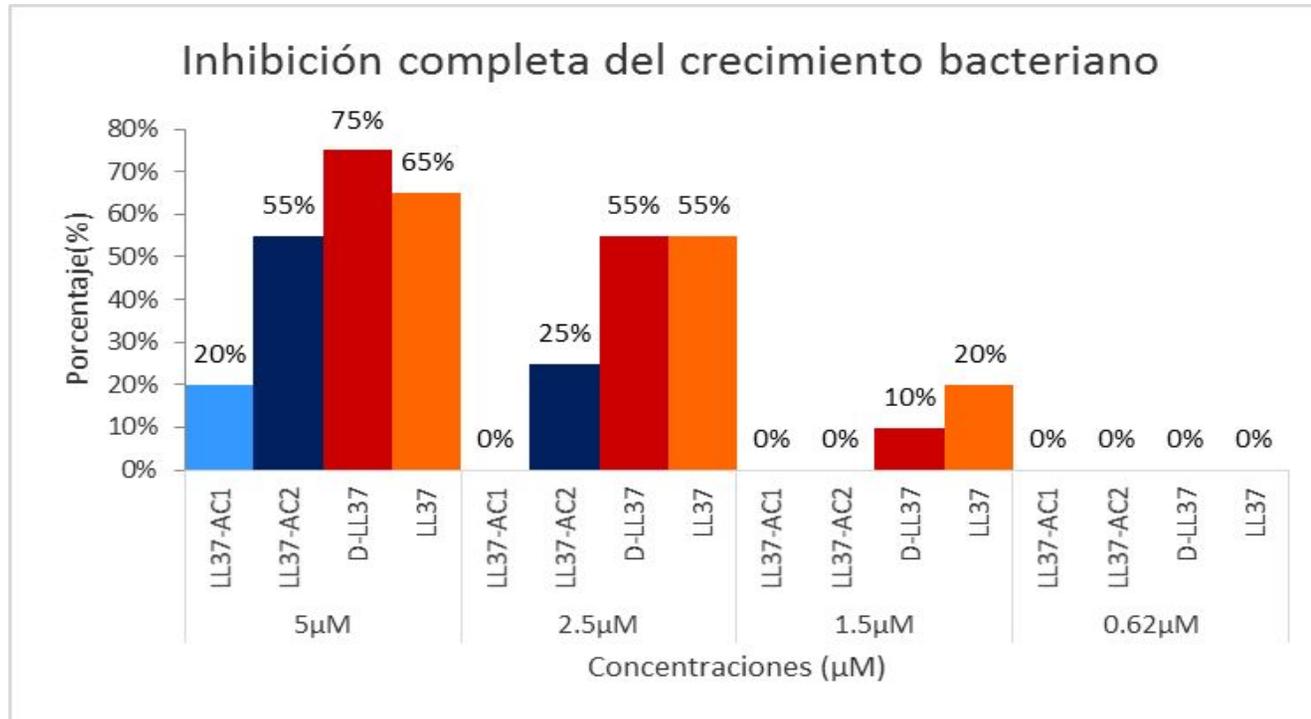
IC: 95% Bonferroni

	LL37-AC1 (%)	LL37-AC2 (%)	D-LL37 (%)	LL37 (%)
5µM	• 94	• 100	•• 100	• 100
2.5µM	• 82,3	• 100	•• 100	• 100
1.5µM	• 76,4	• 100	•• 100	• 100
0.62µM	• 58,8	• 88,2	•• 94	• 100

	Pep. 5	Pep. 6	Pep. 7	Pep. 8	Pep. 9	Pep. 10	Pep. 11	Pep. 12
5µM	•• 0	•• 20	•• 40	• 60	• 40	• 60	•• 0	• 20
2.5µM	•• 0	•• 20	•• 40	• 20	• 20	• 20	•• 0	• 20
1.5µM	•• 0	•• 20	•• 20	• 20	• 0	• 20	•• 0	• 20
0.62µM	•• 0	•• 20	•• 0	• 0	• 0	• 20	•• 0	• 20

Inhibición del crecimiento

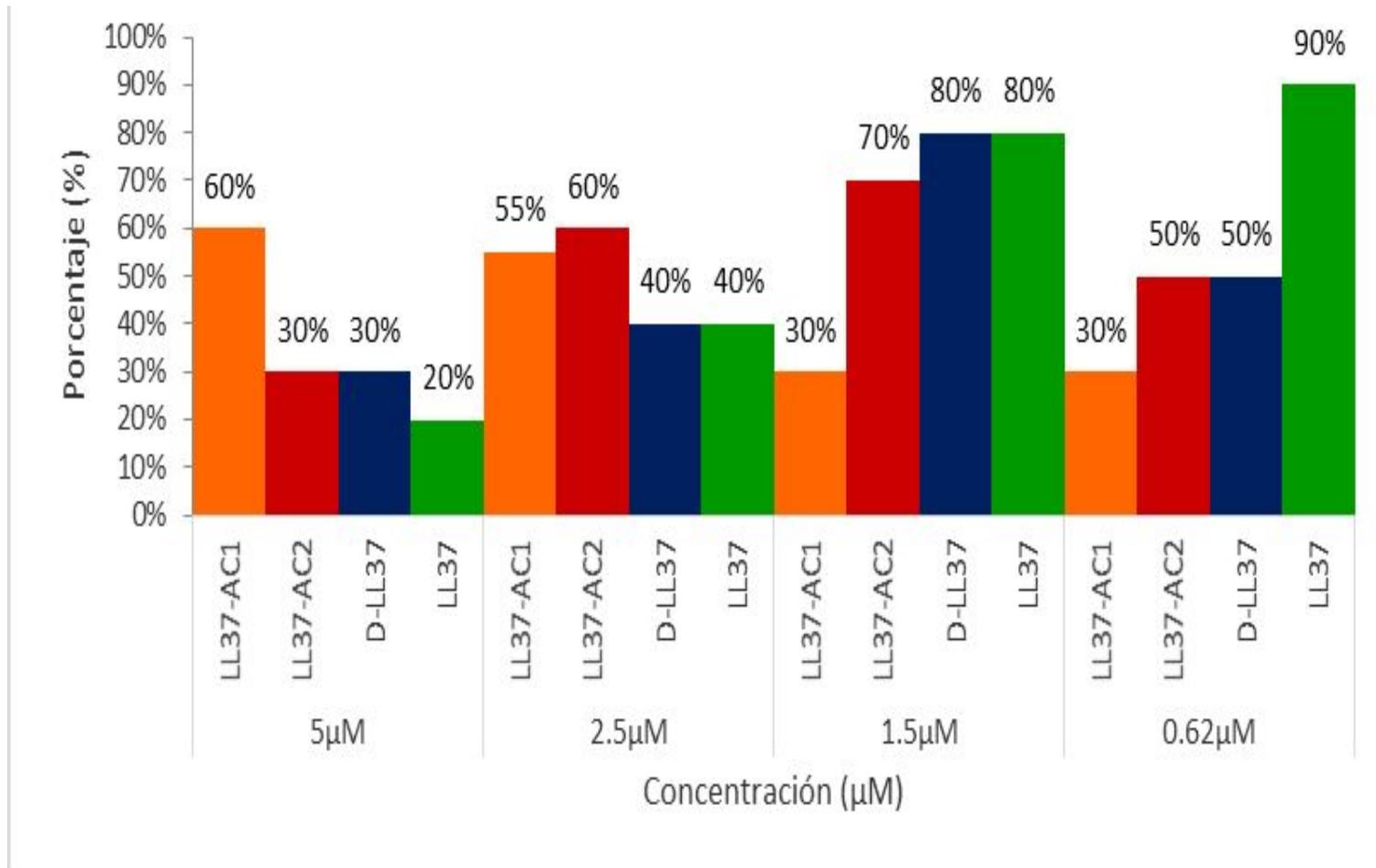
LL-37 y sus derivados



Péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

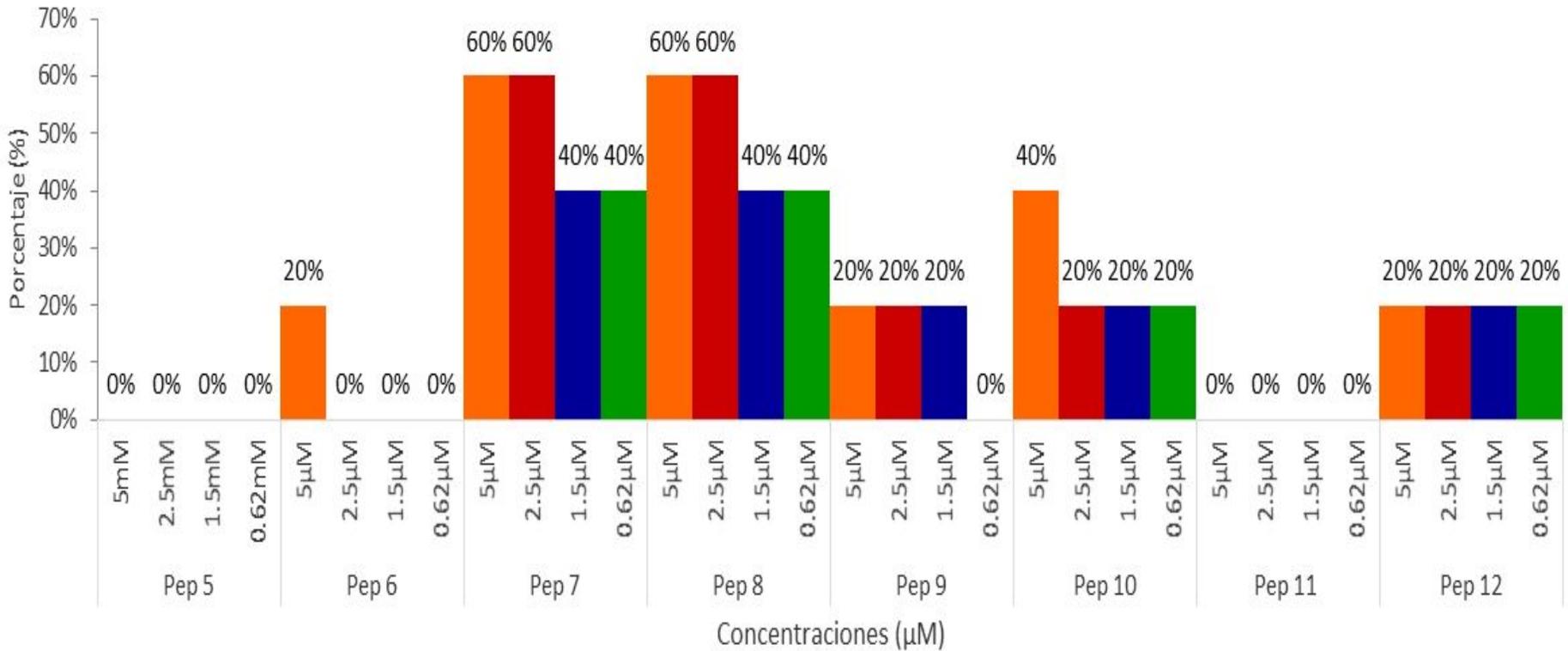
Con ninguno de estos péptidos se observó inhibición completa del crecimiento de las cepas utilizadas

ALARGAMIENTO DE LA FASE Lag



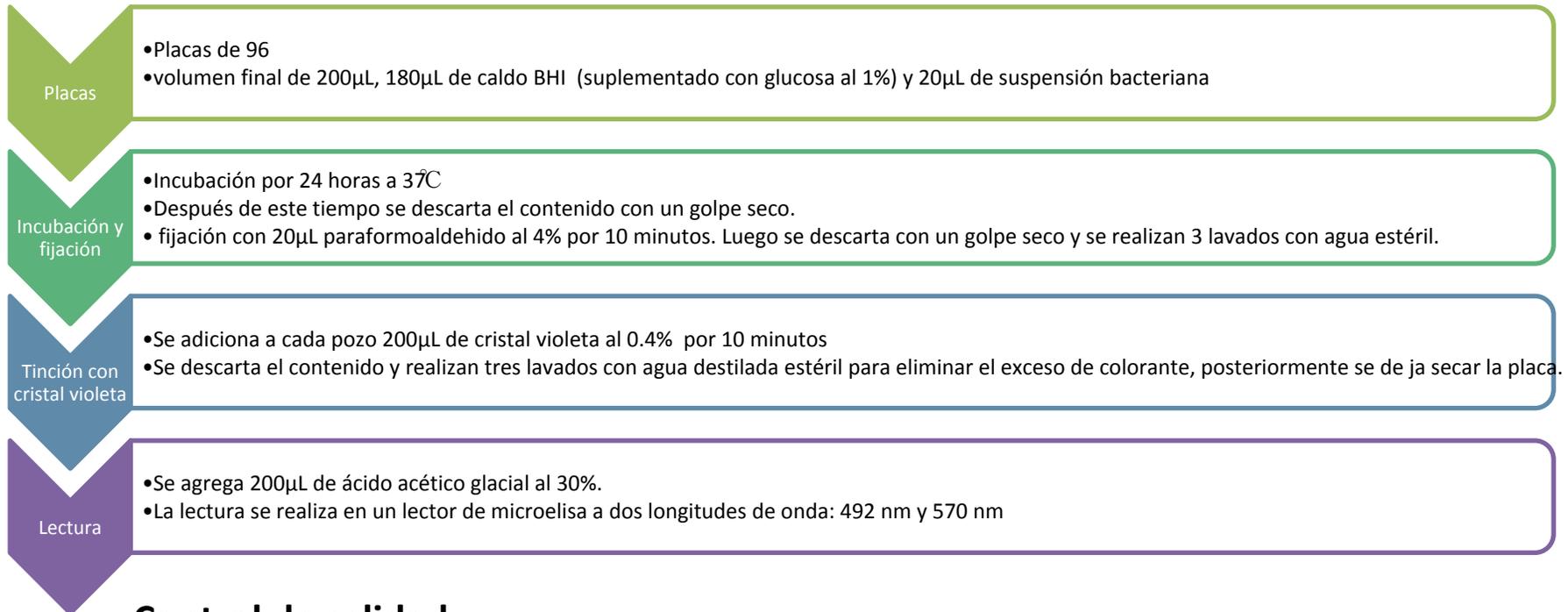
Péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

Alargamiento de la fase lag



METODOLOGÍA CRISTAL VIOLETA

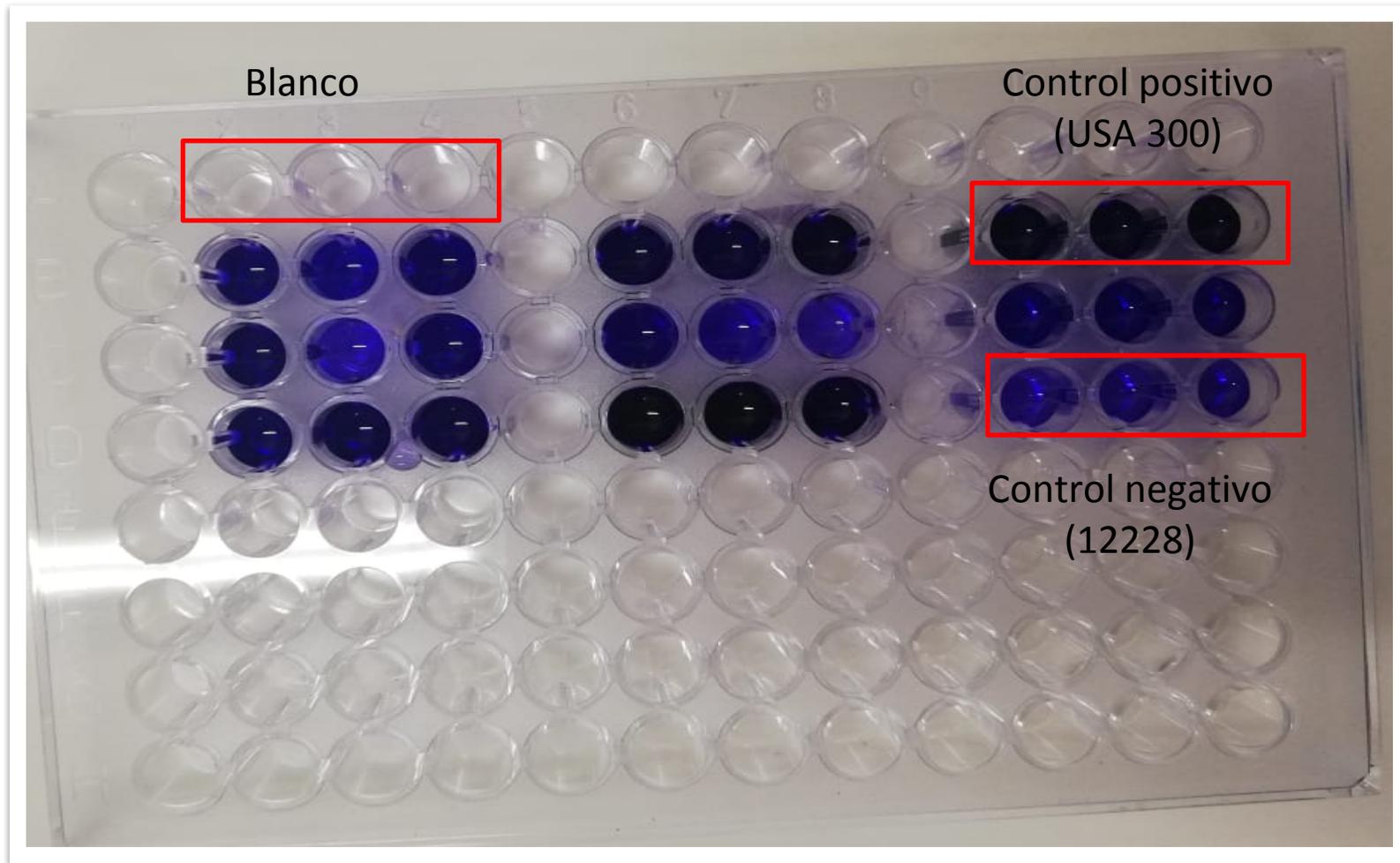
La preparación de las cepas se realiza de la misma forma que en las curvas de crecimiento.



Control de calidad

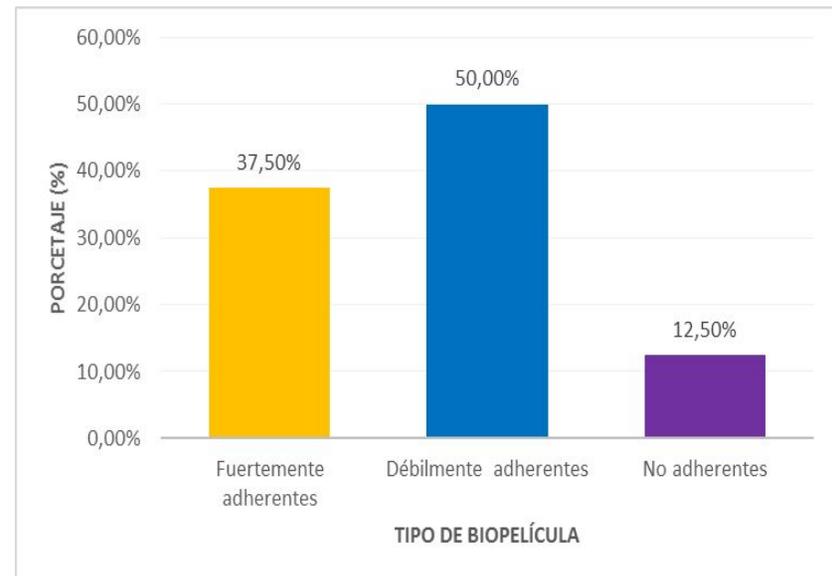
- Control positivo: USA300 de *Staphylococcus aureus*
- Control negativo: *Staphylococcus epidermidis* 12228
- Control del medio: 3 pozos con caldo BHI

MONTAJE CRISTAL VIOLETA



RESULTADOS CRISTAL VIOLETA

Formación de biopelícula a las 24 horas de incubación		
Cepa	Promedio de los pozos por triplicado	Tipo de biopelícula
<i>K. pneumoniae 1705</i>	0,238	Débilmente adherente.
<i>A. baumannii</i>	0,449	Fuertemente adherente.
<i>E. coli nativa</i>	0,179	Débilmente adherente.
<i>P. vulgaris 6380</i>	0,115	No adherente.
<i>P. aeruginosa 9027</i>	2,861	Fuertemente adherente.
<i>E. coli hemocultivo</i>	0,188	Débilmente adherente.
<i>Klebsiella hemocultivo</i>	0,184	Débilmente adherente.
<i>Pseudomonas hemocultivo</i>	2,895	Fuertemente adherente.



RECOMENDACIONES

- Debido a que no se realizaron curvas de crecimiento con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con todas las cepas ATCC y las cepas clínicas, se recomienda realizar estos ensayos en futuras investigaciones para tener un panorama completo del efecto de estos péptidos sobre estos bacilos Gram negativos.
- Dado que solo fueron utilizadas 3 cepas clínicas en el estudio, es necesario probar estos péptidos en más cepas clínicas para evitar que los resultados se vean sesgados.
- Se recomienda realizar investigaciones que permitan determinar si estos péptidos intervienen o altera la forma en que las bacterias utilizan las fuentes de carbono en el medio.
- Se sugiere realizar los ensayos de cristal violeta en presencia de los péptidos utilizados en este estudio para observar si tienen un efecto sobre la formación o maduración de las biopelículas producidas por estas cepas.

CONCLUSIONES

- Los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 tienen la capacidad de alargar la fase lag del crecimiento bacteriano.
- De los 12 péptidos probados se demostró que los más eficientes fueron los péptidos LL37-AC2, DLL37 y LL37, que mostraron actividad inhibitoria del crecimiento en cepas ATCC hasta la concentración de 1.5µM.
- De los péptidos antimicrobianos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, los péptidos 5 y 11 no tienen actividad biológica frente a las bacterias en estudio.

AGRADECIMIENTOS

- **A la profesora Liliana Constanza Muñoz Molina por su guía, acompañamiento, dedicación y orientación en este trabajo de grado.**
- **Al grupo de investigación REMA por su colaboración y ayuda para desarrollar nuestro proyecto investigativo**
- **A las jóvenes investigadoras Laura Viuche, Claudia Cruz y Tatiana Duran por su apoyo, ayuda y conocimientos para la culminación de este trabajo de grado.**
- **A nuestras familias por su amor, comprensión y apoyo a lo largo de nuestra carrera.**

¡Gracias!