



*COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELICULA DE LOS  
PÉPTIDOS AC-LL37-1 Y D-LL37-1 EN CEPAS DE *Staphylococcus spp.*,  
*Escherichia coli* Y *Pseudomonas aeruginosa**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C 2018



*COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELICULA DE LOS  
PÉPTIDOS AC-LL37-1 Y D-LL37-1 EN CEPAS DE Staphylococcus spp.,  
Escherichia coli Y Pseudomonas aeruginosa*

EDITH YUNARY ACOSTA URREGO

WENDY GINETH MARTÍNEZ LUGO

ASESORA

LILIANA CONSTANZA MUÑOZ MOLINA

DOCENTE FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C 2018

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme estar donde estoy, a mi familia por ser mi fortaleza y refugio. A Jilmar y Catalina por apoyarme y dar una palabra de aliento cuando lo necesite, y a Maryi por su apoyo durante todo este proceso.

Wendy M.

A Dios por permitirme llegar a culminar esta etapa de mi vida, a mi madre y mis hermanas por apoyarme en cada logro. A Daniel que me ha apoyado constante e incansable y Lorena por acompañarnos y ayudarnos a culminar este proyecto.

Edith A.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Dios por permitirme llegar a este punto de mi formación profesional y por todas las bendiciones que a diario llegan, le quiero agradecer a la profesora Liliana Muñoz por su apoyo y orientación durante todo el proceso. A Maryi Segura por su apoyo, paciencia y aporte de su conocimiento durante este tiempo.

A mis padres Edilma Lugo, Jose Martínez y a mis hermanos por brindarme confianza y apoyo, por ser mi fuente de motivación a diario para continuar en este largo proceso y porque gracias a ellos estoy logrando mis metas y me formaron para ser la persona que soy, siendo siempre ellos ejemplo de lucha y dedicación.

A Jilmar Hurtado porque en estos cinco años siempre estuvo a mi lado brindándome su comprensión, amor y confianza para seguir adelante, por creer en mí y hacerme feliz.

A mis compañeros y amigos en especial a Catalina Ibañez por su honestidad, apoyo y por compartir su conocimiento conmigo. Y a todas las personas que durante estos cinco años estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y buenos deseos para continuar creciendo personal y profesionalmente.

Wendy M.

Quiero agradecer a Dios por permitirme terminar esta meta con éxito y convertirme en una profesional integra, a la docente Liliana Muñoz por su acompañamiento y guía durante el proceso. A Lorena Segura por su constante apoyo, paciencia y su enseñanza día a día.

A mi madre Myriam Urrego por su incansable lucha y dedicación porque gracias a ella hoy soy una persona de bien, a mis hermanas por estar ahí

siempre para apoyarme, darme palabras de aliento en los momentos difíciles y no desfallecer en el proceso que hoy estoy culminando.

A Daniel Alzate por cinco años de paciencia, amor, dedicación y enseñarme que puedo cumplir todos los logros que me plantee.

A todos mis compañeros y amigos que forme durante el desarrollo de esta carrera profesional, que compartieron su conocimiento y excelentes valores.

Edith A.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	15
1. ANTECEDENTES.....	18
2. MARCO REFERENCIAL.....	24
2.1 Generalidades.....	24
2.1.1 <i>S. aureus</i> .....	24
2.1.2 <i>S. epidermidis</i> .....	26
2.1.3 <i>E. coli</i> .....	26
2.1.4 <i>P.aeruginosa</i> .....	27
2.2 Resistencia e importancia clínica.....	27
2.3 Biopelícula.....	29
2.3.1 Etapas de la formación de la biopelícula:.....	30
2.4 Péptidos antimicrobianos (PAMs).....	35
2.4.1 Clasificación de los péptidos.....	36
2.5 Péptido LL-37.....	38
2.5.1 Síntesis.....	38
2.5.2 Mecanismo de interacción Péptido-Bacteria.....	39
2.5 Curvas de Crecimiento.....	40
3. DISEÑO METODOLOGICO.....	42
3.1 Escala McFarland.....	42
3.2 Péptidos antimicrobianos.....	42
3.3 Reconstitución de péptidos.....	43
3.4 Curvas de Crecimiento y comparación de los resultados.....	43
3.5 Porcentaje de tasa de inhibición.....	44
3.6 Cristal violeta.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Curvas de crecimiento.....	46
4.2 Cristal violeta, determinación de la formación de Biopelícula.....	53

5. DISCUSIÓN .....	55
6. CONCLUSIONES.....	64
7. RECOMENDACIONES .....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
ANEXOS.....	78

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....	25
Figura 2. Etapas de la formación de biopelícula .....	30
Figura 3. Comportamiento de la fase logarítmica tardía en los controles (cepas ATCC) tratados con los péptidos .....	47
Figura 4. Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamiento clínico en <i>S. aureus</i> .....	48
Figura 5. Horas de la fase logarítmica tardía de cepas <i>S. epidermidis</i> .....	49
Figura 6. Horas de la fase logarítmica tardía de cepas de <i>E. coli</i> .....	50
Figura 7. Horas de la fase logarítmica tardía de cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	51



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración 5 $\mu$ M en cepas de <i>S. aureus</i> .....	52
Tabla 2. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración 5 $\mu$ M en cepas de <i>S. epidermidis</i> .....	52
Tabla 3. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración de 5 $\mu$ M en cepas de <i>E. coli</i> .....	52
Tabla 4. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración de 5 $\mu$ M en cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	53

## ANEXOS

ANEXO 1. Curvas de crecimiento de bacterias Gram positivas <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> con péptido AC-LL37-1 y D-LL37-1 .....	78
ANEXO 2. Promedio de las D.O. de la fase Lag tardía de cada cepa para la obtención de tasa de inhibición.....	102
ANEXO 3. Curvas de crecimiento de bacterias Gram negativas <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> expuestas a péptido LL-37 .....	105
ANEXO 4. Tablas de las tasas de inhibición con cada uno de los péptidos... 109	
ANEXO 5. Actividad antibiopelícula con el método Cristal violeta.....	112



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

*COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELICULA DE LOS  
PÉPTIDOS AC-LL37-1 Y D-LL37-1 EN CEPAS DE Staphylococcus spp.,  
Escherichia coli Y Pseudomonas aeruginosa*

RESUMEN

A nivel clínico, la generación de resistencia a través de diferentes estrategias por parte de los microorganismos patógenos es de gran importancia en salud pública, ya que genera menores opciones de tratamiento, mayores tasas de morbimortalidad, y aumento de costos a nivel salud. Dentro de los mecanismos de resistencia que generan patógenos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* esta la generación de biopelícula, que lleva a que todos sus factores de virulencia actúen con mayor capacidad, posean mejor adhesión y colonización a superficies y generen de resistencia al tratamiento convencional con antibióticos. En efecto, hoy en día se busca implementar el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) ya que estos son parte de un mecanismo modulador de la inmunidad innata, y uno de estos péptidos es el péptido humano LL-37 del tipo Catelicidina y sus derivados isoméricos, que poseen gran capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos productores de enfermedades de difícil tratamiento, ya que estos presentan

gran resistencia a los antibióticos al generar diferentes mecanismos de defensa y resistencia a la acción de los antimicrobianos a través de la expresión de distintas proteínas. Los péptidos presentan diferentes alternativas de acción contra los patógenos, una de las más importantes es la citotoxicidad mediante la formación de poros en la membrana.

Es por ello que se evaluó la capacidad de inhibición de biopelícula por parte del péptido LL-37 en sus formas acetilada y enantiómero D ya que hoy en día los péptidos antimicrobianos se han convertido en una medida eficaz ante la resistencia a los antibióticos.

**PALABRAS CLAVE:** *S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa, biopelícula, Péptidos antimicrobianos, curvas de crecimiento.*

**Estudiantes:** Edith Yunary Acosta Urrego, Wendy Gineth Martínez Lugo

**Docente:** Liliana Constanza Muñoz Molina

**Fecha:** mayo 2018

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

## INTRODUCCIÓN

Algunas especies del género *Staphylococcus*, y microorganismos como *E. coli* y *P. aeruginosa* poseen propiedades, características y factores de virulencia que les permiten adherirse a superficies o materiales biomédicos creando una matriz de exopolisacáridos, formando así la biopelícula y generando resistencia a la penetración de los antibióticos (1,2). Es por ello que el 27 de febrero de 2017 la OMS realizó un reporte en cual se publicó una lista de bacterias que presentan resistencia mundial a antibióticos, presente en el siguiente link: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>, con lo cual se determinó que se necesitaban nuevos medicamentos para tratar las infecciones que causan dichos patógenos, puesto que ‘tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes’ (3).

Por tanto, la OMS efectuó una clasificación en 3 categorías de estos microorganismos: prioridad crítica, alta o media. Dentro de la categoría de prioridad crítica se encuentra *E. coli* y *P. aeruginosa* puesto que las bacterias pertenecientes a esta categoría son capaces de producir infecciones letales; y dentro de las categorías de prioridad alta y media se contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente, siendo de prioridad alta *S. aureus* (3).

De igual manera los microorganismos utilizan diferentes mecanismos de resistencia, dentro de los más importantes esta la generación de biopelículas, una de las principales características de la biopelícula que permiten el desarrollo de infecciones de importancia a nivel médico, sobre todo infecciones crónicas que no pueden ser tratadas como generalmente se haría por la misma resistencia que se genera y sobre todo cuando hay presencia de cuerpos biomédicos, ya que la biopelícula tiene la capacidad de adherirse y persistir sobre los mismos, así las bacterias van a estar protegidas de moléculas del

sistema inmune, como los anticuerpos, procesos como fagocitosis y penetración de antibióticos (4–6).

Por lo anterior, la resistencia a antibióticos ha generado un gran problema en salud pública es por ello que constantemente se buscan soluciones y nuevas maneras de controlar la resistencia a antibióticos y así mismo se han estudiado durante los últimos 25 años alternativas como lo son los péptidos antimicrobianos, puesto que estos tienen diversos mecanismos de acción ideales para enfrentar las infecciones.

Los péptidos antimicrobianos se definen como componentes efectores del sistema inmune innato, de seres vivos como los procariontes, insectos, plantas y el ser humano, los cuales son generados por diferentes células y en ellas cumplen diferentes funciones, como actuar frente a los diversos patógenos que causan infecciones, además de participar en la angiogénesis y cicatrización, paralelamente dan a conocer que generalmente estos péptidos están constituidos por aproximadamente 200 aminoácidos, y que su uso se puede hacer mediante la combinación de péptidos u otras sustancias antimicrobianas, manejándolos en su estructura original o modificándolos (6–9).

De tal manera y evidenciando la necesidad de nuevas alternativas de terapia farmacológica frente a dicha resistencia los péptidos antimicrobianos se reconocen como una solución ante esta problemática en salud pública (10).

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo es analizar la actividad inhibitoria de la biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por parte de los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1

Los objetivos específicos son: Evaluar el posible potencial inhibitorio que los péptidos AC-LL 37-1 y D-LL 37-1 tienen en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* formadoras de biopelícula por espectrofotometría; determinar cuál es el efecto de los péptidos antimicrobianos AC-LL37-1 y D-

LL 7-1 sobre cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* formadoras de biopelícula mediante espectrofotometría y comparar cuál es la eficiencia de cada uno de los péptidos antimicrobianos sobre las cepas de aislamiento clínico y sobre las cepas ATCC a través de la observación de las curvas de crecimiento.

## 1. ANTECEDENTES

Desde hace ya muchos años, se ha venido reportando a través de diferentes estudios la adquisición de resistencia de los diferentes microorganismos hacia los antibióticos, por ello el uso de péptidos como antibióticos es una buena alternativa a este problema (11). Lo anterior se evidencia a través de estudios como el de L. Montanaro et al. en 2011 quien analizó 1.027 muestras obtenidas en el período 2000 a 2003 de 699 pacientes con infección asociada a material ortopédico, encontrando que el género *Staphylococcus* presenta gran prevalencia en infecciones asociadas a implantes con un 78,1% (infecciones asociadas a prótesis de rodilla y cadera, sistemas de fijación de huesos fracturados externos e internos, materiales para las reconstrucciones de tendones y ligamentos y otros materiales de implante ortopédicos) (12). *Staphylococcus epidermidis* se asocia a infecciones en implantes ortopédicos, ya que posee gran capacidad de adhesión y formación de biopelícula, favorecida por la adición de carbohidratos causando de igual manera resistencia y dificultad en el tratamiento (12,13).

En el año de 1990 ya se conocía sobre los péptidos antimicrobianos catiónicos, los cuales poseen una gran capacidad antimicrobiana *in vitro*; durante el estudio realizado por Bruce L. et al (1990), se determinó que las defensinas, pueden tener acceso a la membrana y generar daño en ella, independientemente de si eran bacterias Gram negativas o Gram positivas, virus, hongos, o células tumorales (8,14). En el transcurso del mismo año D Wade et al (1990), realizó la síntesis de 3 enantiómeros D a partir de antibióticos naturales: cecropina A, magainina 2 amida y melitina, buscando encontrar la mejor eficiencia de cada péptido y la susceptibilidad de los microorganismos a estos, la cecropina en su forma de enantiómero L evidenció la fácil proteólisis por tripsina, y en cambio la forma enantiómero D mostró mayor resistencia a la acción enzimática, además reportó que diferentes



péptidos tienen la capacidad de formar canales iónicos sobre los lípidos de las membranas.

Al enfrentar estos péptidos con bacterias Gram positivas y con bacterias Gram negativas, encontraron que la sensibilidad a dichos péptidos varía de acuerdo a la concentración, y se evidenció que la melitina fue el péptido de mejor acción en bacterias Gram positivas pero es de gran toxicidad (15). Pocos años después, en 1998 los autores Marc HV, Van Regenmortel et al, refieren que las proteínas sintetizadas naturalmente son de la forma isomérica L (levógiro) y que por tanto, las formas de unión de estas proteínas reconocerán únicamente la forma L de las moléculas a las cuales se van a unir, por lo cual sugieren que los péptidos en forma D sintetizados con sustitución en la posición de algunos aminoácidos del péptido-L son adecuados para su uso puesto que resisten a la proteólisis, debido a la baja inmunogenicidad que presentan, modulando así la respuesta inmune y que por tanto pueden usarse en la elaboración de vacunas (16).

Durante el estudio realizado por Gómez EC (2012) se mantiene de igual manera que los péptidos antimicrobianos son producidos por diversos organismos, los animales producen cerca del 71.3% de los PAMs conocidos, seguido por las plantas con un 14.2%; los PAMs se reconocieron como moléculas antimicrobianas solo hasta la década de los 80's (17), de acuerdo a la literatura los péptidos que se evaluaron y presentaron actividad antimicrobiana por primera vez fueron las maganinas, péptidos derivados de anfibios y con lo cual en adelante se empezaron a realizar estudios posteriores que reflejaron la importancia de los mismos a través de los años. El autor refiere que con los estudios que se han realizado en América Latina frente a la problemática que se presenta por la resistencia a los antibióticos, se evidencia que Colombia es uno de los países que presenta una alta incidencia de brotes por infección debidos a bacterias que presentan resistencia a antibióticos, generando con el paso del tiempo problemas en

salud pública. Dentro de los casos más importantes dados por resistencia bacteriana, se encuentran aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* (17). También da a conocer que los PAMs son una buena alternativa al presentar ventajas ya que derivan de la respuesta inmune en diferentes seres vivos, son inespecíficos por lo cual es más difícil que los microorganismos puedan crear resistencia frente a ellos, pueden sintetizarse químicamente como lo referenciaron los primeros autores en los años de 1990, además se pueden crear péptidos análogos a los existentes en la naturaleza; péptidos como P26D y P1D permeabilizan de manera más rápida la membrana de bacterias Gram positivas. Así mismo, se estudió el efecto de algunos péptidos enantiómeros de carácter Dextrógiro en lugar de carácter Levógiro, evaluando la actividad de péptidos análogos al BTM-P1 en los cuales encontraron que *S. aureus* Resistente a Meticilina (MR) (ATCC 33591) es sensible a la acción de ciertos péptidos (WP1W, P26D y P1D) a concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ , para el caso de *E. coli* (ATCC 25922) todos los péptidos usados (R\_P1, P26CL, R\_WP1, R\_P1W, P1D y P26D), aunque no con la misma capacidad, mostraron un comportamiento similar usando concentraciones de 5 y 2,5  $\mu\text{M}$  que fueron las más significativas (17).

En las investigaciones de Dean (2011) se generó un estudio amplio sobre el péptido antimicrobiano LL-37 derivado de la Catelicidina, único péptido sintetizado por los seres humanos y con actividad antimicrobiana (18,19). Este autor logró probar que el péptido LL-37 en su forma de enantiómero D-LL-37 era resistente a la actividad de las proteasas. Se valoró la actividad antimicrobiana y antibiopelícula utilizando péptidos sintéticos en *P. aeruginosa* ATCC 19429 y ATCC 27853; las cepas fueron incubadas en placas de 96 pocillos junto con concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g/ml}$  cada ensayo se realizó por triplicado para evaluar la actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula. Los resultados arrojados indican que el péptido D-LL37

contra *P. aeruginosa* (ATCC 19429) es efectivo a una concentración de 0,72 µg/ml; además, los enantiómeros D y L muestran una actividad similar en *P. aeruginosa* (ATCC 19429). Los demás péptidos que se estudiaron (ATRA-1 y ATRA-2) de igual modo mostraron actividad antimicrobiana contra el patógeno en estudio, y para el caso de a la actividad antibiopelícula las formas 'L Y D del LL-37 son capaces de impedir la formación de la biopelícula de manera similar ya que crean espasmos en la motilidad que según investigaciones anteriores hacen que la bacteria se mueva a otras áreas, pero no cree biopelículas y que la generación de esos espasmos es independiente de la quiralidad del péptido'(19) Análogamente se demostró que las proteasas bacterianas no lograron degradar a D-LL-37 pero si a L-LL37 (19).

C. de la Fuente Núñez y demás investigadores en 2014 se encargaron de estudiar y analizar el péptido 1018 el cual demostró presentar actividad antibiopelícula, ya que genera un bloqueo en (p)ppGpp (Nucleótidos Guanosina tetrafosfato ppGpp y Guanosina pentafofosfato ppGpp), señal intracelular producida por los microorganismos cuando se encuentran expuestos a estrés ambiental y es importante para el desarrollo, crecimiento, viabilidad y formación de la biopelícula (20,21).

Al mismo tiempo se evidenció que este péptido logra involucrase en la dispersión o eliminación de la biopelícula y esto va a depender de la concentración, ya que a concentraciones muy bajas (0,8 µg/ml), el péptido aumenta la dispersión de células vivas de biopelículas existentes; por el contrario, concentraciones más altas de péptido (10 µg/ml) no desencadenan la dispersión de células de la biopelícula en vivo, y la mayoría de las células mueren (20) y esto puede ocurrir tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas.

El ppGpp no puede ser sintetizado por algunas células por lo que se dificulta la adherencia a superficies como el plástico y formar la biopelícula a diferencia, de las que lo poseen en donde se incrementa la habilidad de crear las

biopelículas. Además, se evaluó si antibióticos catiónicos como la polimixina B y tobramicina tienen la habilidad de generar el bloqueo de ppGpp pero se evidenció que esto solo lo logra el péptido 1018 (6,20,22).

De forma similar los autores Zhao L. y Wuyuan L. (2014) ejecutaron un estudio en el cual se analizaron las aplicaciones de las proteínas de imagen especular, y su participación en la inmunología y la fabricación de fármacos, teniendo en cuenta que los aminoácidos son quirales de acuerdo a la posición L o D de los aminoácidos, que tienen propiedades físicas y químicas iguales, la quiralidad de los aminoácidos se ha usado en la síntesis de péptidos; además puntualizan que los péptidos son buenos agentes terapéuticos para el tratamiento de diferentes patologías. Los autores reportan que los péptidos más importantes son del tipo D, puesto que son resistentes a la proteólisis, menos inmunogénicos y que por tanto *in vivo* tiene una capacidad mayor para circular y ejercer su acción (23).

Durante el estudio realizado por Zhao G. en el año 2015 se buscó evaluar los efectos de los péptidos frente al crecimiento y la formación de biopelícula asociada a implantes por *S. aureus*, se evaluó el péptido Tet 213, cuya actividad principal es sobre la membrana, mediante estudios *in vitro* enfrentaron el péptido a 20 muestras de aislamientos clínicos de *S. aureus* de pacientes con infecciones asociadas a implantes, en las que se encontró que en el 80% de las cepas (16 de 20 cepas) el péptido lograba reducir la formación de biopelícula e inhibir el crecimiento de *S. aureus* de forma *in vitro*, aunque el estudio no especifica si de manera *in vivo* el efecto del péptido es el mismo, por lo cual sugiere que se deben hacer más estudios (24).

En 2016 Yazici et al. experimentaron con péptidos bifuncionales quiméricos que son elaborados con la capacidad de unirse al titanio, que es el material principal del que están elaborados la mayoría de los dispositivos que se implantan; estos péptidos se denominaron TiBP1 (que es rico Arginina y tiene

una carga catiónica) y TiBP2 (rico en Serina con una carga total neutra). El objetivo de este trabajo fue analizar si estos péptidos presentaban mayor eficacia contra las bacterias Gram positivas: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 29886, y Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 que son comunes en implantes orales y ortopédicos, la concentración mínima inhibitoria se determinó sucesivamente de 10 hasta 200  $\mu\text{M}$  por densidad óptica para *Streptococcus mutans* y en el caso de *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* se reguló desde 10-25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ; de acuerdo a esto se logró determinar que las concentraciones en las que presentaban mayor eficacia para los dos péptidos correspondían a 200  $\mu\text{M}$  para *Streptococcus mutans*, y de 50  $\mu\text{M}$  para *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*; los dos péptidos estudiados logran disminuir significativamente la adhesión bacteriana y se resalta que el TiBP1 presenta mayor actividad que el TiBP2, así mismo evidenciaron que estos péptidos son más efectivos en bacterias Gram positivas que en Gram negativas (25).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 Generalidades

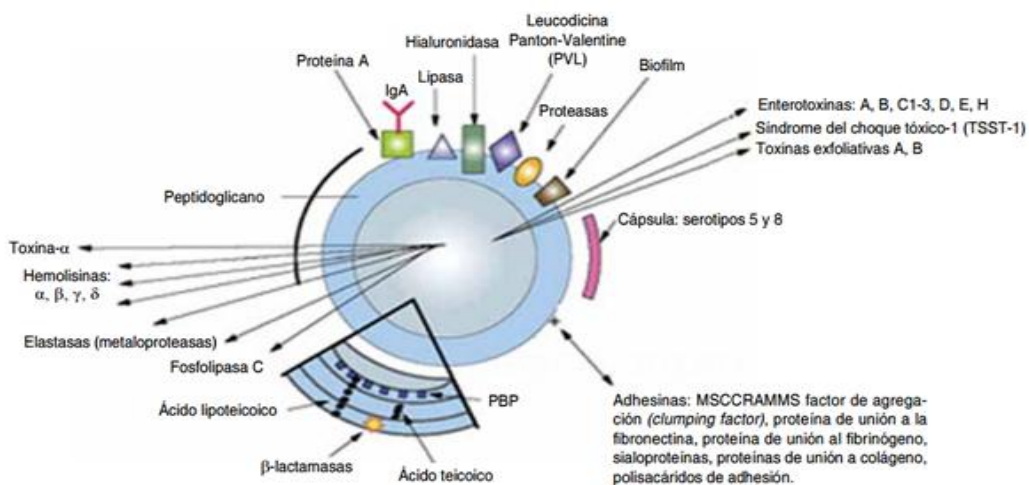
Los *Staphylococcus* son un género de bacterias coco Gram positivas, Se encuentran como flora normal de la piel y mucosas en humanos y animales, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas llegando a ocasionar infecciones piógenas (en tejidos), enfermedades respiratorias, e intoxicaciones alimenticias. Poseen un metabolismo respiratorio aerobio facultativo, presentan ciertos factores de virulencia como son: lipasas, proteinasas, b-lactamasas, estafilocinasas, nucleasas, nucleasa termoestable, coagulasa, hialuronidasa, fosfolipasa C, y catalasa; también producen diferentes toxinas como los son las hemolisinas (toxina alfa, beta, gamma y delta), enterotoxinas, leucocidinas entre otras, conjuntamente en su superficie microbiana posee componentes como: el peptidoglicano, ácido teitóico, proteína A, y proteínas de superficie que son importantes para la interacción con el tejido del huésped y su propio metabolismo (1,26–29). Hasta el momento se conocen más de 35 especies pertenecientes al Género *Staphylococcus*, con aproximadamente 17 subespecies. Dentro de las especies que más se destacan se encuentran *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* como principales causantes de enfermedades nosocomiales o intrahospitalarias sobre todo en pacientes con sistema inmune comprometido actuando como oportunistas, aunque pueden de igual manera afectar a la comunidad en general (28).

#### 2.1.1 *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* hace parte de los *Staphylococcus* coagulasa positiva y se encuentra como flora normal en superficies epiteliales, posee importantes factores de virulencia y mecanismos que le permite generar resistencia a antibióticos. *S. aureus* es una causa importante de infecciones potencialmente adquiridas en los centros de salud y es una causa principal de infecciones

asociadas a biomateriales (24), puede causar infecciones a nivel del torrente sanguíneo, tejido epitelial, endocarditis, infecciones piógenas y alimentarias (1,2,12,26,30), poseen la capacidad de adherirse a determinadas superficies como lo son dispositivos médicos (implantes, catéteres, válvulas, entre otros) y otro tipo de materiales inertes (5,31). Actualmente hay más de 10 secuencias del genoma de *S. aureus* de diferentes cepas, gracias a estos conocimientos es que hoy en día se conoce mejor la patogénesis de estos microorganismos. Se sabe que muchas cepas de *Staphylococcus* cuentan con grandes islas de patogenicidad (SaPIs) que van a permitir la codificación para diferentes factores de virulencia, además de transposones y bacteriófagos (1,2,12,26). Dentro de los factores de virulencia hay aproximadamente 50 genes virulon implicados que codifican para estas moléculas, dentro de las más importantes para *S. aureus* se encuentran toxinas, proteínas de superficie y enzimas como: Enterotoxina estafilocócica A (SEA), alfa hemolisinas, leucocidinas, Toxina exfoliativa, citotóxicas, toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1, proteína fijadora de fibronectina, el factor de agregación (clumping factor) catalasa, hialuronidasa, fibrolisina, lipasa, penicilinas, entre otras (Figura 1) (12).

Figura 1. Factores de virulencia de *S. aureus*



Fuente: Características generales de *S. aureus* Cervantes E, et al. 2014

### 2.1.2 *S. epidermidis*

*S. epidermidis* hace parte de los *Staphylococcus* coagulasa negativa, se encuentra en flora normal de piel y membranas mucosas, al igual que *S. aureus* su importancia a nivel clínico ha aumentado, debido a que se comporta como un patógeno oportunista en infecciones asociadas a cuerpos biomédicos (catéteres permanentes y dispositivos implantados), bacteriemias nosocomiales y endocarditis (1,32). A diferencia de *S. aureus* la acción patógena de *S. epidermidis* es dada por su capacidad de formar biopelícula sobre superficies bióticas y abióticas mediante la adhesina polisacárido (PS/A, *polysaccharide/adhesin*) que es un polímero de galactosa-arabinosa de alto peso molecular (29), codificada por el Operón *ica*, aunque este no se encuentra en todas las cepas, además posee otras proteínas de superficie que favorecen la adhesión como los son SSP-1, SSP-2, Fbe /SdrG, SdrF y SdrH, AtlE (autolisina), y la proteína Bhp la cual es similar a la proteína asociada al biofilm (Bap) de *S. aureus*, posterior a la adhesión, el polisacárido de adherencia intracelular (PIA), y una proteína extracelular actúan para finalmente darse la unión de estas proteínas y adhesinas a la superficie inerte, con lo cual se dará formación de la biopelícula (29,32,33).

### 2.1.3 *E. coli*

*Escherichia coli* es un microorganismo perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria Gram negativa que posee una forma cilíndrica, con 1,1-1,5 µm de diámetro por 2,0-6,0 µm de largo, es anaerobia facultativa con metabolismo fermentativo, son bacterias móviles con flagelos peritricos o en algunos casos inmóviles; su genoma está constituido por más de 15.000 genes, con más de 250 serotipos y seis tipos patogénicos, *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés Enteropathogenic *E.coli*), productora de toxina shiga (STEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), entero agregativa (EAEC) y difusamente adherente (DAEC) ) que se clasifican según la patología y factores de virulencia (34–36). *E. coli* es de



importancia a nivel hospitalario cuando se comporta como patógeno debido a que ocasiona infecciones urogenitales recurrentes, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos), síndrome urémico hemolítico, y además son capaces de colonizar dispositivos médicos (34).

#### 2.1.4 *P. aeruginosa*

Dentro de la Familia *Enterobacteriaceae* también se destaca la *P. aeruginosa*, es un bacilo Gram negativo aerobio (37,38). Se encuentra habitualmente en el agua, suelo y plantas, es un patógeno oportunista, causa enfermedades y/o infecciones nosocomiales como neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, causante de alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística y pacientes inmunosuprimidos (39). Esta bacteria presenta una variedad de factores de virulencia como son flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacáridos, toxinas, exoenzimas y formación de biopelículas; produce un polímero de polisacáridos que facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar además de actuar como barrera para los antibióticos. Dentro de las exotoxinas que este produce se destacan: la exotoxina A que daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, el sistema de secreción de tipo III, responsable de la secreción de las toxinas exo S, exo T, exo U y exo Y; las primeras 3 han sido vinculadas a la virulencia. Exo S y Exo T desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto Exo U favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y causa la muerte celular (38).

#### 2.2 Resistencia e importancia clínica

Se ha evidenciado que frecuentemente el género *Staphylococcus*, patógenos como *E. coli* y *P. aeruginosa* tienen la capacidad de generar biopelícula y presentar resistencia a los antibióticos, siendo este uno de los problemas en salud pública más importantes (2). *S. epidermidis* y *S. aureus* son los

patógenos nosocomiales con mayor prevalencia y los más aislados en pacientes que se encuentran en cuidados intensivos, el 89% de estas cepas de *S. aureus* son resistentes a la meticilina en comparación con un 59,5% de casos para *S. epidermidis* (40). De acuerdo con Herrera M., 2006 el Instituto Nacional de Salud de E.U. publicó que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biopelículas, de igual manera se les atribuye el 60% de las infecciones nosocomiales incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad (5,31).

La resistencia de *S. aureus* es conferida generalmente por la proteína de unión a la penicilina (PBP, por sus siglas en inglés) denominada PBP2a o PBP2. Esta proteína codificada por el gen *mecA*, localizado en un elemento genético móvil llamado casete cromosomal estafilocócico (SCCmec, por sus siglas en inglés) (2). Otro mecanismo de 'resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, se pueden inducir artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos' (26).

El Instituto Nacional de Salud en Colombia, encontró que para el año de 1997 a 2000 la tasa de resistencia por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) fue de un 28%, y que aumento a 61% la tasa de resistencia para el año 2006, en la actualidad la tasa de resistencia a meticilina por *S. aureus* reportada es de un 70 a 80%. De la misma manera para *E.coli* en Colombia, se ha identificado que hay una tasa del 22% de cepas productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), donde la resistencia es mayor en aislamientos de Unidades de Cuidados Intensivos; de manera similar de acuerdo con el boletín epidemiológico de Medellín se encontraron hallazgos que reflejaron durante los meses de enero y febrero de 2016 4 cepas de *E. coli* con fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación debido a la producción de Betalactamasas de espectro extendido que pertenecen al Grupo A (41,42). Según en el estudio de L. Montanaro et al. (2011) se encontró que el género

*Staphylococcus* presenta gran prevalencia en infecciones asociadas a implantes con un 78,1% (infecciones asociadas a prótesis de rodilla y cadera, sistemas de fijación de huesos fracturados externos e internos, materiales para las reconstrucciones de tendones y ligamentos y otros materiales de implante ortopédicos) (12) y no asociadas a estos con el 68,3% de los casos; se halló que la especie *S. aureus* es la que se presenta con mayor frecuencia (78% asociados a prótesis y 43% otros tipos de infecciones no relacionadas con prótesis, *Staphylococcus epidermidis* se perfila como el segundo en prevalencia, pero sólo a infecciones asociadas a implantes ortopédicos (12). La formación de biopelícula es la causa de infecciones comúnmente repetitivas del tracto urinario, causadas por *E. coli* y otros patógenos (5,43). Así mismo, el boletín GREBO en el año 2017 informó que los microorganismos de mayor aislamiento en las instituciones de salud son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, con gran importancia por el aumento de resistencia sobre todo de *P. aeruginosa* hacia carbapenémicos (44).

### 2.3 Biopelícula

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos que crecen en una matriz de exopolisacáridos y se adhieren a superficies inertes o tejidos vivos, la naturaleza de estos es ubicua es decir, se pueden encontrar en varias partes, al mismo tiempo estos se encuentran constituidos por varios componentes pero principalmente por agua aproximadamente en un 97%, además del contenido celular y la matriz de la biopelícula, esta contiene exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo, microcolonias de células bacterianas en un 15-20% de una misma especie o compuestas por diferentes especies, también se pueden encontrar otras moléculas en menor proporción como proteínas, DNA, y productos de la lisis celular (11,18,45–47). Algunos de los factores que intervienen de forma importante en la formación de la biopelícula son: las condiciones de la superficie, ya que las superficies rugosas aumentan la colonización, la

formación de la matriz extracelular, y la adhesión es más rápida en superficies hidrófobas que en superficies hidrofílicas (5,31,36). Las especies bacterianas por su versatilidad metabólica y plasticidad genotípica se pueden adaptar a las diferentes superficies. Los microorganismos que poseen fimbrias y flagelos contribuyen en la hidrofobicidad sobre la superficie. Factores medioambientales, como lo es el pH, nutrientes, cargas iónicas, temperatura, y fluidez son importantes en la adhesión bacteriana al substrato, como la presencia de oxígeno, osmolaridad, productos de desecho y sustancias antagonistas producidas por las diferentes especies presentes como lo son las bacteriocinas, ácidos orgánicos (5). Es importante saber que el crecimiento y desarrollo de biopelículas consta de varias etapas, que implica la unión inicial, una fase de maduración, y una fase de dispersión.

Figura 2. Etapas de la formación de biopelícula



Fuente: The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. Duplantier AJ y col. 2013.

### 2.3.1 Etapas de la formación de la biopelícula:

- I. Unión inicial a una superficie biótica y/o abiótica: las células planctónicas o libres se unen mediante quimiotaxis o corriente de flujo a las superficies, que poseen características como hidrofobicidad, y presencia de cargas; una vez se da la fijación las bacterias forman una

capa de crecimiento, esta unión es de tipo reversible, y se ve influenciada por propiedades fisicoquímicas, y además por fuerzas de tipo repulsivo y/o de atracción como: interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, fuerzas hidrodinámicas e influenciado por la temperatura (4,10,40,46,48,49). Esta unión está mediada en *S. epidermidis* y *S. aureus* por la familia de proteínas MSCRAMMs dentro de las que se incluye la subfamilia cif-A (*clumping factor A* o factor aglutinante A, para el caso de *S. aureus* y proteína de unión al fibrinógeno (Fbe) en el caso de *S. epidermidis*, también se encuentra la 'autolisina asociada a superficie (Atl) en *S. aureus* y AtlE en *S. epidermidis*', que tienen la capacidad de unión al fibrinógeno, colágeno, elastina, vitronectina, trombospondina, sialoproteína ósea y fibronectina entre otras que permiten la estabilización de la adhesión (11,18-20). En bacterias Gram negativas se ha visto que la adherencia está mediada por flagelos, y fimbrias o pilis de tipo I, y IV, que se adhiere al receptor de la célula constituido por carbohidratos de glucoproteínas o glucolípidos en el caso *E. coli* uropatógena, posee una proteína; los genes involucrados en este proceso están codificados en el Operón pap (49,50). y la matriz se forma por polisacáridos como celulosa, el ácido colánico y la poli- $\beta$ -1,6-N-acetil-Dglucosamina (34). Recientemente, se ha encontrado que el Pia es producido en algunas cepas de *Escherichia coli*, siendo codificado por el locus *pga* (48). *P. aeruginosa* media su adherencia mediante hidrofobinas o adhesinas del tipo lectinas (49), además cuenta con fimbrias de tipo cup que ayudan a la adherencia célula-célula (51).

- II. Formación y maduración de la biopelícula: comprende dos sub-etapas, la primera es la agregación y la segunda es la estructuración de la biopelícula, siendo esta de tipo irreversible. En *Staphylococcus* la agregación se genera con la expresión de exopolisacáridos, proteína PIA (polisacárido adhesina intercelular) o también llamada por su

composición poli N-acetilglucosamina (PNAG), sintetizado por el Operón Ica, el cual posee cinco genes (40,52). IcaA e IcaD que codifican para la N-acetilglucosamina transferasa, sin embargo, IcaD actúa como chaperona, IcaB codifica para la histona PIA, que favorece el ensamblaje correcto de IcaA, e IcaC, a su vez estos codifican para oligómeros que permiten la unión a PIA. Además, se encuentra como gen regulador negativo IcaR, PIA facilita la agregación bacteriana y controlará la producción de exopolisacáridos de la biopelícula, mediante la desacetilación de los residuos de N-acetilglucosamina que da origen a la liberación de grupos amino libres a un pH neutro o ácido, a medida que se van cargando negativamente, así mismo otras bacterias del tipo planctónico se van agregando mediante co-agregación o co-adhesión (5,40,47–49,52,53), por lo tanto PIA permite una interacción electrostática que media la adherencia de células entre sí. Aunque la codificación de PIA es importante para la formación de biopelícula por la unión de célula-célula y por tanto la virulencia de *Staphylococcus*, no es indispensable (48). Cuando en la formación de la biopelícula no se encuentra presente PIA, hay presencia de la proteína Aap, cuyo peso molecular es de 220 kD, que necesita ser escindida proteolíticamente a una forma 140 kD más pequeño para inducir la formación de biopelícula' (40). Al igual que Aap existen otras proteínas que actúan de manera independiente de PIA para la formación de la biopelícula como lo es la proteína de unión a la matriz extracelular (Embp) encargada de la unión a la fibronectina, lo cual le permite al microorganismo la agregación masiva y el crecimiento de la biopelícula, y la proteína Bap/Bhp asociada a la biopelícula producida por *S. epidermidis*, la cual cumple la función principal de adhesión a superficies de polietileno (54–57).

En *S. epidermidis* también está presente el ácido poli- $\gamma$ -glutámico (PGA) un polímero extracelular, que le permite a esta bacteria crecer y subsistir en el organismo y en dispositivos médicos, un componente esencial en la evasión

del sistema inmune innato del huésped, como lo es la fagocitosis, mediada por neutrófilos y algunos péptidos antimicrobianos. Además, le otorga protección ante las altas concentraciones de sal, aunque no se ha determinado claramente la función biológica específica del PGA, este se ha destacado como un elemento protector del microorganismo a factores ambientales (58). De igual manera en *E. coli* la agregación está mediada por el antígeno 43 (Ag43) el cual promueve la adhesión célula-célula entre bacterias de la misma especie y también la formación mixta de biopelícula con otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*; el polímero de polisacárido  $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina, también se ha encontrado en *S. aureus* y *S. epidermidis*, vinculado con la adhesión celular como en la unión a las superficies. La producción de PGA depende del locus pgaABCD; el Operón pgaABCD de *E. coli* codifica proteínas implicadas en la síntesis, la exportación y localización del polímero PGA, que sirve como una adhesina para estabilizar las biopelículas (31,36). En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran tres tipos de exopolisacáridos implicados que ayudan a dar la estabilidad a la biopelículas, estos son: alginato, un polímero no ramificado compuesto de ácido D-manurónico y L-ácido gulurónico, el cual contribuye a la estabilidad estructural y protección de esta, así como a la retención de agua y nutrientes, Psl es un polímero de tipo pentasacárido repetitivo consistente en D-manosa, L-ramnosa y D-glucosa, y se produce durante el crecimiento planctónico, mediando la adhesión a las superficies y contribuyendo a la formación de la microcolonia. El ADN extracelular (eDNA) producido por *P. aeruginosa* constituye un importante componente de la matriz de las biopelículas, se ha evidenciado que este se involucra en fases tempranas de la formación de biopelículas ya que ayuda a la unión célula a célula (37,40). Este proviene de bacterias lisadas, muerte de neutrófilos del huésped, también se cree que ayuda a la adhesión microbiana y aumenta la versatilidad genética de la biopelícula (54,60–63). En la segunda etapa, la estructuración de la biopelícula encontramos que cuando está madura presenta una organización

tridimensional que permite la formación de ‘torres’, en la cual se encuentran canales que permiten el ingreso de nutrientes a la matriz, que se realiza mediante la interacción célula a célula a la vez que la señalización mediante el quorum sensing (QS), mecanismo intercelular que regula la densidad poblacional bacteriana, detectándola a través de la acumulación de moléculas señalizadoras e inductoras llamados péptidos estimulantes de competencia (CSP), reguladas a través de genes diferentes de acuerdo a la especie microbiana (5,40,46).

III. Dispersión o desmontaje: Este proceso se puede dar por dos mecanismos: Erosión (pérdida de células individuales) y la Migración (pérdida de agregados mayores) (5), diversos factores influyen en la degradación de la matriz de la biopelícula entre ellos encontramos la fuerza presente en el flujo de un vaso sanguíneo, la falta de producción de proteínas que median la continuación de la formación de biopelícula y la liberación de enzimas que catalizan la degradación, producidas por algunas bacterias o grupos de bacterias que se encuentran presentes en el medio ambiente para colonizar nuevas áreas o superficies (4). En el caso de los *Staphylococcus*, este mecanismo es regulado por el sistema agr, en *E.coli* existen diferentes mecanismos reguladores como RpoS, CRP, CreC y CsrA (36). La dispersión de la biopelícula por parte de *P. aeruginosa*, está dada por el sistema Rhl, el cual facilita dicha dispersión celular al igual que alginato liasa, la cual actúa como una fuente de nutrientes, modulando el metabolismo celular y, por lo tanto, induciendo el desprendimiento celular (51).

La generación de biopelícula está controlada por determinados reguladores como por ejemplo el quorum sensing, ‘un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, el auto inductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el auto inductor es principalmente



acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas es el auto inductor de péptidos. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del auto inductor este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos' (4). La manera en que la formación de la biopelícula sea un motivo de resistencia a los antibióticos, es porque se encuentra modulado por dos mecanismos:

- I. Prevenir que la sustancia antibacteriana alcance su objetivo
- II. La estructura física que conforma la biopelícula, y causa impermeabilidad, limitando su acción y eficiencia sobre el patógeno, sobre todo en antibióticos cuyo sitio activo se dirige hacia procesos celulares (40).

#### 2.4 Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los péptidos son moléculas polipeptídicas que hacen parte de la defensa natural de los organismos vivos, participan como componentes efectores del sistema inmune innato (64), son secretados naturalmente por diferentes células, queratinocitos, células epiteliales del tracto respiratorio, del tracto genitourinario, células de Paneth del intestino delgado, neutrófilos y células Natural Killer (NK) (8), aunque en mayor medida por las capas mucosas. Los péptidos poseen características hidrofóbicas, tienen carga positiva (65) y están constituidos por aminoácidos, estos a su vez están unidos por enlaces covalentes dados por el extremo grupo amino y carboxilo libres; los aminoácidos poseen un carbono alfa, al que están unidos grupos amino y carboxilo, tienen además un átomo de Hidrógeno y una cadena lateral; al poseer este Carbono alfa los aminoácidos presentan la propiedad de quiralidad, es así como los aminoácidos pueden ser L (levógiro o zurdo) o D (dextrógiro o diestro), dependiendo de la disposición espacial de los cuatro constituyentes mencionados, aunque las propiedades físicas y químicas son idénticas independientemente de cuál es la disposición espacial; por ende los péptidos pueden ser L o D, ya que los aminoácidos determinan las

propiedades bioquímicas de estos, encontrando que la mayoría de péptidos al igual que las proteínas son del tipo L (7–9,17). Los péptidos más importantes son del tipo D puesto que son resistentes a la proteólisis, ya que son menos inmunogénicos y que por tanto *in vivo* tiene una capacidad mayor para circular y ejercer su acción (23). Además los péptidos humanos se dividen en dos grandes grupos: Defensinas y Catelicidinas (52).

#### 2.4.1 Clasificación de los péptidos

Los PAMs se pueden clasificar de diferentes maneras, según su estructura secundaria o terciaria, según su composición 'como lineales, de hélice alfa (tales como cecropinas, magaininas y melitinas) que generalmente son los más importantes por poseer una estructura anfipática, caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos aminoácidos, que contienen puentes disulfuro (defensinas, protegrinas) y fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana' (7) láminas  $\beta$ , describiéndolos a continuación:

- I. Péptidos aniónicos, para ser funcionales requieren zinc como cofactor, actúan frente a Bacterias Gram positivas como para Gram negativas.
- II. Péptidos lineales catiónicos, son del tipo hélices  $\alpha$ , y adquieren esta conformación cuando están en presencia de la membrana celular bacteriana y así poderse insertar o afectar la misma, y en este grupo se encuentra el péptido LL 37 (hcAP18). Otros péptidos catiónicos incluyen bactericinas y PR-39, ricos en residuos de prolina (33- 49%) y arginina (13-33%), profenina que es rica en prolina (57%) y fenilalanina (19%) e indolicidina rica en triptófano. Estos péptidos carecen de residuos de cisteína' (8).
- III. Péptidos tipo láminas  $\beta$ , tienen una conformación antiparalela de cadenas, tipo defensinas que pueden o no estar unidas a puentes disulfuro que permiten mayor estabilidad al momento de ejercer su acción, pueden poseer carga tanto catiónica como aniónica, siendo 380 los pertenecientes a este grupo (17) dentro de los que encontramos por

ejemplo las defensinas beta (hBD, Human Beta Defensin) como hBD-1, hBD-2 y hBD-3, que se expresan frente a diferentes estímulos, en donde las defensinas hBD-1 y hBD-3 se expresan de forma constitutiva, mientras que la expresión de hBD-2 aumenta en respuesta a diferentes estímulos como por ejemplo una infección (8,17).

Según su actividad biológica podemos encontrar péptidos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antitumorales, antiparasitarias, espermicidas e insecticidas o que pueden presentar dos tipos de actividad al mismo tiempo, y todo depende de la conformación membranar del blanco del péptido (7,17). Con el tiempo se han desarrollado péptidos de origen sintético, cuya diferencia a uno natural está dada por la modificación en su estructura y función que permite una mejor acción frente al patógeno, como por ejemplo el aumento de la carga positiva reduciendo al mínimo la hidrofobicidad, para conseguir que los PAMs sean más activos y menos citotóxicos, (7) estos por lo general suelen ser cortos, cíclicos y con residuos modificados (como D- aminoácidos o aminoácidos no naturales). De igual manera están los péptidos miméticos, imitan la actividad de los PAMs, diseñados con modificaciones estructurales que tratan de solucionar las falencias de los péptidos naturales y los péptidos sintéticos, como evitar la hidrólisis por proteasas y la disminución de la hidrofobicidad (17). Teniendo en cuenta la acción que ejercen los péptidos sobre la composición estructural de la membrana celular, teniendo en cuenta que las bacterias Gram positivas poseen en esta una bicapa de fosfolípidos y las bacterias Gram negativas poseen dos membranas compuestas por fosfatidilestanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina, 'se ha comprobado que las bacterias con niveles más altos de lípidos cargados negativamente son más susceptible a los PAMs' (17).

## 2.5 Péptido LL-37

La Catelicidina LL-37 posee un peso de 18 KDa, se ha estudiado bastante por la capacidad quimiotáctica sobre diferentes células del sistema inmune (7,17,66,67), es un agente terapéutico contra gran cantidad de enfermedades, como infecciones y cáncer, además posee gran capacidad de destruir biopelículas bacterianas y la membrana de diferentes microorganismos (10). Este péptido es llamado así por su capacidad de inhibir la proteasa Catepsina-L, este péptido presenta los dos dominios, C-terminal encargado de codificar el péptido maduro, ya que este se sintetiza como pre-proteína y el dominio N-terminal, posee 37 aminoácidos, es de tipo anfipático, y posee carga catiónica (9,10,16,64,68). Su expresión está dada en diferentes tipos celulares como células del epitelio intestinal, genitales, piel, testículos, sistema respiratorio y células del sistema inmune innato como neutrófilos, células Natural Killer, células dendríticas, linfocitos, mastocitos entre otras (18,68). Sus propiedades antimicrobianas varían de Gram positivas a Gram negativas, aunque muestra una gran afinidad de unión por los lipopolisacáridos neutralizando su actividad biológica, de igual manera se ha demostrado que poseen buena eficacia frente a la inhibición de la biopelícula *in vitro* sobre todo en la formación de la misma por parte de *S. aureus* y *P. aeruginosa* a través del bloqueo de moléculas intracelulares involucradas en el Quorum Sensing, afectación de la membrana generando poros en la misma, y la posible prevención de la fijación inicial. Se ha encontrado que LL 37 puede ser degradado por enzimas proteolíticas secretadas por diferentes microorganismos (9,68).

### 2.5.1 Síntesis

Teniendo en cuenta la forma en la que los péptidos se originan, se encuentra la síntesis natural en respuesta inflamatoria mediada por citocinas o estímulos específicos ante la interacción con un patógeno mediante macromoléculas microbianas (7).

### 2.5.2 Mecanismo de interacción Péptido-Bacteria

La interacción de los péptidos de acuerdo con el contenido y tipo de membrana es de gran importancia, hay diferentes tipos de mecanismos por los cuales la membrana y el péptido van a interactuar dándose así la acción del péptido:

- I. Mecanismo barrel-stave: consiste en que el péptido al tener contacto con la membrana va a interactuar y se va a generar una reorientación del péptido perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares, y enfrentan el centro creando un poro hidrofílico (7), que permitirá que se genere una alteración membranal puesto que se pierde el equilibrio osmótico (8).
- II. Mecanismo forma anular: luego de la unión de los péptidos a la membrana, los lípidos se pliegan formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos (8).
- III. Mecanismo de alfombra: en este tipo de mecanismo no hay contacto del péptido, sino que se acumula en la membrana, los péptidos son atraídos por los grupos fosfato, cubriendo así la membrana, formándose micelas, denominado efecto detergente, lo que genera debilitamiento de la misma con lo que se produce pérdida del citoplasma y por tanto muerte celular (7,8).
- IV. Mecanismo de agregado: cuando hay la interacción el péptido se crea una estructura similar a un micelio formando canales por los cuales la célula empezará a perder iones y por tanto se dará la muerte celular (7,8).
- V. Mecanismo poro toroidal: actúan péptidos alfa hélice, que inducen a que los lípidos se plieguen sobre sí mismos, formándose un poro con los grupos hidrofílicos orientados hacia el centro del poro, atrapando agua en el corazón del mismo (8,9), generando pérdida de iones y sustancias metabólicas (65).

Existen variables que pueden afectar la actividad y especificidad de los PAMs dentro de las que se destacan el tamaño, la secuencia, carga, conformación, estructura, hidrofobicidad y anfipaticidad (16,69). La actividad de los péptidos frente a un microorganismo se puede evaluar mediante ensayos *in vitro* los cuales evidencian el comportamiento del microorganismo cuando es expuesto a estos, lo cual se puede evidenciar directamente en la curva de crecimiento de los microorganismos expuestos reflejando cambios o alteraciones.

## 2.5 Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento bacteriano ponen en evidencia o no el aumento de constituyentes y estructuras celulares con la posterior división celular. Presentan cuatro fases principales: latencia, exponencial o logarítmica, estacionaria, y muerte (1).

- I. Latencia o adaptación (Fase Lag): Esta fase se divide en Lag1 en la cual no se incrementa el número de células, ya que están siendo expuestas a un nuevo medio de crecimiento, pero mientras se adaptan a las nuevas condiciones de crecimiento presentan actividad metabólica. En la fase Lag2 los microorganismos sufren una adaptación a las condiciones del medio y ocurre crecimiento de biomasa, pero sin generación de división celular, cada una de las células incrementa su tamaño, el contenido de proteínas y ADN (70,71).
- II. Exponencial o logarítmica (Log): En esta fase la población de microorganismos se eleva de manera exponencial debido a que pasado cierto tiempo, estos se duplican en gran velocidad cuando las condiciones de crecimiento son las adecuadas, pero puede estar influenciada por ciertos factores ambientales que afectan el crecimiento como lo es la temperatura y composición del medio (71).
- III. Fase estacionaria: Aquí los microorganismos no presentan crecimiento exponencial dado que hay ausencia de nutrientes, estrés, presencia de

sustancias tóxicas, por tanto, no hay cambios significativos de la densidad celular con respecto al tiempo, existiendo un equilibrio entre los microorganismos vivos y muertos (71).

- IV. Muerte: Fase en la que incrementan los microorganismos muertos ya sea porque los nutrientes se han consumido y las condiciones del medio de cultivo ya no son adecuadas para que el microorganismo continúe con su crecimiento (71).

### 3. DISEÑO METODOLOGICO

Se utilizaron cepas clínicas provenientes de diferentes Hospitales de la ciudad de Bogotá, distribuidas de la siguiente manera: 15 cepas de *S. aureus* y 15 cepas de *S. epidermidis*, con presencia del Operón icaADBC, y 10 cepas de bacterias Gram negativas tanto de *E. coli* como de *P. aeruginosa*.

Así mismo, se utilizaron como controles la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis* que no es formadora de biopelícula, y la cepa USA 300 de *S. aureus*, la cepa ATCC 35984 de *S. epidermidis*, la cepa ATCC 35218 de *E. coli* y la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* formadoras de biopelícula, que se encontraban criopreservadas en medio LB + 10% Glicerol a -80° C, en el cepario del Semillero REMA (Relaciones epidemiológicas y moleculares asociadas al laboratorio clínico). Para la recuperación los aislamientos clínicos se sembraron por agotamiento en agar BHI (BD. BBL TM) y se incubaron a 37° C por 24 horas, confirmando su pureza por observación macroscópica.

#### 3.1 Escala McFarland

Posteriormente se realizó una suspensión de las cepas en estudio de una o más unidades formadoras de colonias en 5 mL de caldo BHI (BD. BBL TM) para alcanzar una concentración de 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a una suspensión microbiana de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL, confirmada mediante el espectrofotómetro Genesys 10 UV/VIS en una longitud de onda de 620 nm, y obteniendo absorbancias entre 0,08 a 0,1 (16).

#### 3.2 Péptidos antimicrobianos

En cuanto a los péptidos antimicrobianos a partir del péptido LL-37 se crearon 2 modificaciones estructurales, las cuales fueron un péptido LL-37 acetilado en el grupo amino terminal denominado AC-LL37-1 y un enantiómero D con dos fenilalanina en los extremos de la secuencia del péptido, es importante



aclarar que las secuencias de los péptidos no se muestran por confidencialidad del grupo de investigación REMA, quien ha creado estos péptidos en asociación con la Universidad Nacional de Colombia. Se recalca que en investigaciones previas de REMA ya se ensayó el péptido LL-37 para las cepas Gram positivas usadas en este estudio.

### 3.3 Reconstitución de péptidos

Los péptidos estaban liofilizados, por lo cual se tomó 3 mg de cada uno de los péptidos pesados en una balanza analítica marca Sartorius, posteriormente se reconstituyeron en 725  $\mu$ L de agua ultrapura para el péptido AC-LL37-1; 690  $\mu$ L de agua ultrapura para el péptido D-LL37-1 y 736  $\mu$ L de agua para el péptido LL-37-1, en tubos eppendorf de 1.5 mL, los volúmenes variaron por la diferencia en los pesos moleculares de cada uno de ellos, quedando todos a una concentración final de 1000  $\mu$ M, y a partir de esta concentración se utilizaron en este proyecto de investigación concentraciones finales de 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 1.25  $\mu$ M, y 0.62  $\mu$ M aplicando la siguiente formula:  $V1 * C1 = V2 * C2$

### 3.4 Curvas de Crecimiento y comparación de los resultados

Las curvas de crecimiento se procesaron en el equipo Bioscrenn C, con lecturas de densidad óptica (D.O) de 600 nm cada hora durante 48 horas a una temperatura de 37°C, con agitación constante, en cada pozo de la microplaca se agregó 270  $\mu$ L de caldo Luria Bertani más 30  $\mu$ L de la suspensión sin el péptido y para determinar la actividad de los péptidos se colocó la mezcla de LB con cada uno de ellos a una concentración final de la reacción de 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 1.25  $\mu$ M, y 0.62  $\mu$ M, más 30  $\mu$ L de la suspensión bacteriana por triplicado de las cepas bacteriana y los controles a la escala McFarland  $1,5 * 10^8$ . Teniendo en cuenta estas concentraciones de péptido se llevó a volumen 270  $\mu$ L de la siguiente manera:

- a) Concentración de 5  $\mu\text{M}$  se debe adicionar 268,5  $\mu\text{L}$  del medio más 1,5  $\mu\text{L}$  el péptido
- b) Para la concentración de 2,5 se toma 269,25  $\mu\text{L}$  del medio con 0.75  $\mu\text{L}$  del péptido
- c) Para la concentración 1.25  $\mu\text{M}$  se toma 269,63  $\mu\text{L}$  de medio más 0,375  $\mu\text{L}$  del péptido
- d) Concentración de 0,62  $\mu\text{M}$  se toma 269.81  $\mu\text{L}$  del medio y 0,19  $\mu\text{L}$  del péptido.

### 3.5 Porcentaje de tasa de inhibición

La tasa de inhibición permite establecer el crecimiento de una población bacteriana en función de la concentración de un antibiótico o péptido al que ha sido expuesto (72). Para hallar la tasa de inhibición con las gráficas obtenidas según las D.O. en cada una de las cepas con y sin tratamiento del péptido, se empleó la fórmula basada en los estudios de T. Safaa et al (2015) y J. Noore et al (2013) (73,74), donde se debe tener en cuenta fase logarítmica tardía con y sin el péptido, ya que en esta etapa se empiezan a agotar los nutrientes, lo que genera una disminución en la producción de macromoléculas y se ocasiona una disminución en la división celular y al mismo tiempo en esta fase de la curva de crecimiento la concentración celular alcanza su máximo valor (75,76).

% inhibición:  $\frac{\text{media D.O Fase log tardía cepa} - \text{media D.O fase log tardía de la cepa con péptido}}{\text{media D.O Fase log tardía cepa}} * 100$

### 3.6 Cristal violeta.

El cristal violeta se usó para evidenciar el porcentaje de inhibición en la formación de biopelícula en presencia del péptido, teniendo en cuenta la técnica empleada por Christensen y col. (1985); las muestras con péptido y sin péptido se analizaron por triplicado para ello se dispensó en la microplaca de 96 pozos 2  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana a 0,5 escala MacFarland y 198  $\mu\text{L}$  de caldo LB más glucosa al 1%, para determinar la actividad antibiopelícula, es

importante anotar que a los péptidos se les realizó las determinaciones a la concentración de 5  $\mu\text{M}$  del péptido diluido. Posterior a esto para evaluar la adherencia, las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, luego se descartó el sobrenadante y el pellet se fijó con Paraformaldehído al 4%, agregando 20  $\mu\text{L}$  por 10 minutos, luego se elimina el reactivo mediante inversión y dando un golpe seco a la placa, para retirar el exceso de este reactivo se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejó secar durante 10 minutos, después se agregó 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta al 1%, y se deja reaccionar durante 10 minutos. El exceso de colorante se retiró mediante 4 lavados con agua destilada para luego leer en el lector de microELISA (TECAN INFINITE 200 PRO) dos lecturas de absorbancia: D.O. 492 nm y 570 nm a cada pozo.

## 4. RESULTADOS

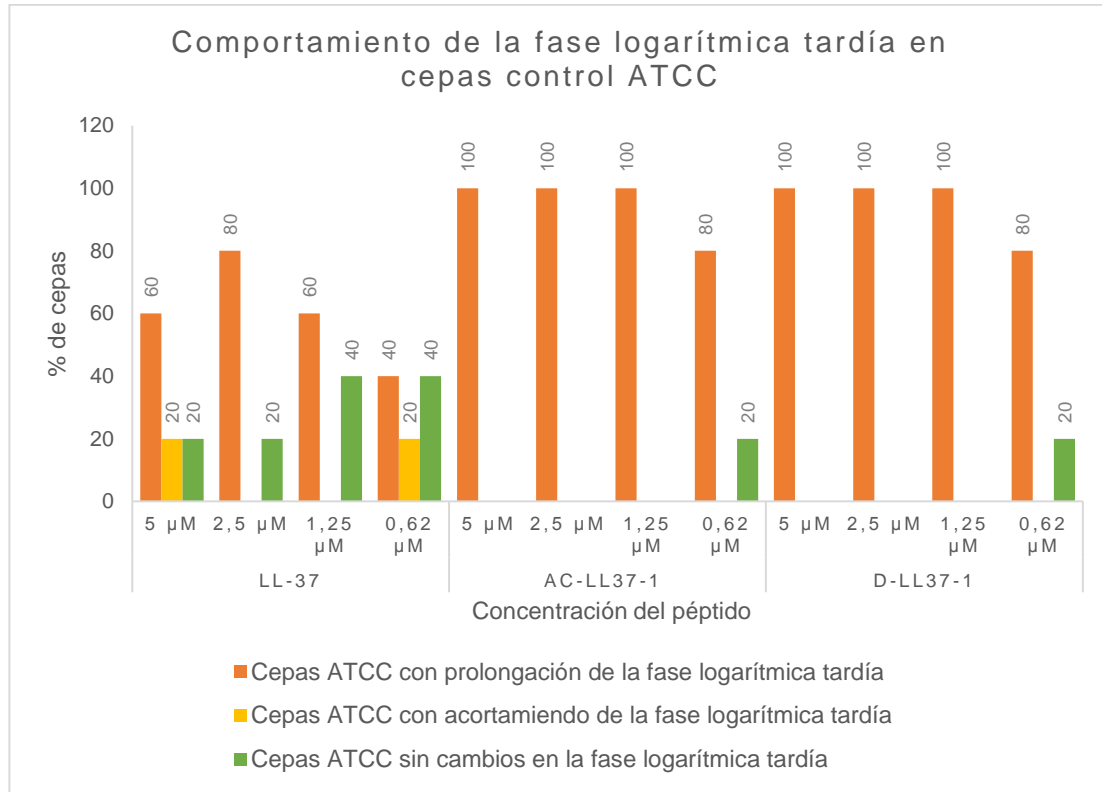
### 4.1 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron para obtener el porcentaje de inhibición de masa celular en su fase logarítmica tardía mediante la relación de la densidad óptica de las cepas bacterianas sin y con los péptidos LL-37, AC-LL37-1 y D-LL37-1 a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$ , y 0.62  $\mu\text{M}$ .

Las cepas bacterianas que fueron analizadas correspondieron a controles positivos para la formación de biopelícula: ATCC USA 300 *S. aureus*, ATCC 35984 *S. epidermidis*, ATCC 35218 *E. coli* y ATCC 27853 *P. aeruginosa*, así como el control negativo para la formación de biopelícula ATCC 12228 *S. epidermidis*, en cuanto a las cepas bacterianas de aislamiento clínico se evaluaron 40 aislamientos clínicos distribuidos así: 15 cepas de *S. aureus*, 15 cepas de *S. epidermidis*, 2 cepas de *E. coli* y 8 cepas de *P. aeruginosa*. Las gráficas obtenidas de las curvas de crecimiento de todas las muestras se presentan en el ANEXO 1: Figura 1 a 16 aislamientos de *S. aureus*, Figura 17 a 33 aislamientos de *S. epidermidis*, Figura 34-36 aislamientos de *E. coli* y Figuras 37 a 45 aislamientos de *P. aeruginosa*.

Los cambios que se observaron en la fase logarítmica tardía se clasificaron de tres maneras: prolongación, acortamiento y sin cambios en la fase logarítmica tardía, estos dependen de las características químicas del péptido y se pueden observar en las cepas control ATCC de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* Figura 3.

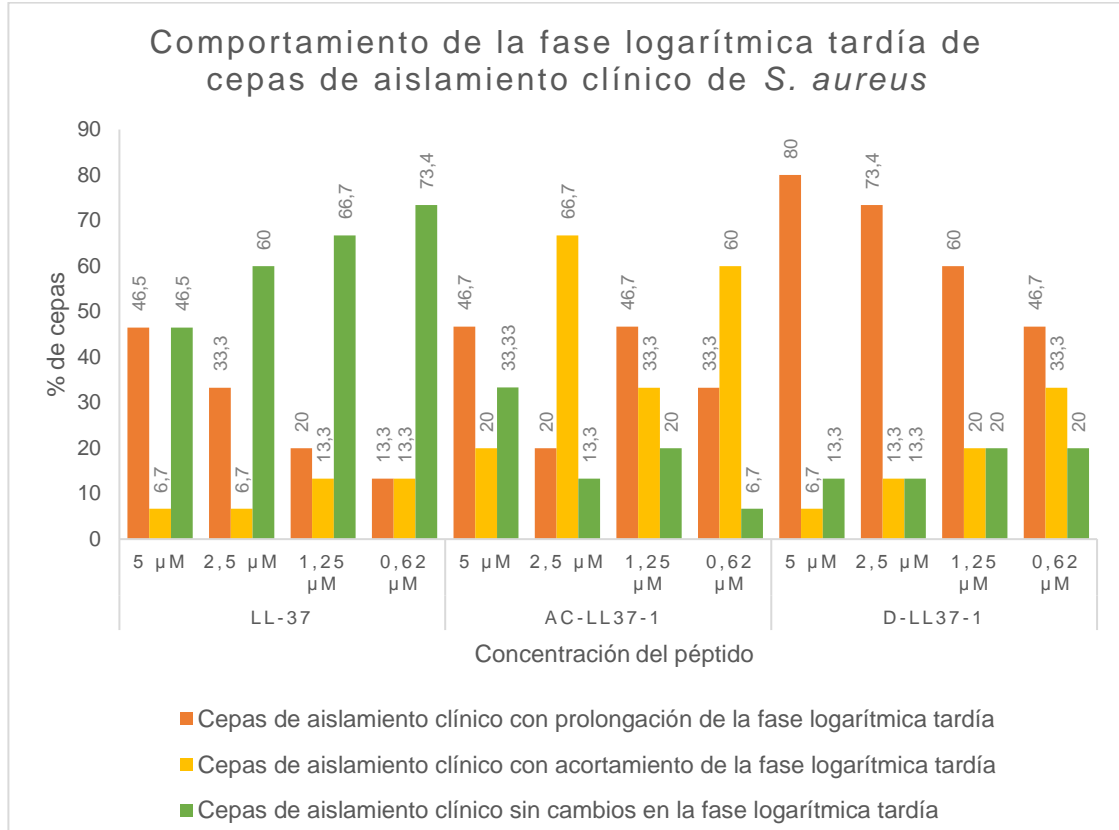
Figura 3. Comportamiento de la fase logarítmica tardía en los controles (cepas ATCC) tratados con los péptidos



Fuente: Acosta E. y Martinez W.

En las cepas de *S. aureus* los péptidos LL-37 y AC-LL37-1 a una concentración de 5μM prolongan la fase logarítmica tardía en el 46,5% y 46,7% respectivamente de las 15 cepas de aislamiento clínico analizadas, mientras que el péptido D-LL37-1 alarga esta fase con la misma concentración en un 80% de las cepas analizadas, sin embargo, a una concentración de 2.5 μM el péptido AC-LL37-1 acorta esta fase en un 66,7% de las cepas de aislamientos clínicos como se evidencia en la Figura 4.

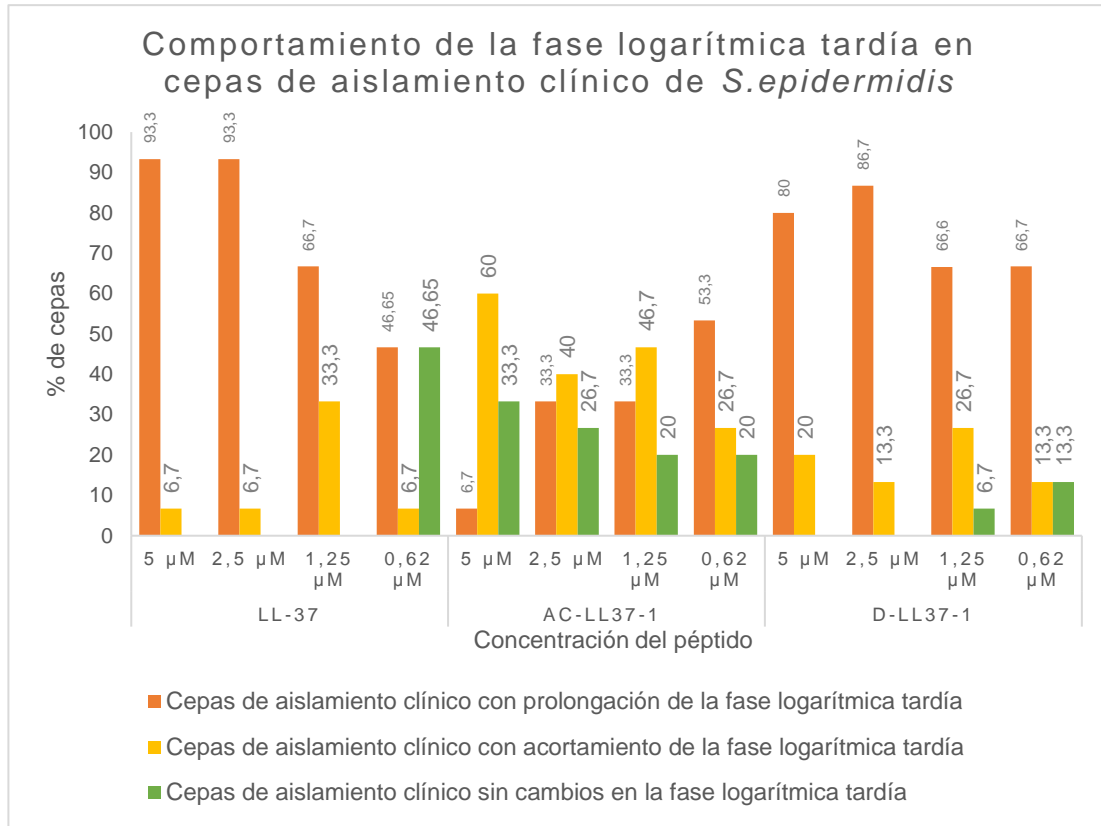
Figura 4. Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamiento clínico en *S. aureus*



Fuente: Acosta E. y Martinez W.

El resultado obtenido para los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* es similar con los péptidos LL-37 y D-LL37-1 con un porcentaje de 93.3% y 80% de cepas que prolongaron la fase logarítmica tardía respectivamente, mientras que péptido AC-LL37-1 acorta la fase logarítmica a una concentración de 5 μM en el 60% de los aislamientos clínicos y a una concentración de 2.5 μM, el péptido AC-LL37-1 acorta esta fase en un 40% de las cepas de aislamiento clínicas como se muestra en la Figura 5.

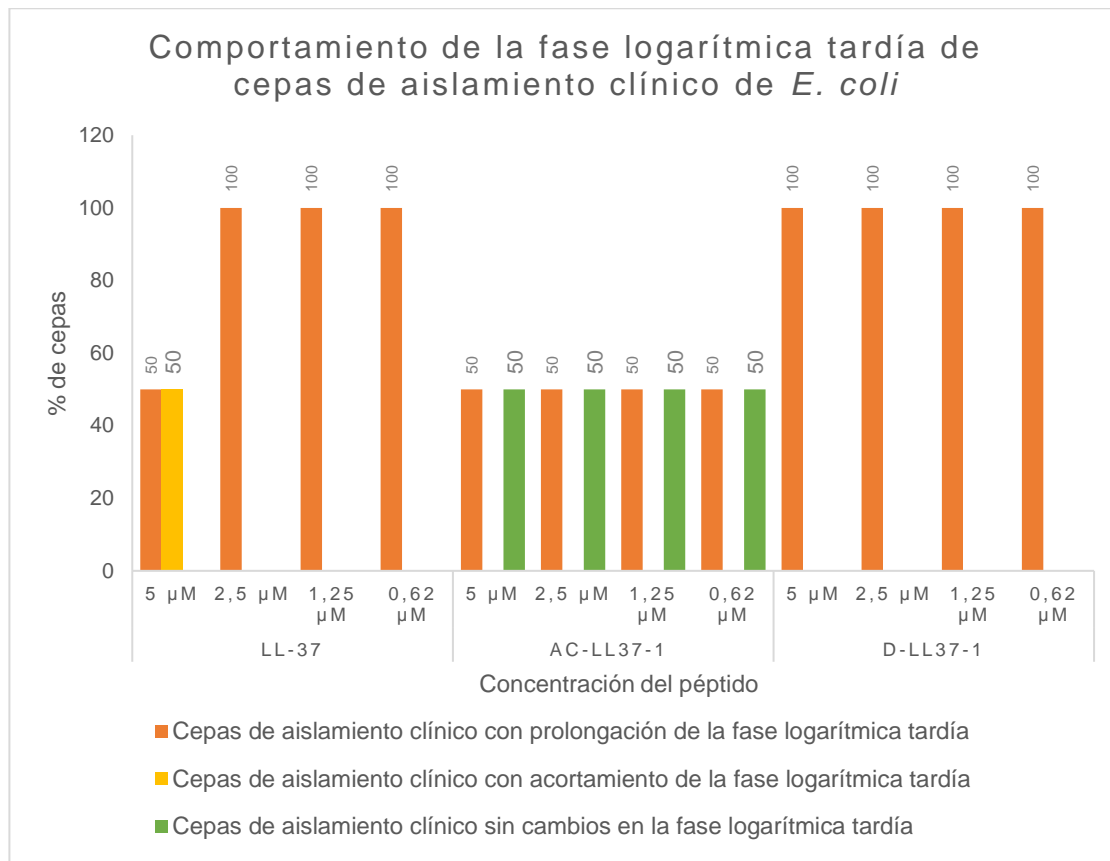
Figura 5. Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamientos clínicos de *S. epidermidis*



Fuente: Acosta E. y Martinez W.

En las cepas de *E. coli* con los péptidos LL-37 y AC-LL37-1 a concentración de 5 μM únicamente uno de los aislamientos presentó prolongación de la fase logarítmica tardía y el otro realiza un fenómeno contrario ya que acorta esta fase, mientras que con el péptido D-LL37-1 la prolongación de esta fase es de un 100%; con las demás concentraciones para el péptido LL-37 y D-LL37-1 esta fase se prolonga en un 100%, mientras que con el AC-LL37-1 no siguen presentando el mismo comportamiento que a la concentración de 5 μM. Figura 6.

Figura 6. Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamientos clínicos de *E. coli*

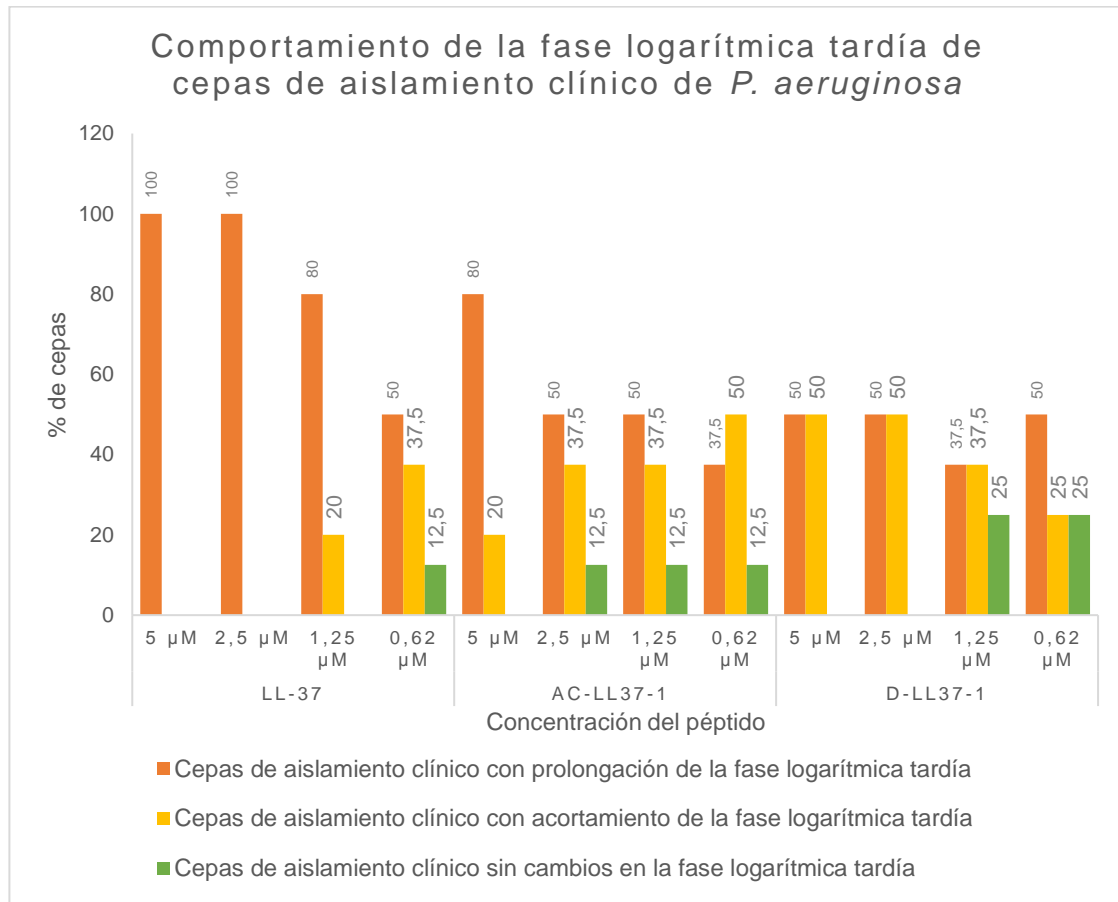


Fuente: Acosta E. y Martínez W.

Mientras que en las cepas de aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* con los péptidos LL-37, AC-LL 37-1 Y D-LL37-1 a concentración de 5 μM hay una prolongación de la fase logarítmica tardía con un porcentaje de 50%, 50% y 100% de cepas respectivamente, mientras que para las demás concentraciones no se encuentran cambios significativos Figura 7.



Figura 7. Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*



Fuente: Acosta E. y Martinez W.

Las curvas de crecimiento permitieron evidenciar la relación de las D.O. obtenidas por horas, y así obtener el promedio de estas en la fase logarítmica tardía con la concentración de 5 μM y con cada uno de los péptidos (ANEXO 2, Tablas 1-4), con posterior obtención del % de la tasa de inhibición (ANEXO 4, Tablas 1-4), mediante las cuales con la concentración de 5 μM se obtuvieron los siguientes resultados: el porcentaje de inhibición del péptido LL-37 en el rango de inhibición 10-17% con un 40% de cepas que presentaron esta inhibición siendo el más alto para las cepas en *S. aureus* (Tabla 1), el mayor

rango para *S. epidermidis* es el péptido D-LL37-1 en un rango de 50-87.4% de inhibición (Tabla 2) y para *E. coli* con un rango de inhibición del 64.3-100% la totalidad de cepas (100%) presentaron inhibición con D-LL37-1 (Tabla 3), y para las cepas de *P. aeruginosa* es el péptido LL-37 y D-LL37-1 con un rango de 49.8-100% (Tabla 4).

Tabla 1. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración 5 µM en cepas de *S. aureus*

Rangos de inhibición de la masa celular con concentración de 5 µM en cepas de aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	AC-LL37-1	D-LL37-1
20 – 27.6%	13.3 %	0%	0%
10- 17.8%	40%	0%	6.7%
0- 10%	6.7%	53.3%	60%
Cepas que no presentan inhibición	40%	46.7%	33.3%

Fuente: Acosta E. y Martinez W

Tabla 2. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración 5 µM en cepas de *S. epidermidis*

Rangos de inhibición de la masa celular con concentración de 5 µM en cepas de aislamientos clínicos de <i>S. epidermidis</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	AC-LL37-1	D-LL37-1
50-87.4%	13.3%	0%	46.7%
40-47.6%	0%	6.7%	26.7%
20-34.4%	13.3%	0%	13,3%
10-18%	0%	6.7%	0%
Menor al 10%	6.7%	26.6%	13.3
Cepas que no presentan inhibición	66.7	60%	0%

Fuente: Acosta E. y Martinez W.

Tabla 3. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración de 5 µM en cepas de *E. coli*

Inhibición de la masa celular con concentración de 5 µM en cepas de aislamientos clínicos de <i>E. coli</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	AC-LL37-1	D-LL37-1
64.3- 100%	100%	0%	0%
20-41.2%	0%	0%	50%

0- 10%	0%	0%	50%
Cepas que no presentan inhibición	0%	100%	0%

Fuente: Acosta E. y Martínez W.

Tabla 4. Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración de 5  $\mu$ M en cepas de *P. aeruginosa*

Rangos de iinhibición de la masa celular con concentración de 5 $\mu$ M en cepas de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	AC-LL37-1	D-LL37-1
49.8- 79.4%	25%	12.5%	12.5%
40-45%	25%	0%	12.5%
20-39 %	0%	25%	37.5%
0- 19%	50%	62.5%	37.5%
Cepas que no presentan inhibición	0%	0%	0%

Fuente: Acosta E. y Martínez W.

#### 4.2 Cristal violeta, determinación de la formación de Biopelícula

Mediante este método se logró identificar la actividad de los péptidos LL-37, AC-LL37-1 y D-LL37-1 en la inhibición de la biopelícula y teniendo en cuenta el uso de Cristal violeta como revelador ante formación de biopelícula. Las muestras y los controles fueron leídos a las 6 y 12 horas en presencia y ausencia del péptido LL-37 a una concentración de 5  $\mu$ M, la razón de probarlos sólo con este péptido es por los resultados anteriormente obtenidos que reflejan una actividad biológica alta comparada con los otros dos péptidos y concentraciones del presente estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Inhibición de las cepas Gram negativas a las 6 y 12 horas con el péptido LL-37 a concentración de 5  $\mu$ M

Rango de inhibición	Porcentaje global de muestras de aislamiento clínico a las 12 horas	Porcentaje global de muestras de aislamiento clínico a las 6 horas
Mayor al 50%	30%	0%
Entre 20-49%	30%	20%

Menor a l 20%	10%	40%
No inhibición del péptido	30%	40%

Fuente: Acosta E. y Martinez W.

En las cepas Gram positivas se quiso mostrar la reacción ante los péptidos LL-37, AC-LL37-1 y D-LL37-1 durante 12h de exposición a concentración de 5  $\mu$ M como se evidencia en la tabla 6.

Tabla 6. Inhibición de cepas Gram positivas a las 12 horas con el péptido LL-37, AC-LL37-1 y D-LL37-1 a concentración de 5  $\mu$ M.

Rango de inhibición a las 12 h	Péptido LL -37 a concentración de 5 $\mu$ M.	Péptido AC-LL37-1 a concentración de 5 $\mu$ M.	Péptido D-LL37-1 a concentración de 5 $\mu$ M.
50-75%	9,1%	18,2%	9,1%
20-45,5%	18,2%	27,2%	18,2%
0-18%	0%	18,2%	54,5%
No hay inhibición	72,7%	26,6%	18,2%

Fuente: Acosta E. y Martinez W.

## 5. DISCUSIÓN

Las células procariotas producen PAMs como parte de una competencia estratégica para adquirir nutrientes o ganar el acceso a un nicho, también son producidos por organismos vivos con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y/o lisar a las bacterias, mediado por la respuesta innata en las células eucariotas, siendo el sitio de acción principal de estos la membrana bacteriana (77).

Estos efectos se pueden observar cuando se realizan curvas de crecimiento y se evalúa la disminución de la tasa de crecimiento bacteriano lo cual va a depender del tamaño de la célula, y se correlaciona con el incremento del DNA bacteriano; cuando las bacterias son sometidas a stress se pueden generar cambios dinámicos en la bacteria, especialmente en la formación de masa celular, en la unión y adhesión; el uso de los péptidos LL-37, AC-LL37-1 y D-LL37-1, permite evidenciar en las curvas de crecimiento si en la fase logarítmica tardía el tiempo se puede prolongar o acortar, esto depende de las características químicas y estructurales del péptido, y de la replicación bacteriana, que determinan la influencia y actividad para generar la formación de poros y daños en la membrana citoplasmática, esto se relaciona con los resultados obtenidos, donde en las cepas tanto de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* los péptidos LL-37 y D-LL37-1 prolongan la fase log tardía a una concentración de 5  $\mu$ M, mientras que el péptido AC-LL37-1 presenta una actividad contraria (Figuras 3-6).

Estas actividades de los péptidos, permiten determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano en ambientes homogéneos, cuando se compara la cepa sin tratamiento y con tratamiento, donde los resultados pueden ser influenciados por la fisiología y división celular, los diferentes fenotipos y el déficit de nutrientes, por lo cual se debe determinar en la fase

logarítmica tardía, pues en ella se encuentra la mayor concentración celular bacteriana (78).

Esto demuestra que la bacteria incrementa o disminuye su fase logarítmica tardía dependiendo de las características de microcolonias cuando son sometidas a stress como lo mencionó Wang L y col, 2018 (79), o también por la actividad propia del péptido y por el sitio de acción basado especialmente sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática especialmente con lípidos tipo II presentes en las bacterias Gram negativas (77), quizás esta sea la razón por la cual el péptido LL-37 presenta mayor actividad con esta tipo de bacterias (Figura 6 y 7).

Mediante los ensayos realizados se evidenció que se genera en las curvas de crecimiento una actividad característica cuando las cepas están expuestas a los péptidos; en cepas Gram Negativas los péptidos LL-37 y D-LL37-1, generan en las curvas una prolongación en horas de la fase logarítmica tardía, prolongándose esta por más de 4 horas con la concentración de 5  $\mu$ M respecto a la cepa sin tratamiento con los péptidos, como se evidencia en ANEXO 1 Figura 34A y B, 39A, y ANEXO 3 Figura 4, observándose así una relación adecuada entre las concentraciones menores y la menor extensión de la fase logarítmica tardía. Dicho incremento de esta fase se ha relacionado con mayor capacidad de las células bacterianas con tolerancia a los antibióticos (70).

Por otra parte, se notó que tanto en algunas de las cepas como de los controles de *S. aureus* y *S. epidermidis*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, exhiben en sus curvas de crecimiento fenómenos diaúxicos (ANEXO 1, Figuras 11B, 17B, 20A-B, 33 A-B, 35B, 36B, 40A-B, 41A-B y ANEXO 3 Figuras 7, 11 y 12), que se presentan cuando el microorganismo tiene a su alcance más de un azúcar o nutriente y, en lugar de metabolizarlos simultáneamente, los consume en forma secuencial, obteniéndose dos fases de crecimiento, en la primera fase, el microorganismo consume aquel nutriente para el cual su metabolismo le

permite crecer a una mayor velocidad, dejando una segunda fase de crecimiento más lento (80), así mismo Archer et al (2011) refiere que la matriz extracelular es capaz de tomar y concentrar diferentes nutrientes que rodean el ambiente. Por lo anterior se plantea la hipótesis de que el microorganismo al poseer la capacidad de tomar otros nutrientes que se encuentren presentes en el medio, como lo podría ser el mismo péptido hace necesario que la dosificación del péptido se realice antes de que estos patógenos presenten dicho crecimiento diaúxico.

Con respecto a las bacterias Gram negativas en las curvas de crecimiento se puede observar (ANEXO 1, Figuras 34A-B, 36B, 37A-B, 38A-B, 39A-B, y 40A-B-45<sup>a</sup>-B) que los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1 ejercen una inhibición y disminución en la D.O. de la curva de crecimiento frente a las cepas control con la concentración de 5  $\mu$ M, lo cual indica que dichos péptidos actúan de mejor manera en cepas de bacterias Gram negativas a diferencia de las cepas Gram positivas.

En cuanto a la actividad antibiopelícula Hochbaum y colaboradores (2011), realizaron un estudio en el cual mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal de barrido láser, determinaron cuál era el mecanismo por el cual los D-aminoácidos logran inhibir las biopelículas de *S. aureus*, y se encontró mediante el método de cristal violeta que los D-aminoácidos previenen la formación de biopelícula, luego a través de microfotografías se demostró que los D-aminoácidos (D-Tyr, D-Pro y D-Phe) produjeron una buena inhibición de biopelícula, pero no influyeron en el crecimiento bacteriano, por lo cual la hipótesis que ellos formularon fue que los D-aminoácidos previenen la localización de proteínas, no permitiendo la unión celular, y así evitar formar agregados celulares que conformen la biopelícula (45).

Una de las mayores preocupaciones ante el uso terapéutico de los péptidos antimicrobianos es la resistencia o susceptibilidad de los mismos a la acción enzimática, proteasas derivadas ya sea por parte del huésped o generadas

durante el crecimiento por parte de los patógenos perdiendo así rápidamente la actividad *in vivo* (13,19,67). En las cepas de *S. aureus* se encontró una potencia aparentemente disminuida de D-LL37-1 (Tabla 1), característica que puede reflejar deficiencias en la capacidad del isómero peptídico para interactuar eficazmente con la membrana celular bacteriana Gram positiva (82). En el caso de este proyecto se evidenció que el péptido LL-37 presentó mayor actividad en las cepas de aislamiento clínico de *S. aureus* analizadas (Tabla 1); como se ha mencionado este péptido tiene gran susceptibilidad a proteinasas denominadas metaloproteasas derivadas de mecanismos de defensa de *S. aureus*, dentro de las cuales la que ejerce la acción es la aureolisina, la cual segmenta e inactiva el péptido de manera dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de esta enzima (84). Otro grupo de enzimas son las glutamil endopeptidasa, dentro de la que se encuentra la V8, estas fragmentan el péptido en determinadas regiones del dominio C-terminal, lo cual genera que este pierda actividad; por lo cual sugieren la hipótesis de que el péptido LL-37 posee su mayor acción en el dominio C-terminal, pero de acuerdo a los autores, la pérdida de actividad bactericida del péptido solo ocurre con la aureolisina, y mientras que la enzima V8 sólo lo escinde mas no afecta su actividad antibacteriana (10,83). De igual manera Nell (2006) confirma que la actividad antibiopelícula o inhibitoria reside en su dominio C-terminal (51, 66), a la par Joo HS et al (2016), y Li M et al (2007) confirman que la aureolisina y V8 inactivan proteolíticamente el péptido.

Una posible hipótesis del porque el péptido D-LL37-1 no ejerció efecto en las cepas de *S. aureus* se puede deber a que las modificaciones realizadas al péptido nativo, no lograron evitar la acción de proteasas o enzimas producidas por estos patógenos, a pesar de que en investigaciones de Wade y col. (1990) y Dean y col. (2011) se reporta que los D aminoácidos y péptidos dextrógiros son resistentes a la acción enzimática.



Al contrario, el péptido en su forma isomérica D-LL37-1 actúo de mejor manera en algunas cepas de *S. epidermidis* (Tabla 2, ANEXO 1: Fig 18B-24B, 26B-31B) del presente estudio, teniendo en cuenta a Duplainter et al (2013) quien refiere que 'el grado de  $\alpha$ -helicidad del péptido parece correlacionarse con la actividad antibacteriana de LL-37 frente a bacterias Gram Positivas y Gram Negativas' (10). Quizás este péptido logro mayor actividad por presentar una mayor integración con el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular (77), este péptido comparado con el péptido nativo LL-37, puede tener mayor actividad ante la acción enzimática y mayor estabilidad.

Estos resultados obtenidos con las cepas Gram positivas hacen pensar que, aunque estas bacterias pertenezcan a la misma familia, poseen leves variaciones en sus factores de virulencia y sistemas empleados en la formación de la biopelícula, lo que hace que se comporten de manera diferente cuando son expuestas a los péptidos. Así como se logra evidenciar en las cepas 22 epi 39, 22 epi 45, 22 epi 72 (ANEXO 1: Fig 19B, 21B, 27B) que muestran una tendencia de inhibición de crecimiento desde la hora cero en adelante, con la concentración de 5  $\mu$ M con el péptido D-LL37-1 comparada con la cepa control sin péptido y con las demás concentraciones, otros comportamientos de curvas de crecimiento características fueron las de 22 epi 18, 22 epi 57, 22 epi 58, y 22 epi 83 (ANEXO 1: Fig 20B, 22B, 23B, 30B) con el péptido D-LL37-1 a concentración de 5  $\mu$ M, que evidencian una disminución en el crecimiento celular frente a las demás concentraciones y frente a la cepa control, este comportamiento particular de las cepas podría deberse a el perfil de resistencia y el tipo de muestra del cual se realizó cada aislamiento, que en este caso para estas cepas fueron de aislamientos de hemocutivos, a excepción de la cepa 22 epi 39 que fue aislada de un catéter y que presenta resistencia a oxacilina, Ciprofloxacina, Eritromicina, Trimetoprima-Sulfametoxazol y Clindamicina. En este sentido, es importante tener en cuenta que las curvas de crecimiento son valoradas por D.O., es decir, que se tiene

en cuenta la cantidad de masa celular presente en el medio, reflejada mediante turbidez y por tanto no se conoce la viabilidad celular presente en el medio (células bacterianas vivas o muertas), teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer que establece que la absorbancia en el medio es proporcional a la concentración bacteriana (26, 82).

Ahora bien, lo reflejado anteriormente en estos aislamientos es un claro ejemplo de que la capacidad de formación de biopelícula puede variar dependiendo del microorganismo y del entorno donde esta se desarrolla, lo cual a su vez se relaciona con una mayor o menor resistencia de estos a un grupo amplio de tratamientos convencionales existentes, pero es de resaltar la importancia de la formación de dicha estructura y el nivel de patogenicidad que esta puede otorgar a un patógeno ya que conlleva al aumento de las infecciones nosocomiales y al mismo tiempo pone en evidencia un problema en salud pública frente a la farmacorresistencia (84).

Frente a las bacterias Gram negativas se observó una disminución en la formación de biopelícula, debido a que se pudieron afectar pasos esenciales en el desarrollo de esta ya que como se ha confirmado en el estudio de Overhage et al (2008) LL-37 posee la capacidad de inhibir la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* gracias a tres mecanismos:

- a) Se reduce la adhesión de las células a la superficie
- b) Promueve la contracción, es decir la motilidad mediada por los pilis tipo IV, generando que no se puedan unir célula-célula y no conformen los agregados
- c) Afecta los dos sistemas Quorum Sensing que maneja dicho microorganismo (Sistema Rhl y Sistema Las) (39). Es por esto que se evidencia una alta tasa de inhibición con el péptido LL-37 en nuestro estudio y que quizás al realizar las modificaciones al péptido, estas no lograron producir estos cambios en la formación de la biopelícula y por esto se dio una inhibición menor a la que hizo el péptido LL-37.

De igual manera se ha comprobado que *P. aeruginosa* tiende a secretar elastasa que genera la desactivación del péptido LL-37 a través de la ruptura de los enlaces de los aminoácidos, por ello la importancia de probar péptidos con nuevas estructuras como la modificación a la forma D, que resistan la actividad enzimática, así como se evidencia en el estudio de Duplainter (2013) en el cual demostró *in vivo* que la modificación del péptido LL-37 a su configuración D actuaba de mejor manera ante la infección de *P. aeruginosa* en polillas (10).

Los estudios demuestran que la acción de los péptidos puede verse afectada ante la presencia de soluciones iónicas a altas concentraciones (19,32,69), sin embargo, de acuerdo a Dean et al (2011) la catelicidina humana 'LL-37 puede inhibir la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *F. novicida* y *S. aureus* en medios con altas concentraciones de sal' (19) .

De esta manera se evidencia que el péptido AC-LL37-1 (acetilado y amidado) que se manejó para este estudio, no mostró una gran actividad en la mayoría de las cepas, al igual que en el estudio de Nell (2006) en el cual realizaron modificaciones similares del péptido LL-37, demostrando que estas transformaciones no afectan la actividad *in vitro* del péptido, sino que ayudan a proporcionar cierta estabilidad (67).

Para evaluar y clasificar las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se tuvo en cuenta el método cuantitativo cristal violeta, el cual permite determinar la formación de biopelícula sobre un material inerte ya que como lo confirma Torlak E. y colaboradores en su artículo, el cristal violeta es un colorante básico que se une a moléculas con carga negativa y a los polisacáridos de la matriz extracelular y del citoplasma, es por ello que se usó el medio LB más glucosa al 1 % que permite mejor adaptación al medio y enriquecimiento generando así que la bacteria logre una mayor estimulación e inducir la formación de la biopelícula (31,50,73), exponiendo las cepas a diferentes condiciones de incubación teniendo en cuenta que las cepas expuestas a diversos factores

ambientales generan la expresión de genes que intervienen intracelularmente para generar respuestas según el ambiente al que se encuentra expuestos. Los diferentes péptidos actúan sobre un tipo de bacteria en especial dependiendo del tipo de población, de la resistencia a los diferentes antibióticos, de sus factores de patogenicidad y virulencia de la bacteria como de su estructura de la membrana y pared celular. Teniendo en cuenta estas características se determinó el proceso de adhesión de las bacterias sobre un substrato, en presencia y ausencia de los péptidos a una concentración de 5  $\mu$ M, se observó que a las 6 horas de exposición e incubación no hay mayor efecto de inhibición, pero a las 12 horas el 30% de las cepas presentaron un alto porcentaje de inhibición (Tabla 4 y 5), lo cual posiblemente indica que los péptidos presentan una capacidad para regular la formación de adhesión y por ende la formación de biopelícula (78,80), además es importante recalcar que los péptidos son dosis dependientes. Cabe resaltar que el cristal violeta en este proyecto solo se usó como colorante para evidenciar y revelar la adherencia bacteriana a la microplaca y no como sustancia bacteriostática, como en el caso de medios de cultivo (Agar Mac Conkey) debido a que actúa como inhibidor principalmente sobre las bacterias Gram positivas (85).

Además, el cristal violeta se usó para medir el porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en presencia de los péptidos y de glucosa, ya que como se mencionó anteriormente, este carbohidrato estimula la formación de biopelícula. El ensayo de cristal violeta reveló un porcentaje máximo de inhibición de biopelícula con la concentración de 5  $\mu$ M siendo la inhibición más significativa a las 12 horas en cepas de *E. coli* 24-492, 24-550, 24-539, y 24-531 y *P. aeruginosa* control positivo ATCC 27853 con el péptido LL-37 (ANEXO 5, Tabla 1). Tal como lo indica el autor Pratt LA y col (1998) bacterias como *E.coli* y *P. aeruginosa* dependen para su adhesión a una superficie abiótica y propagación de la biopelícula de los flagelos, pilis y motilidad, es por ello que una hipótesis de las cepas que obtuvieron menor porcentaje de

adhesión mediante cristal violeta, se deba a defectos genéticos, mutaciones que generan que las cepas no presenten la capacidad de formar biopelículas, en especial los pili tipo I para el caso de *E. coli* y como es el caso de mutaciones en pili tipo IV para *P. aeruginosa* (50).

Como se pudo observar en la tasa de inhibición tanto, de los controles como de los diferentes aislamientos, en general la inhibición es muy buena y más eficaz por parte del péptido LL37 en su forma D, como lo da a conocer Aka y col (2015) mediante un ensayo y exposición al péptido que se obtenían % de inhibición de biopelícula revelando que LL37 fue más efectivo en cepas de *E. coli* que en *S. aureus*. Además concluyeron que la inhibición se da por afectación de la adherencia (73), lo que es similar a los datos que se obtuvieron en el presente estudio, de igual manera demuestra que D-LL37-1 representa un aspirante terapéutico potencial por ser un péptido resistente a las proteasas, eficaz para inhibir la formación de biopelículas y aumentar la velocidad de la motilidad de contracción en bacterias Gram negativas (19).

En el presente proyecto de investigación mediante los ensayos realizados para la determinación de la inhibición de biopelícula, se demuestra cómo el péptido LL-37-1 y D-LL37-1 posee gran actividad antibiopelícula reflejada en las tasas de inhibición, a pesar de que a dosis de 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$  se comportan similar en comparación con el control sin tratamiento, ya sea por la presencia de enzimas secretadas por dichos microorganismos o por la falta de actividad de estos péptidos a estas concentraciones bajas.

## 6. CONCLUSIONES

La generación de péptidos análogos permite el mejoramiento estructural de los mismos, buscando encontrar en la secuencia de estos una mayor capacidad antibiopelícula y potencial inhibitorio como se evidenció con el péptido D-LL37-1 versus el péptido nativo LL-37.

Se observaron respuestas variables frente al tratamiento con cada una de las diferentes concentraciones de los péptidos, con lo cual se encontró que los péptidos analizados presentan un comportamiento muy heterogéneo frente a cada aislamiento clínico independientemente de si las cepas pertenecen al mismo género bacteriano como lo fue para las cepas de *Staphylococcus*.

El péptido D-LL37-1 fue el péptido de mayor eficiencia frente al péptido AC-LL37-1 ya que presentó actividad inhibitoria en *S. epidermidis*, *E. coli*, a concentración de 5  $\mu$ M mientras que el péptido en su forma acetilada AC-LL37-1, mostro poca o nula actividad frente a todas las cepas, dándose a evidenciar dicha actividad a través de las curvas de crecimiento.

## 7. RECOMENDACIONES

Los péptidos en estudio pueden utilizarse como moléculas con un principio activo para el tratamiento de diferentes infecciones resistentes al tratamiento convencional debidas a la formación de biopelículas, por lo cual se sugiere que se realicen ensayos *in vivo*.

Aumentar el número de aislamientos clínicos para garantizar el posible uso terapéutico de los péptidos en estudio anteriormente mencionados.

Es importante que en posteriores ensayos que se realicen con estos péptidos se determine el efecto que ejercen estos sobre las bacterias, es decir si están dirigidos contra la pared bacteriana u otras estructuras ya que esto permite dilucidar más sobre el blanco al que se podrían dirigir.

Realizar ensayos complementarios en los cuales se evalué en un modelo *in vivo* que permitan evidenciar los posibles efectos adversos que podrían generar en los humanos.

Se recomienda realizar los ensayos de antibiopelícula con cristal violeta con las demás concentraciones (2.5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$ ) para determinar si hay algún tipo de variación en la actividad, además de tomar para posteriores investigaciones cepas que realicen una formación de biopelícula de manera fuerte para garantizar la efectividad del péptido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. E. Török ND. Staphylococcal and Streptococcal infections. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2005;33(5):97-100. Disponible en: [http://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039\(06\)00189-7/abstract](http://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039(06)00189-7/abstract)
2. Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014;61(1):28-40. Disponible en: [www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx)
3. WHO. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
4. Uzcudun IL. Biofilms Bacterianos. *Actual SEM*. 2011;37:14:44-9.
5. Zambrano M, Suarez L. Biofilms bacterianos : sus implicaciones en salud y enfermedad Biofilms : implications in health and disease. *Univ Odontol* [Internet]. 2006;19-25. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2312/231220955004.pdf>
6. Pletzer D, Coleman SR, Hancock REW. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016;33:35-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
7. Téllez GA CJ. Péptidos antimicrobianos. *Infectio* [Internet]. 2010;14(1):55-67. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>
8. Castañeda Casimiro J, Ortega roque JA, Marcela A, Aquino-andrade A,



- Serafín López J, Estrada-parra S, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, asma e Inmunol* [Internet]. 2009;18:16-29. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf>
9. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2016;68(4):802-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.015>
  10. Duplantier AJ, van Hoek ML. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1-14.
  11. Farinas I, Cowan WM, Jessell TM, Cinty DD, Dudek H, Creenberg ME, et al. Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. 1999;286(December):2361-5. Disponible en: <http://www.molgenrug.nl/php/doc/publications/mg0302.pdf>
  12. Montanaro L, Speziale, Pietro, Davide Campoccia1Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* [Internet]. 2011;6(11):1329-49. Disponible en: <http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb.11.117>
  13. Samuelsen Ø, Haukland HH, Jenssen H, Krämer M, Sandvik K, Ulvatne H, et al. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*. 2005;579(16):3421-6.
  14. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(January):210–214.
  15. Wade D, Boman A, Wåhlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, et al. All-

- D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4761-5.
16. Van Regenmortel MH, Muller S. D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. agosto de 1998 [citado 1 de mayo de 2017];9(4):377-82. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166998800116>
  17. Gómez EC, Tesis. Evaluación de péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos [internet]. Universidad nacional de Colombia; 2012. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9147/1/32295622.2012.pdf%0A>
  18. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758(9):1408-25.
  19. Dean SN, Bishop BM, Van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front Microbiol*. 2011;2(JULY):1-11.
  20. De la Fuente Nuñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathog*. 2014;10(5).
  21. Li G, Xie F, Zhang Y, Bossé JT, Langford PR, Wang C. Role of (p)ppGpp in viability and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* S8. *PLoS One*. 2015;10(10):1-17.
  22. Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nyström T. Regulation of  $\sigma$  factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev*. 2002;16(10):1260-70.
  23. Zhao L, Lu W. Mirror image proteins. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2014;22:56-61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.019>

24. Zhao G, Zhong H, Zhang M, Hong Y. Effects of antimicrobial peptides on *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation in vitro following isolation from implant-associated infections. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):1546-51.
25. Hilal Yazici, Mary B. O'Neill, Turgay Kacar, Brandon R. Wilson EEO, Mehmet Sarikaya and CT. Engineered Chimeric Peptides as Antimicrobial Surface Coating Agents toward Infection-Free Implants. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(8):5070-81.
26. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Rev Biomed*. 2014;25(3):129-43.
27. Orjuela L, Vélez R G V. Bacteriología aplicada. Manual de procedimientos. En: Cundinamarca UCM de, editor. Bacteriología aplicada Manual de procedimientos. Bogotá; 2014.
28. Corrales R, Avila de N ES. Bacteriología: Teoría Y Práctica. Univ Col mayor Cundinamarca. 2013;
29. V S. Temas de Bacteriología y Virología médica. Etiopatogenia microbiológica, Género *Staphylococcus*. Segunda. Montevideo, Uruguay; 2006. 257-271 p.
30. Li M, Cha DJ, Lai Y, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M. The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2007;66(5):1136-47.
31. Torlak E, Korkut E, Uncu AT, Şener Y. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey. *J Infect Public Health*. 2017;10(6):809-13.
32. Kaiser TDL, Pereira EM, dos Santos KRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm

- production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(3):235-9.
33. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(11):677-85.
  34. Naves PLF. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2010. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>
  35. Hufnagel DA, Depas WH, Chapman MR. The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2015;3(3):1-14. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185090>
  36. Beloin C, Roux A, Ghigo J. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2010;322:249-89. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864707/?report=classic>
  37. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2013;70(2):138-50.
  38. Luján Roca DÁ. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2014;48(4):465-74.
  39. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs ECW, Rehm BHA, Hancock REW. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm

- formation. *Infect Immun*. 2008;76(9):4176-82.
40. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207-28.
  41. Alejandra Roa M, Ira V, Rosa Giraldo M, Muñoz M, Yance Profesionales D, Congénitos D, et al. Boletín Epidemiológico Medellín Saludable. Disponible en: [https://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/pccdesign/SubportalDelCiudadano\\_2/PlandeDesarrollo\\_0\\_19/Publicaciones/SharedContent/Periodo Epidemiológico/Periodo Epidemiológico 12 - Semana 52. Recopilación 2015.pdf](https://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/pccdesign/SubportalDelCiudadano_2/PlandeDesarrollo_0_19/Publicaciones/SharedContent/PeriodoEpidemiologico/PeriodoEpidemiologico12-Semana52.Recopilacion2015.pdf)
  42. Red Nacional de la Vigilancia de la resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la salud, (Colombia). Estado Del Arte De La Resistencia Bacteriana Y La Vigilancia Epidemiológica De Las Infecciones Asociadas Al Cuidado De La Salud En Colombia. 2010;1-31.
  43. Teresa Herrera Mendoza Bac Esp M, Revisión A DE. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*. 2004;2(2):71-80.
  44. Leal AL, Álvarez CA. Boletín. 2017;(2027).
  45. Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, Kolter R, Aizenberg J, Losick R. Inhibitory effects of D-amino acids on staphylococcus aureus biofilm development. *J Bacteriol*. 2011;193(20):5616-22.
  46. Nazar J. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. 2009;67:61-72.
  47. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Properties , regulation and roles in human disease *Staphylococcus aureus* biofilms. 2011;(October):445-59.

48. Contreras JJ, Sepúlveda M. Bases moleculares de la infección asociada a implantes ortopédicos. Rev Chil infectología órgano Of la Soc Chil Infectología [Internet]. 2014;31(3):309-22. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182014000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
49. Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2008;26(1):48-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1157/13114395>
50. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol. 1998;30(2):285-93.
51. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by pseudomonas aeruginosa: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int. 2015;2015.
52. Joo H-S, Otto M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2015;[Epub ahea(11):3055-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701233>
53. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. 2016;1858(5):1044-60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.013>
54. Ortega-peña S, Franco-cendejas R. Importancia médica del biofilm de Staphylococcus epidermidis en las infecciones de prótesis articular. 2014;

55. Cucarella C, Solano C, Valle J. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J ... [Internet]. 2001;183(9):2888-96. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/183/9/2888.short>
56. Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. GMS Hyg Infect Control [Internet]. 2014;9(3):Doc23. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4184040&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. Infect Immun. 2011;79(6):2267-76.
58. Kocianova S, Vuong C, Yao Y. Key role of polygamma- DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Invest. 2005;115(3):688–694.
59. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol. 2011;77(15):5238-46.
60. Paharik AE, Horswill AR, Roy J, City I. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. Microbiol Spectr [Internet]. 2016;4(2):1-48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4887152/>
61. Díaz Caballero a. J, Vivas Reyes R, Puerta L, Ahumado Monterrosa M, Arévalo Tovar L, Cbrales Salgado R, et al. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. Av en Periodoncia e Implantol Oral. 2011;23:195-201.

62. Loera A, Ramírez F, Avelar F, Guerrero A. Multi-species biofilms : association to survive. *Investig Cienc* [Internet]. 2012;20(54):49-56. Disponible en: [http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista54/Articulo 7.pdf](http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista54/Articulo%207.pdf)
63. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ Microbiol*. 2010;12(6):1621-9.
64. Ramos AP, Desgarennes CP. Artículo de revisión Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. 2007;57-67.
65. Villarruel R, Huizar R, Corrales M, Sánchez T, Islas A. Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Investig en Salud* [Internet]. 2004;VI(3):170-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/142/14260306/%0Ahttp://www.redalyc.org/resumen.oa?id=14260306>
66. McDermott A. Péptidos Catiónicos Antimicrobianos . ¿ Una Futura Opción Terapéutica ? Cationic Antimicrobial Peptides — a Future Therapeutic Option ? *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2007;(82):469-70.
67. Nell MJ, Tjabringa GS, Wafelman AR, Verrijck R, Hiemstra PS, Drijfhout JW, et al. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides*. 2006;27(4):649-60.
68. Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R, Krupa P. Unique features of human cathelicidin LL-37. *BioFactors*. 2015;41(5):289-300.
69. Xu W, Zhu X, Tan T, Li W, Shan A. Design of embedded-hybrid antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity and anti-biofilm activity. *PLoS One*. 2014;9(6):1-13.



70. Madar D, Dekel E, Bren A, Zimmer A, Porat Z, Alon U. Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol*. 2013;7.
71. Microbiano C. Reproducción y crecimiento Microbiano. 2009;1-23. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema\\_6\\_crecimiento.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf)
72. Greulich P, Dolezal J, Scott M, Evans MR, Allen RJ. Predicting the dynamics of bacterial growth inhibition by ribosome-targeting antibiotics. 2017; Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1701.03702>
73. Aka ST. Killing efficacy and anti-biofilm activity of synthetic human cationic antimicrobial peptide cathelicidin hCAP-18/LL37 against urinary tract pathogens. *J Microbiol Infect Dis [Internet]*. 2015;5(1):15-20. Disponible en: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.5799/ahinjs.02.2015.01.0168>
74. Noore J, Noore A, Li B. Cationic antimicrobial peptide II-37 is effective against both extraand intracellular *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1283-90.
75. Ramírez Santos J, Contreras Ferrat G, Gómez Eichelmann MC. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev Latinoam Microbiol*. 2005;47(3-4):92-101.
76. Arredondo B; VD. Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación la biomasa microalgal*. 2007;(January 2007):17-27.
77. Mergaert P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Nat Prod Rep [Internet]*. 2018;35:336-56. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7NP00056A>
78. Heins A-L, Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial

- bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2018;0(0):0.
79. Wang L, Keatch R, Zhao Q, Wright JA, Bryant CE, Redmann AL, et al. Influence of type-I fimbriae and fluid shear stress on bacterial behavior and multicellular architecture of early *Escherichia coli* biofilms at single-cell resolution. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018;(January):AEM.02343-17. Disponible en: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02343-17>
  80. Cádiz jac. Modelo continuo de flujos metabólicos y regulación génica: aplicaciones [internet]. Vol. 1, universidad de chile facultad de ciencias físicas y matemáticas departamento de ingeniería química y biotecnología m. 2014. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129867/cf-canales\\_jc.pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129867/cf-canales_jc.pdf?sequence=1)
  81. Yu G, Baeder D, Regoes R, Rolff J. Predicting Drug Resistance Evolution: Antimicrobial Peptides Vs. Antibiotics. *bioRxiv.* 2017;138107.
  82. Dean SN, Bishop BM, Hoek ML Van. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2011;11(1):114. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/114>
  83. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus* -Derived Proteinases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4673-9.
  84. Vanegas M, Correa N, Morales A, Martínez A, Rúgeles L, Jiménez F. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una

planata de alimentos. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 2009;14(2):1677-83. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-142/v14n2a2.pdf>

85. Dickinson B. MacConkey Agar. Bd [Internet]. 2014;(July):3. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>

## ANEXOS

ANEXO 1. Curvas de crecimiento de bacterias Gram positivas *S. aureus* y *S. epidermidis* con péptido AC-LL-37-1 y D-LL-37-1

De los 15 aislamientos de *S. aureus* y de la cepa control positiva *S. aureus* ATCC USA 300, las curvas de crecimiento con los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1, a diferentes concentraciones se muestran en las Figuras 1-16:

ANEXO 1

Figura 1A. *S. aureus* USA 300 control positivo tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

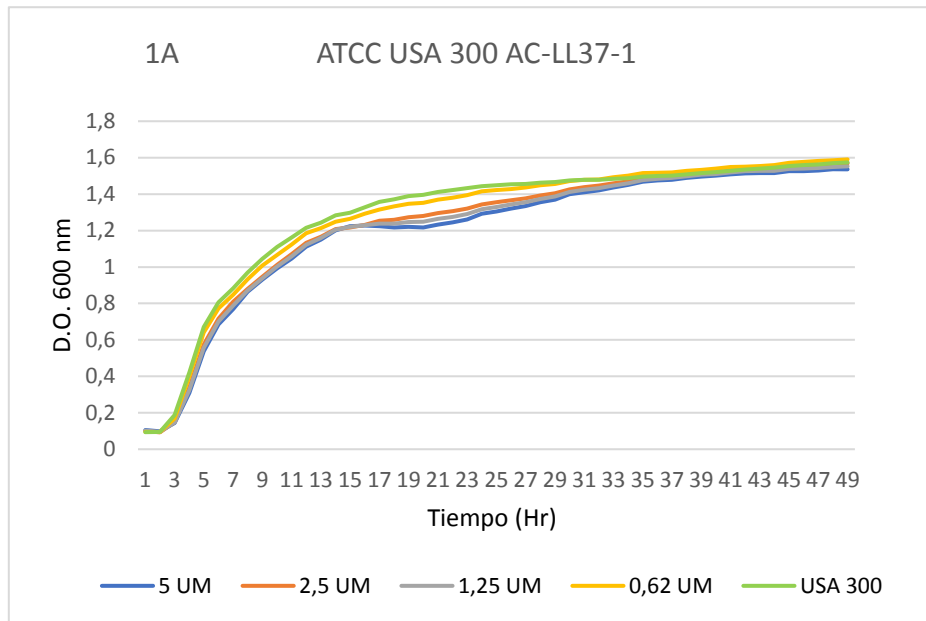


Figura 1B. *S. aureus* USA 300 control positivo tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

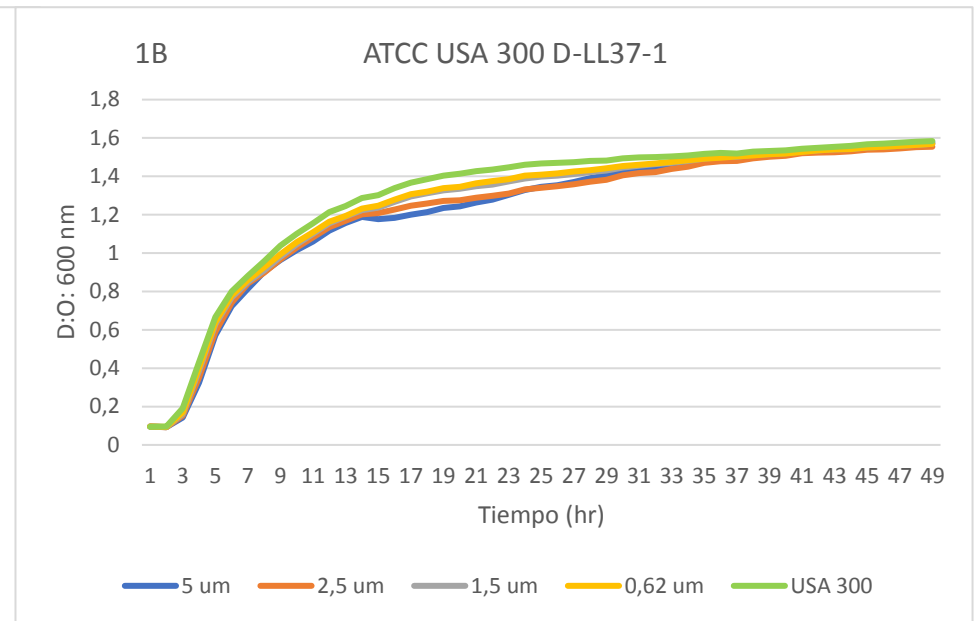


Figura 2A. Cepa Col 23 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

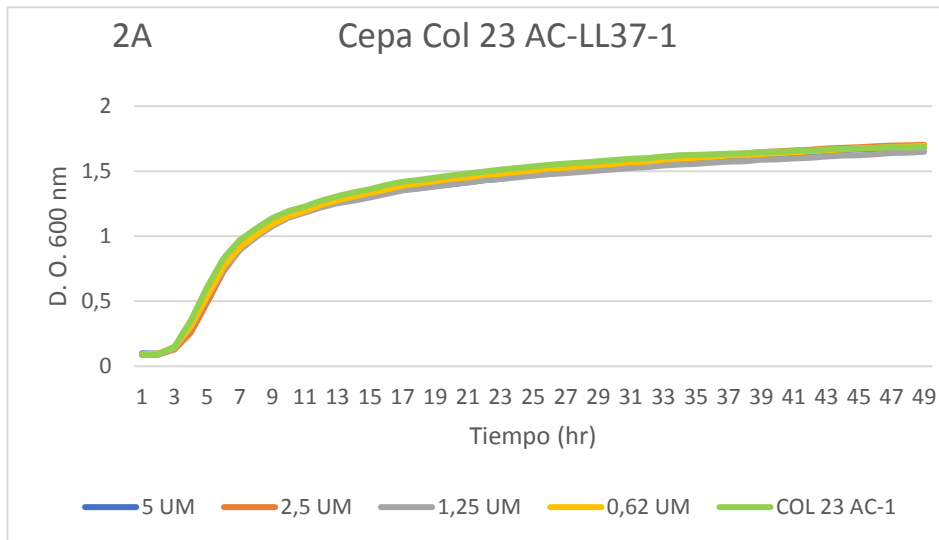


Figura 2B. Cepa Col 23 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

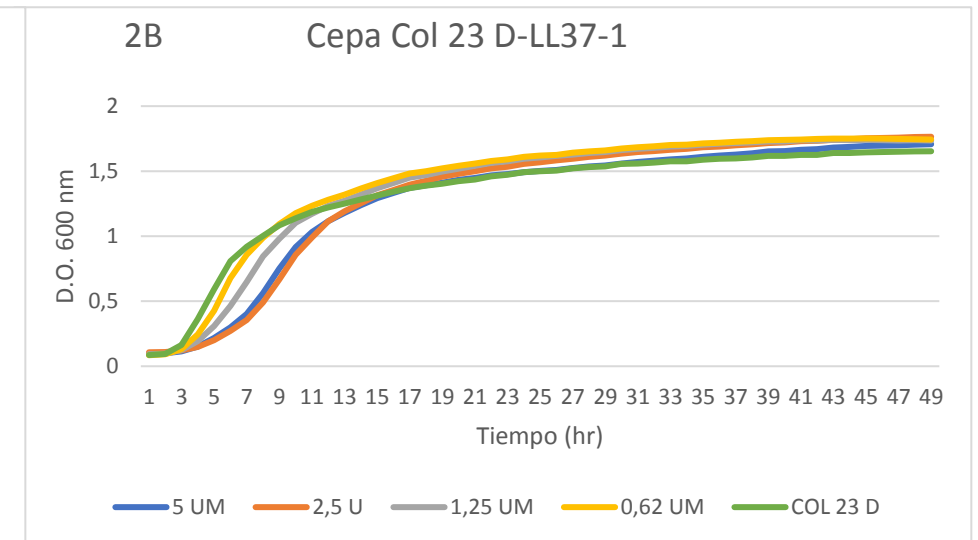


Figura 3A. Cepa Col 42 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 3B. Cepa Col 42 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

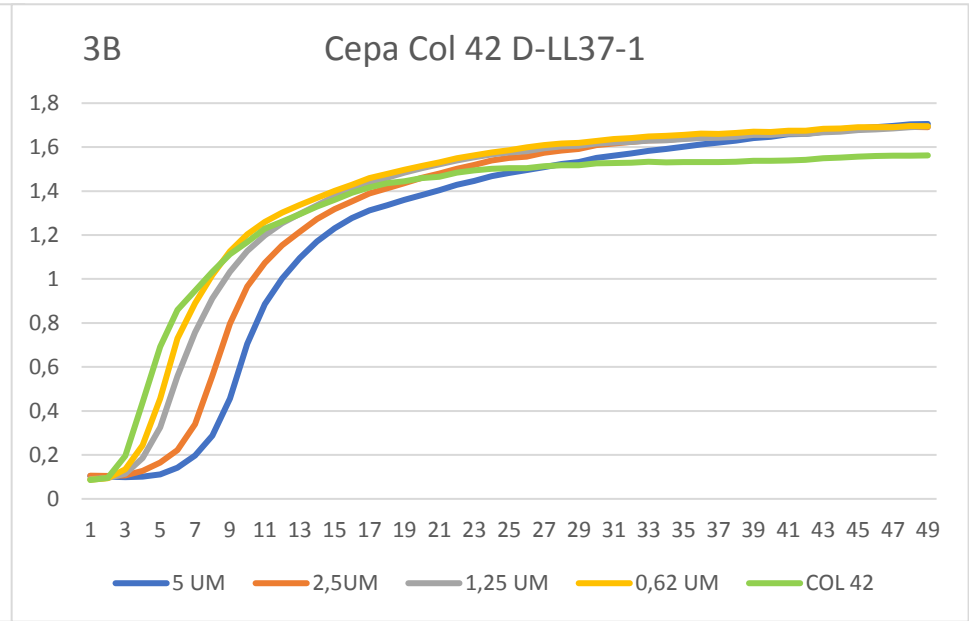
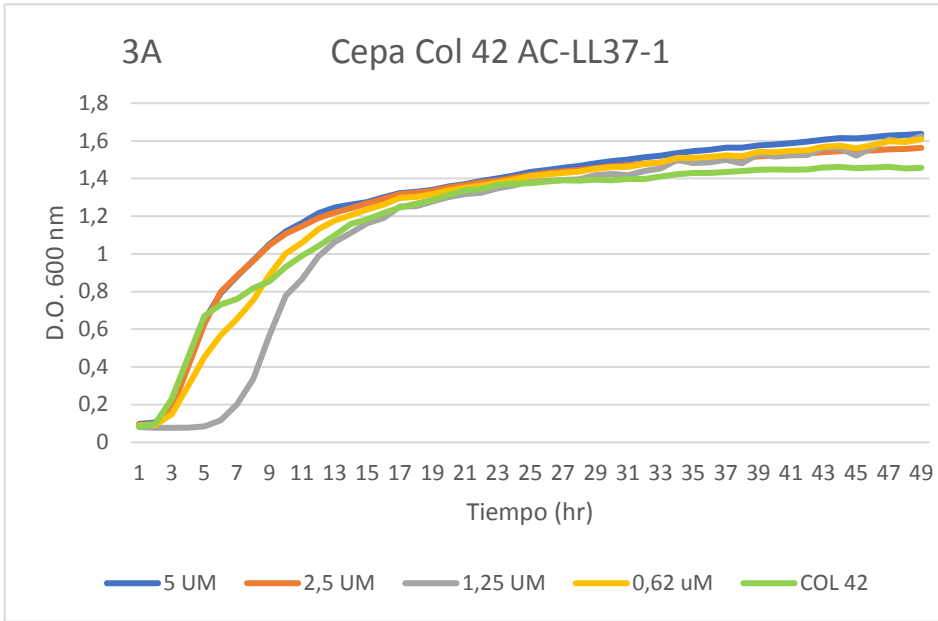


Figura 4A. Cepa Col 77 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 4B. Cepa Col 77 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

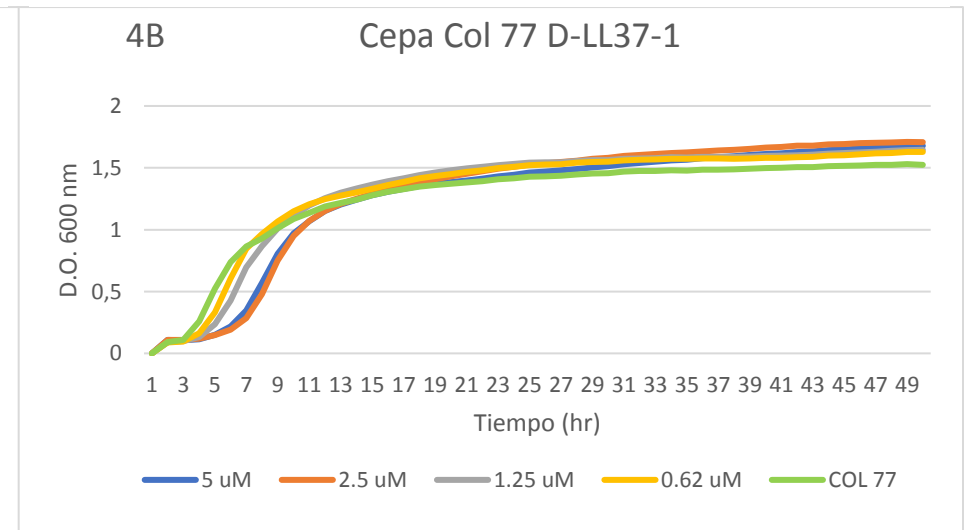
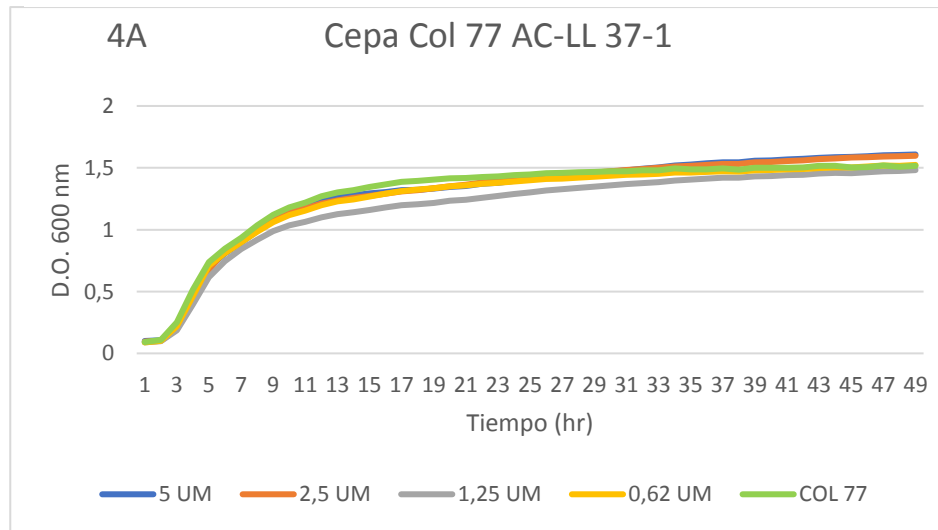


Figura 5A. Cepa Col 111 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

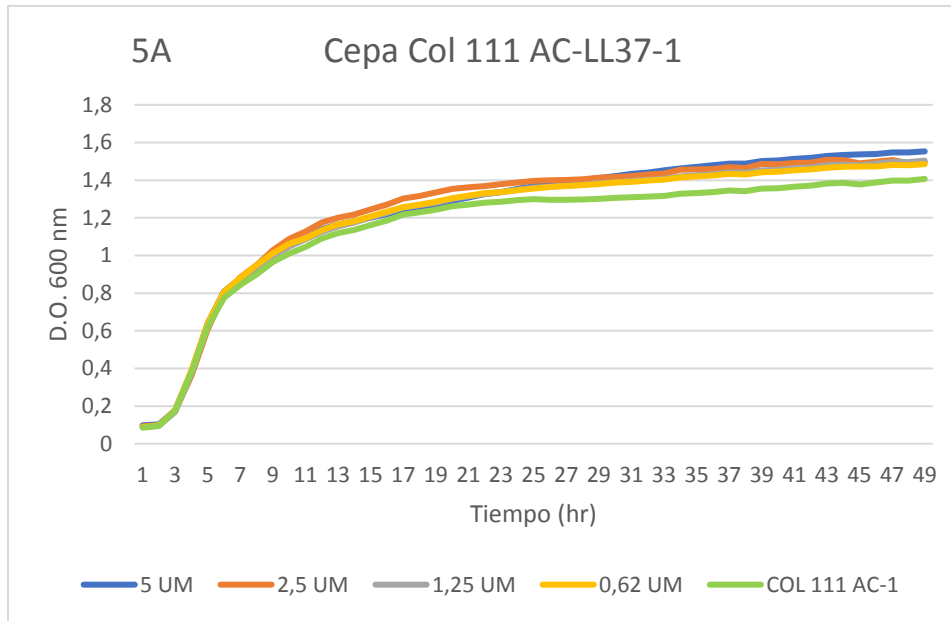


Figura 5B. Cepa Col 111 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

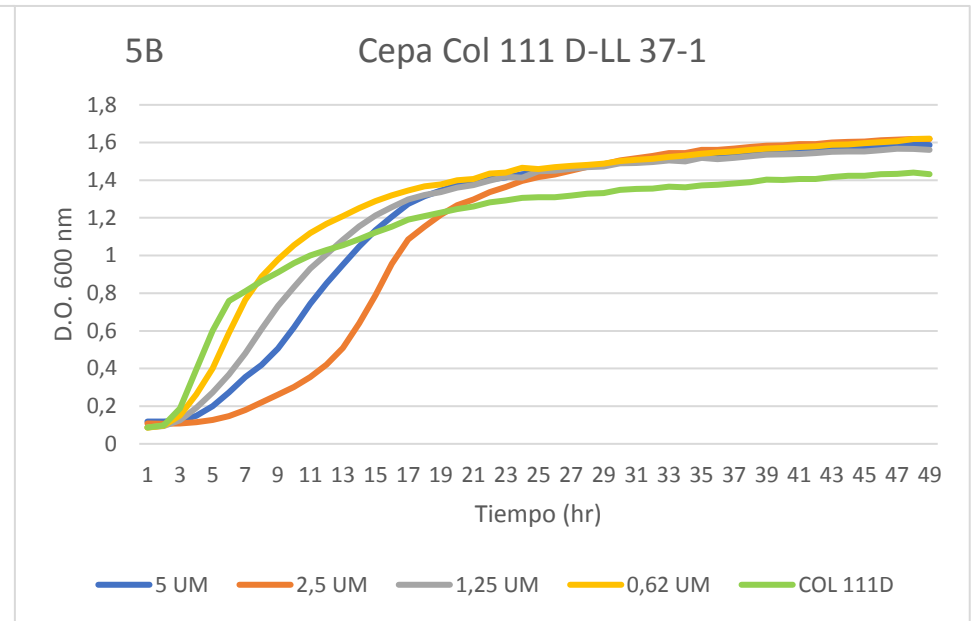


Figura 6A. Cepa Col 86 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

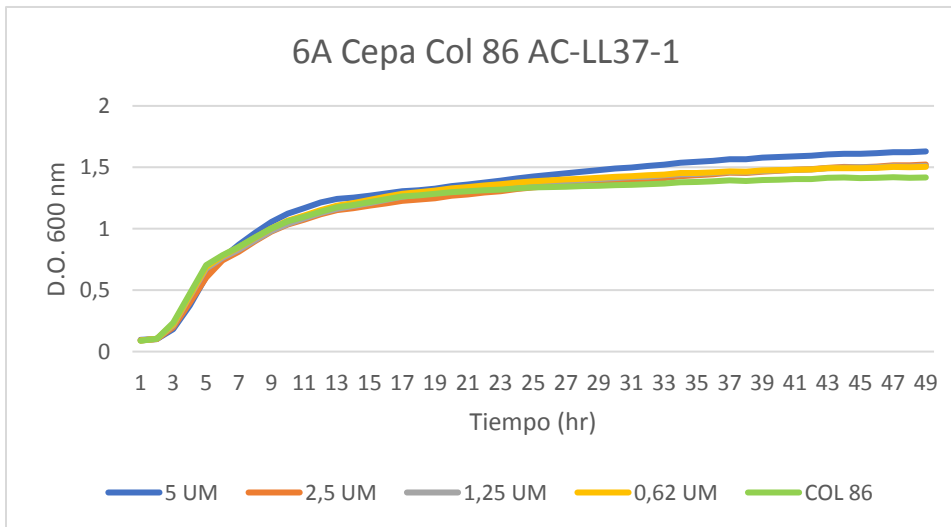


Figura 6B. Cepa Col 86 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

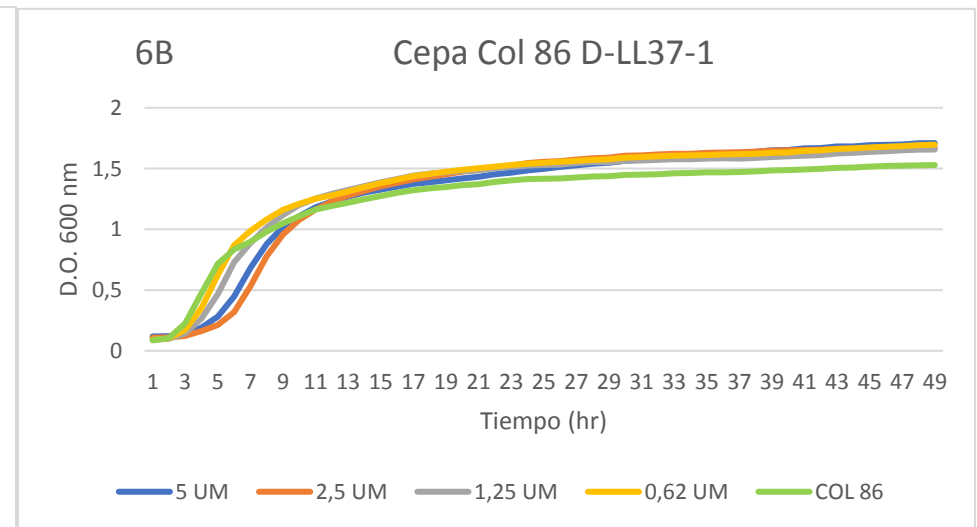


Figura 7A. Cepa Col 190 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

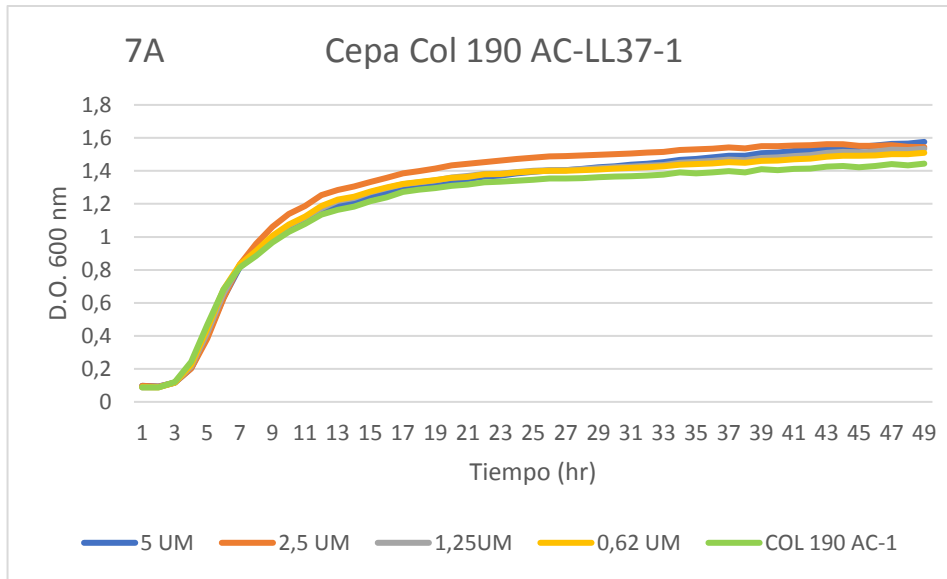


Figura 7B. Cepa Col 190 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

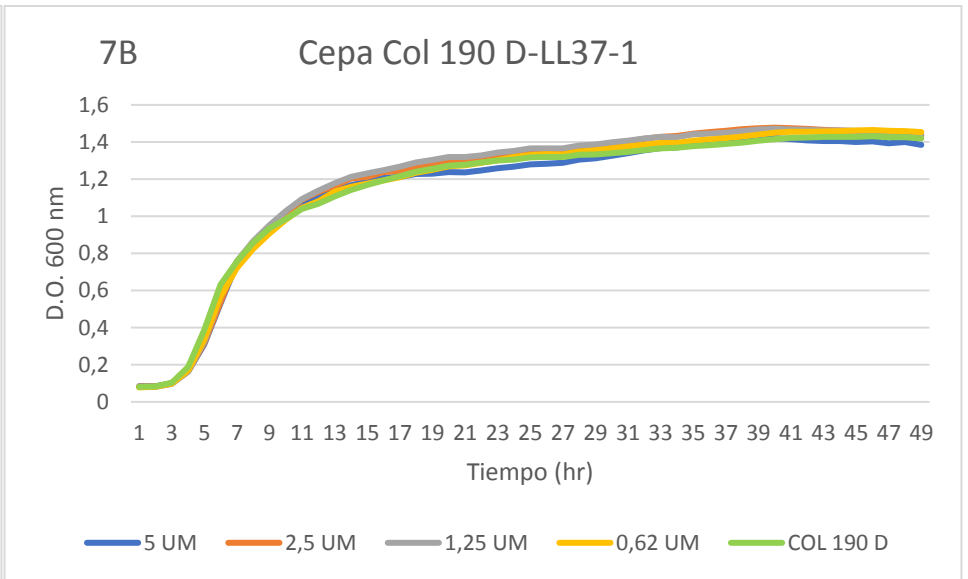


Figura 8A. Cepa Col 81 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

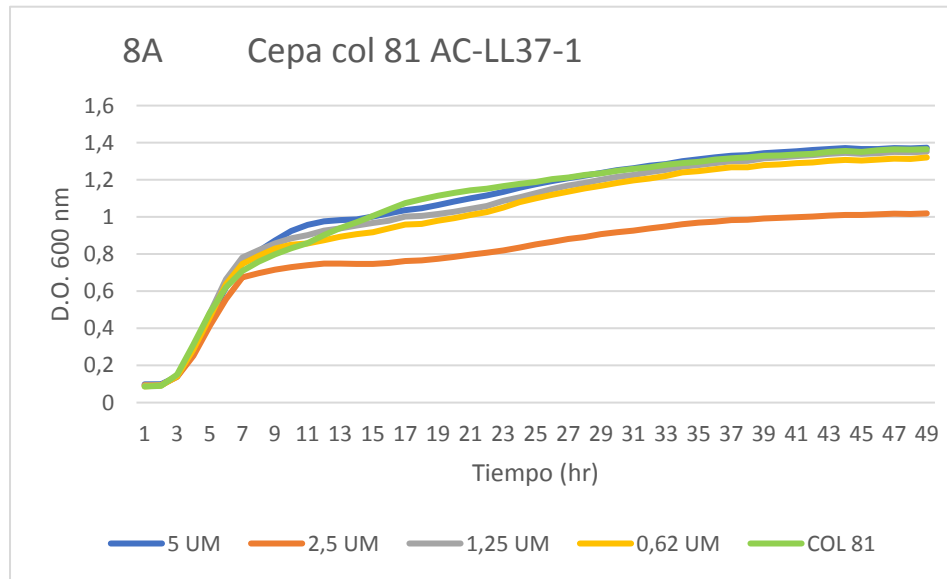


Figura 8B. Cepa Col 81 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

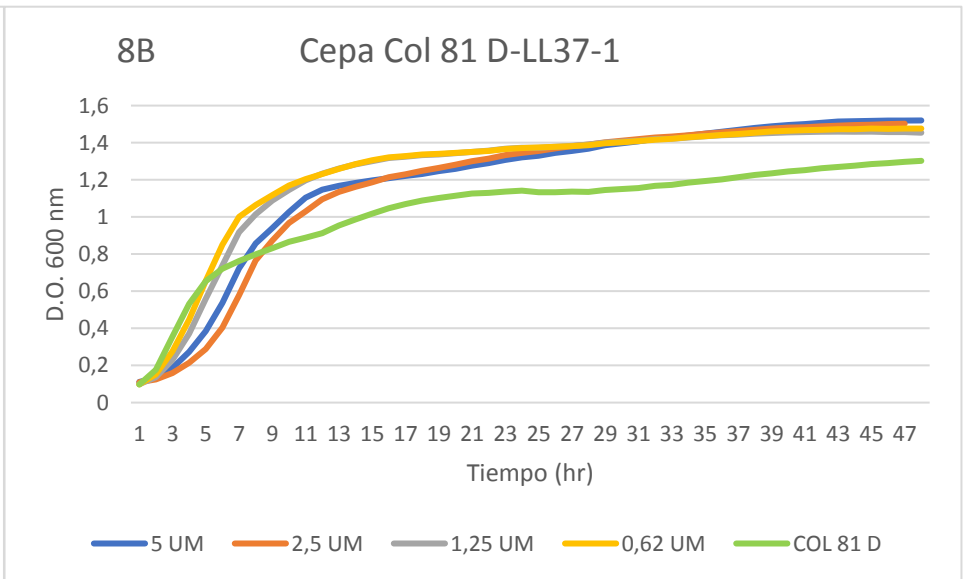




Figura 9A. Cepa Col 207 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

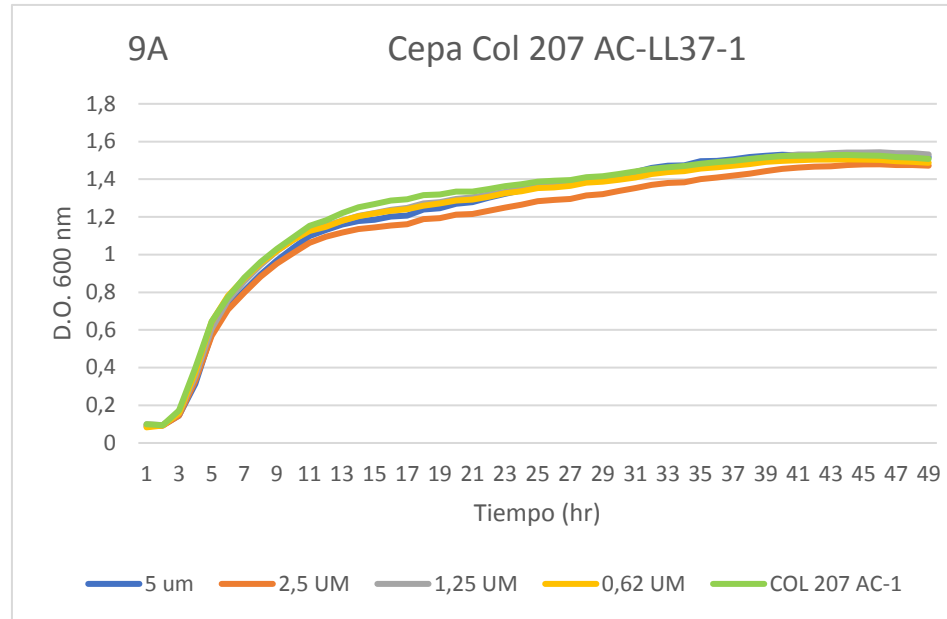


Figura 9B. Cepa Col 207 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

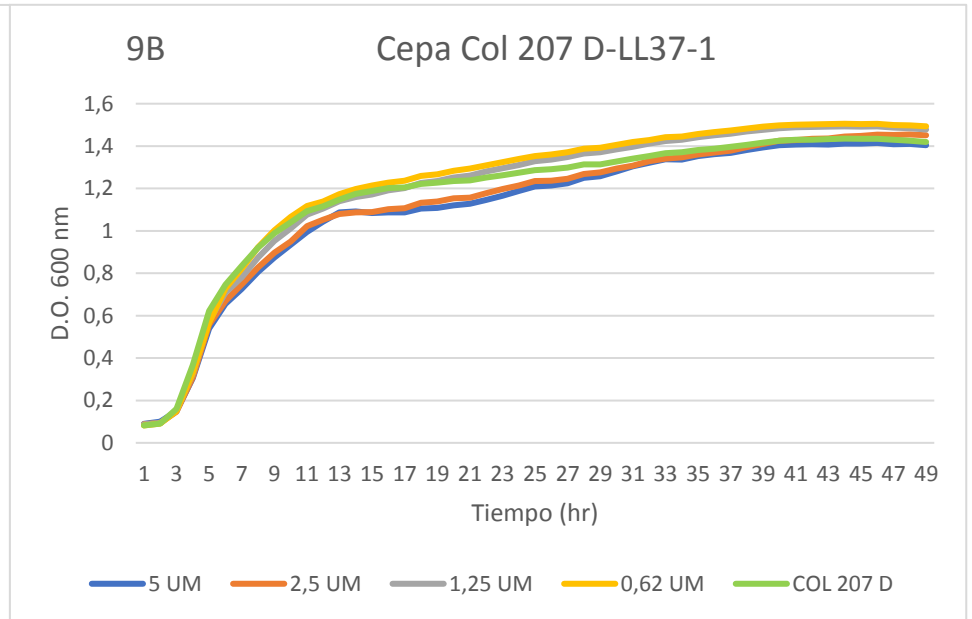


Figura 10A. Cepa Col 145 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

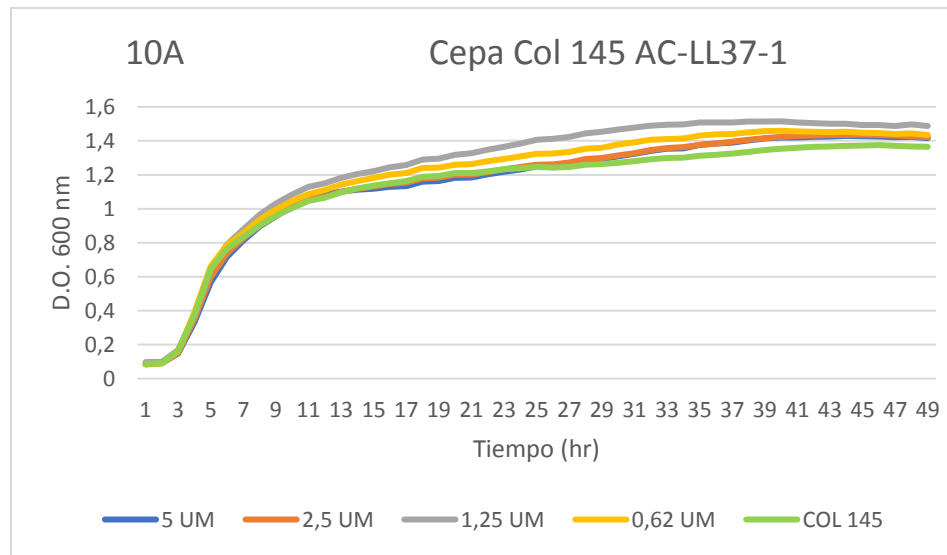


Figura 10B. Cepa Col 145 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

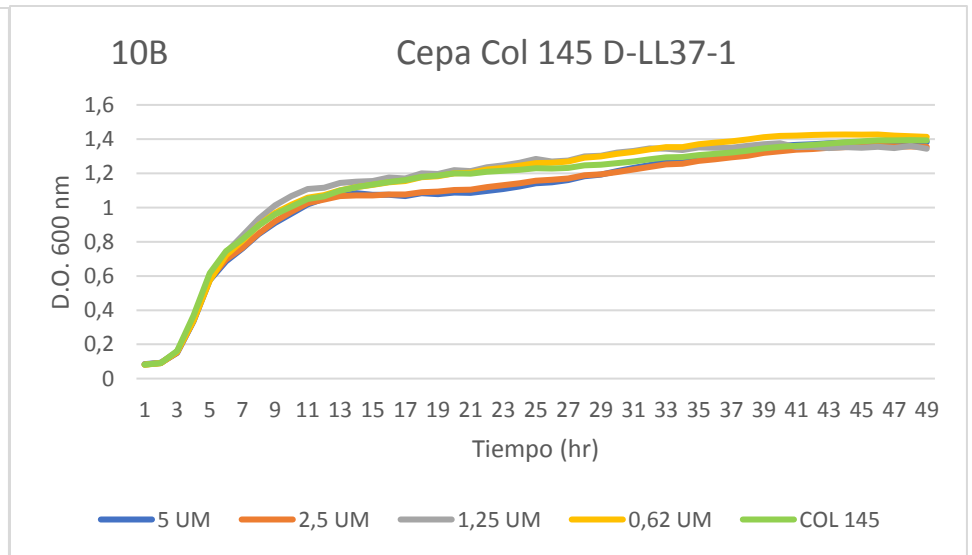


Figura 11A. Cepa Col 208 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 11B. Cepa Col 208 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

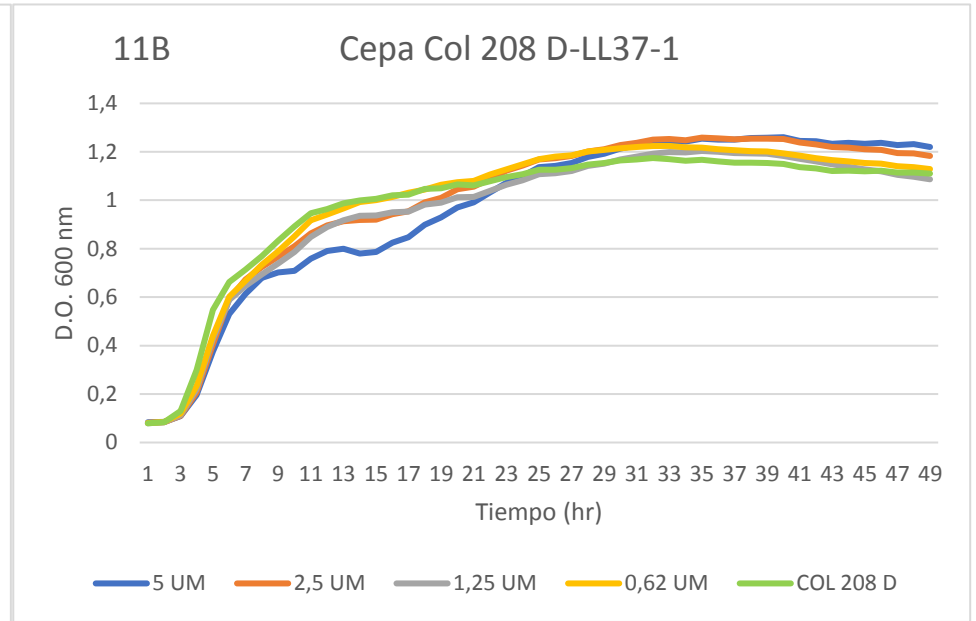
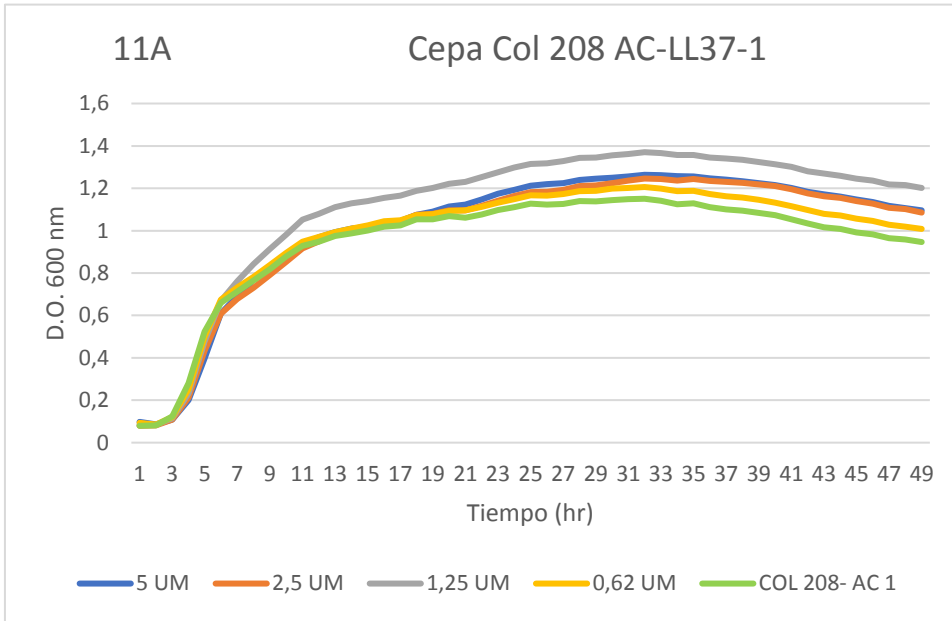


Figura 12A. Cepa Col 227 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 12B. Cepa Col 227 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

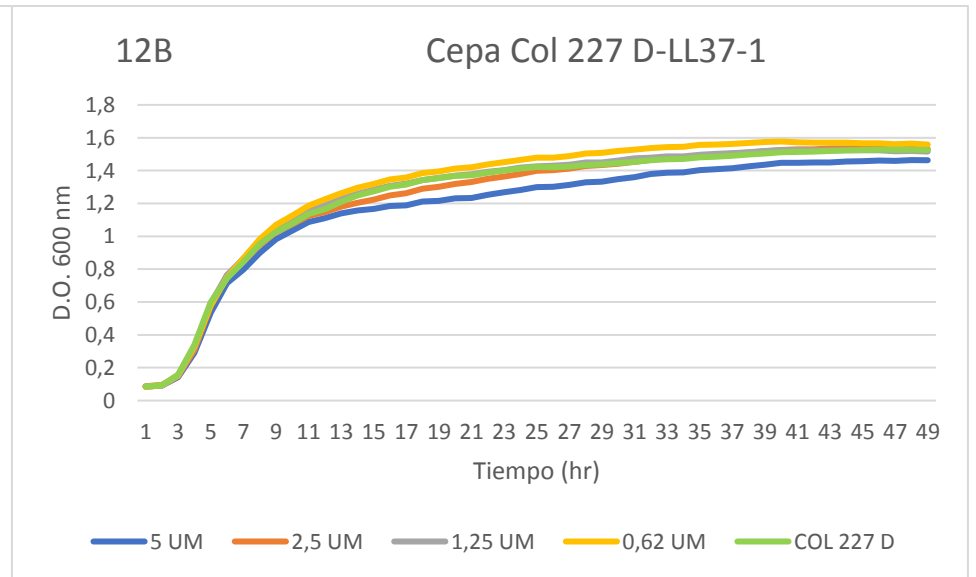
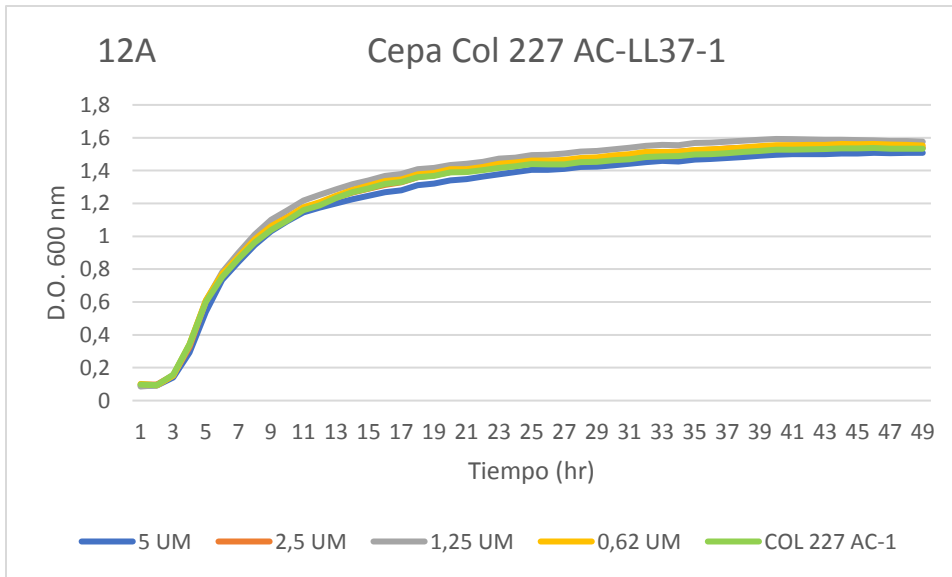


Figura 13A. Cepa Col 252 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

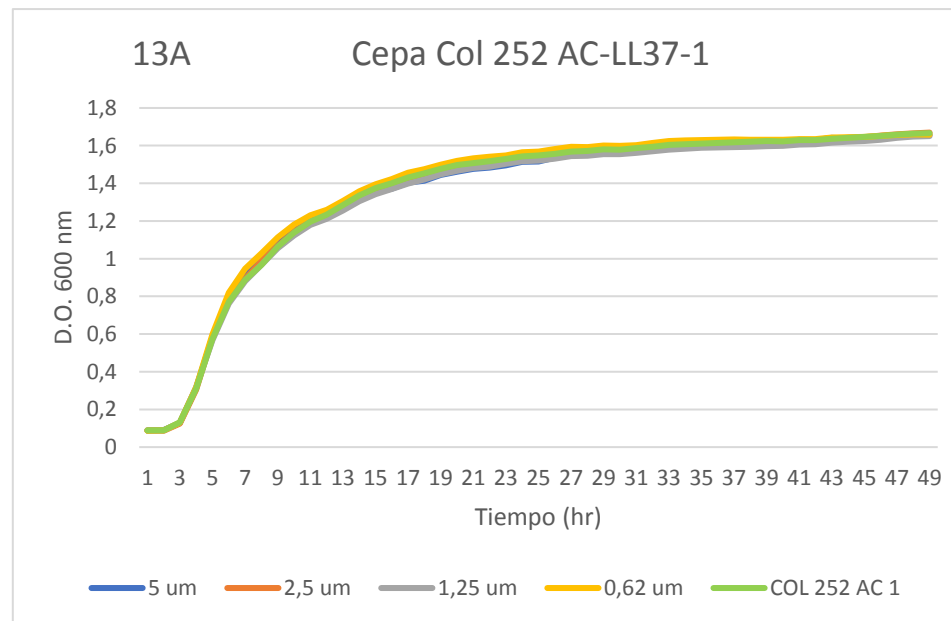


Figura 13B. Cepa Col 252 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

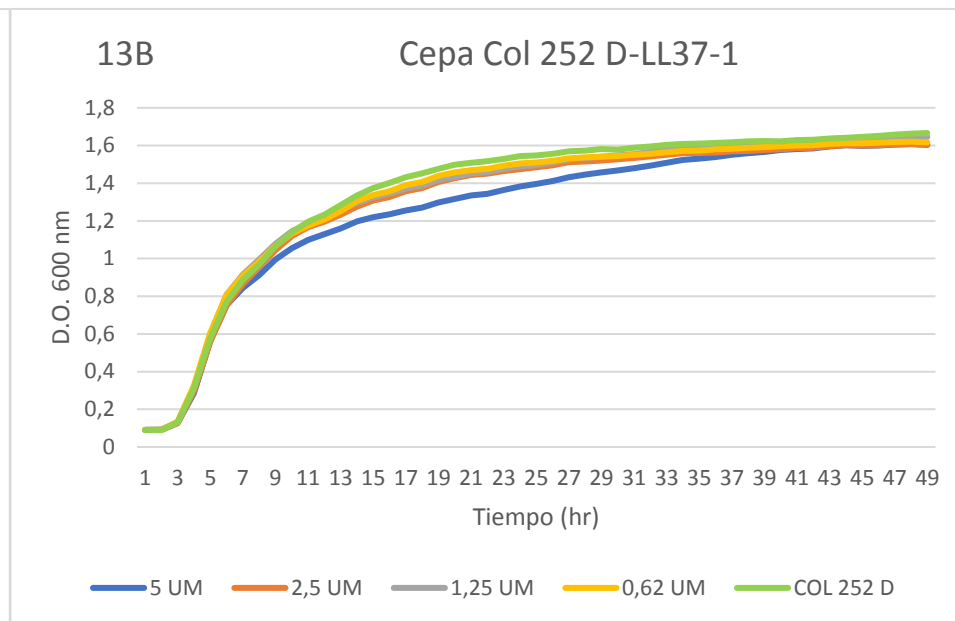


Figura 14A. Cepa Col 318 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

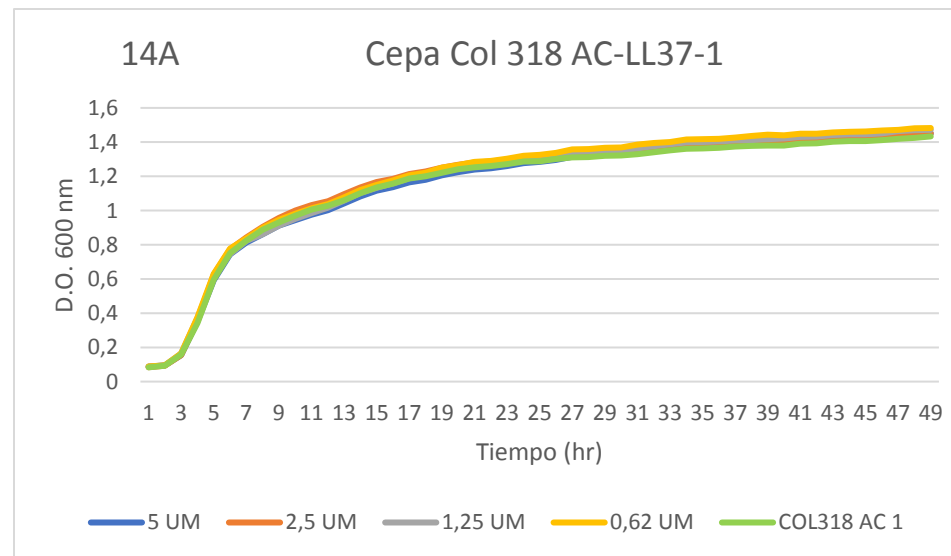


Figura 14B. Cepa Col 318 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

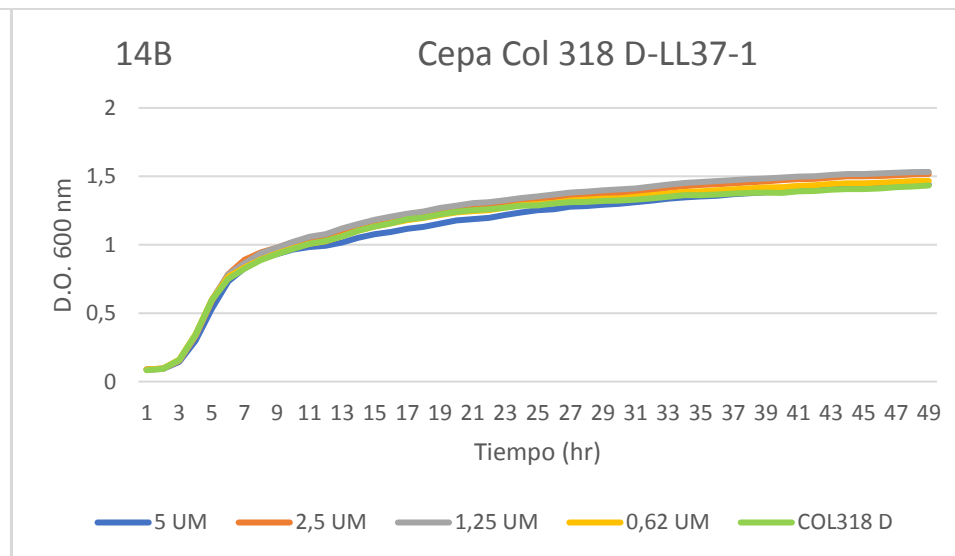


Figura 15A. Cepa Col 478 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

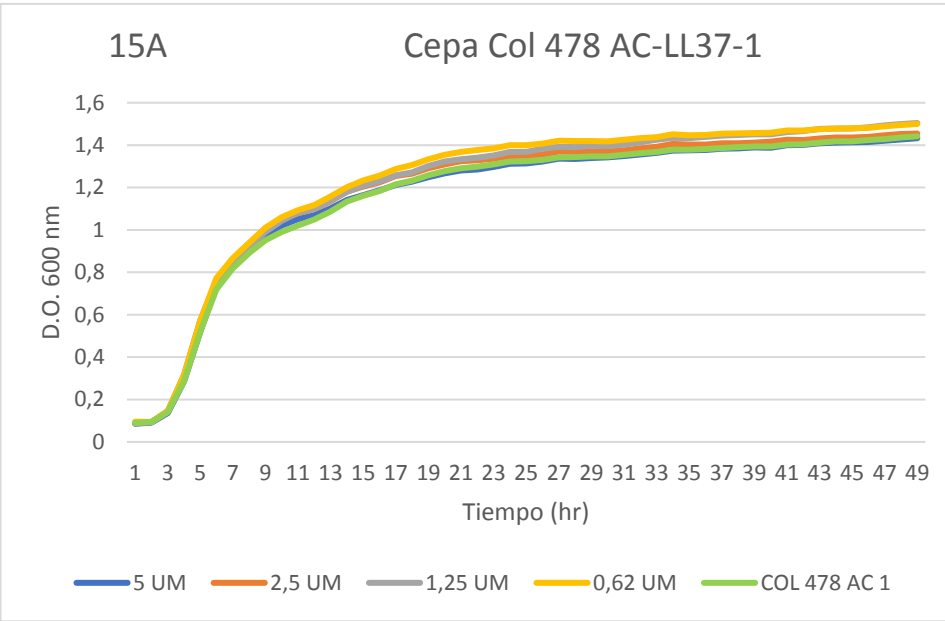


Figura 15B. Cepa Col 478 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

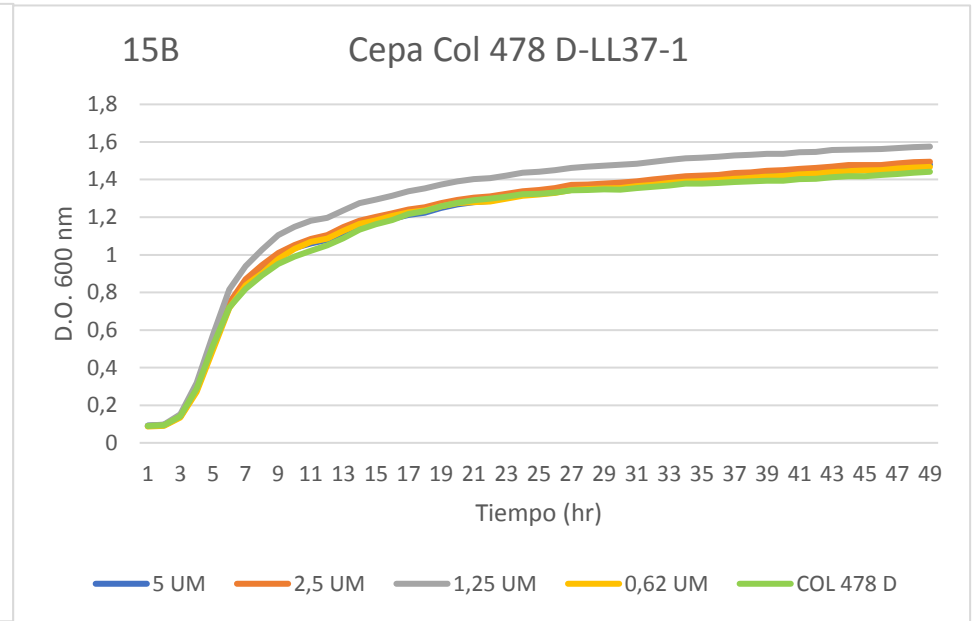


Figura 16A. Cepa 5 sau 205 *S. aureus* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

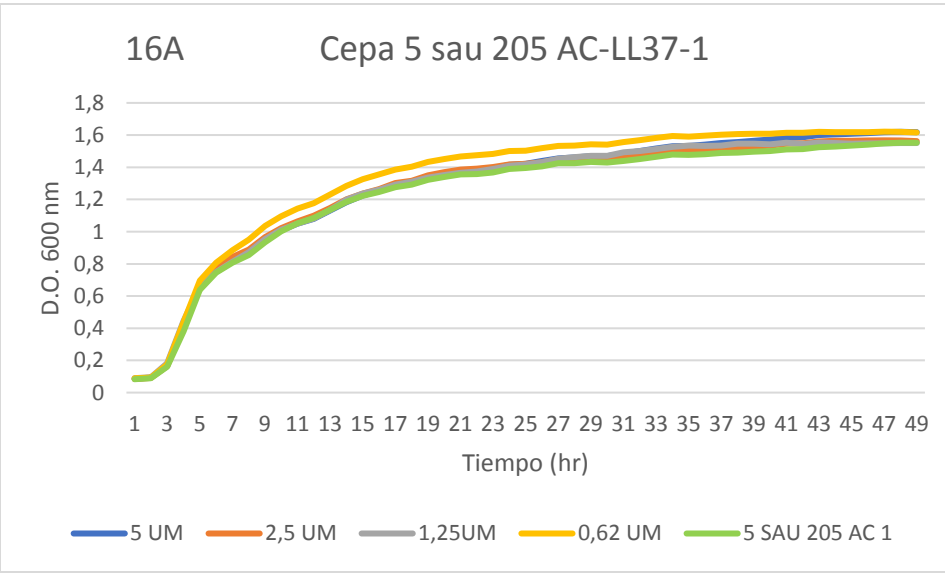
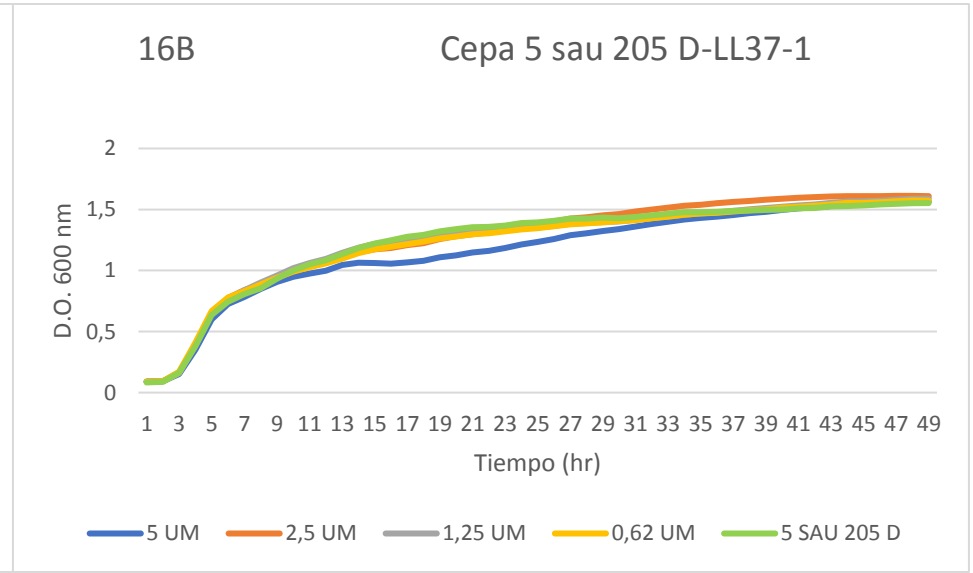


Figura 16B. Cepa 5 sau 205 *S. aureus* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$



Se analizaron 15 aislamientos de *S. epidermidis* a los cuales se les realizaron por triplicado curvas de crecimiento con y sin presencia de los péptidos denominados AC-LL37-1 y D-LL37-1, a diferentes concentraciones 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  y 0.62  $\mu\text{M}$ , teniendo en cuenta el control negativo ATCC 12228 *S. epidermidis* y control positivo ATCC 35984 *S. epidermidis*. De los cuales se obtuvieron las gráficas que se detallan en la figura 17- 33:

Figura 17A. Cepa ATCC 12228 Control negativo *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 17B. Cepa ATCC 12228 Control negativo *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

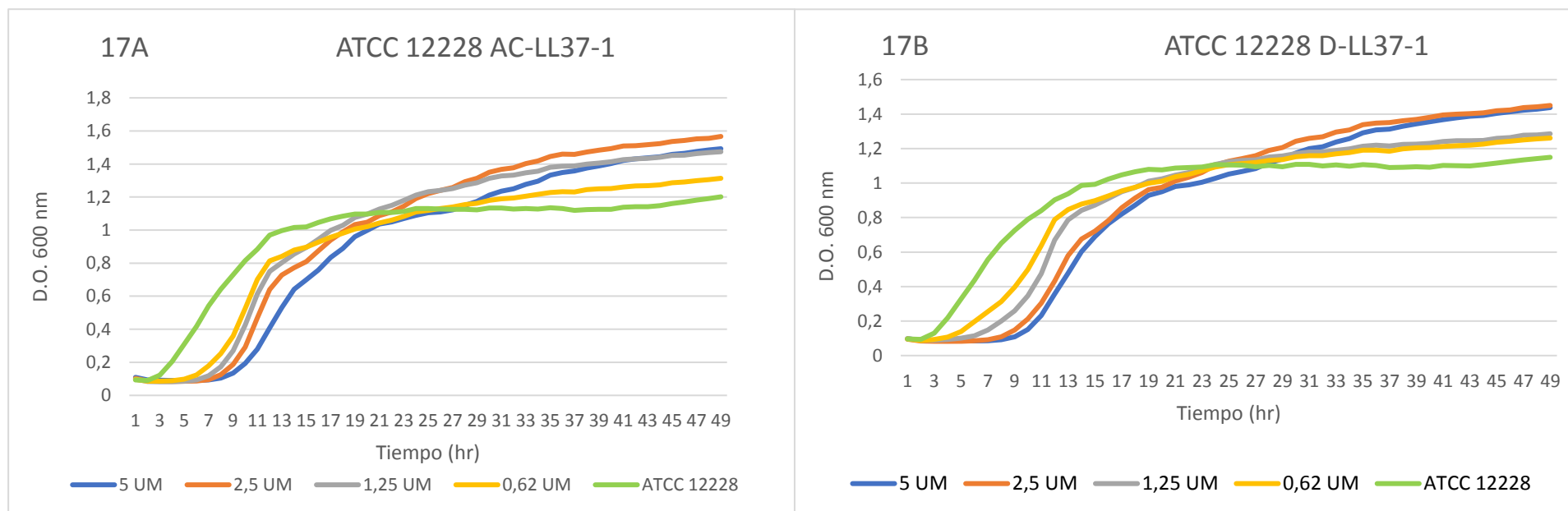


Figura 18A. Cepa ATCC 35984 Control positivo *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

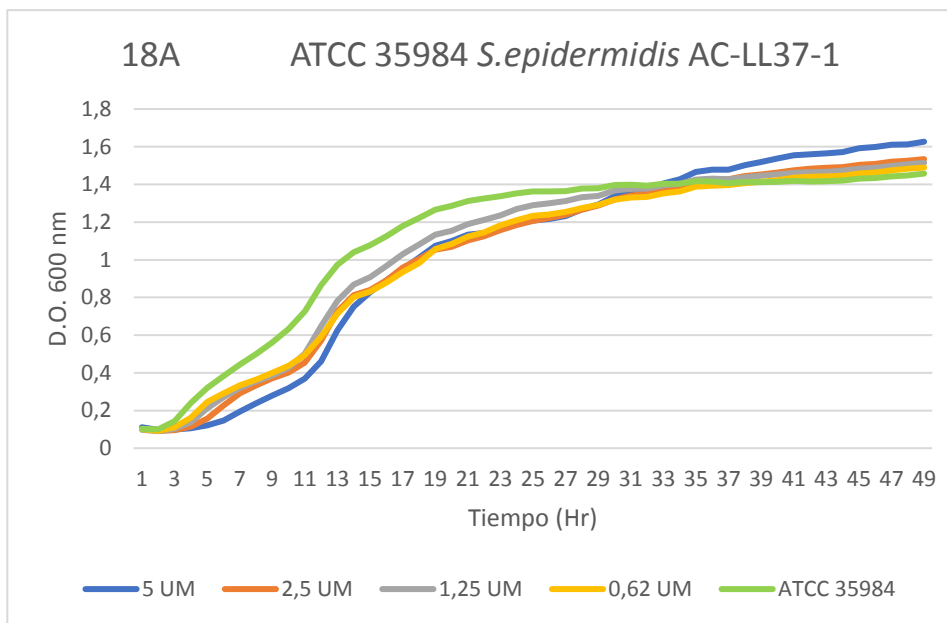


Figura 18B. Cepa ATCC 35984 Control positivo *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

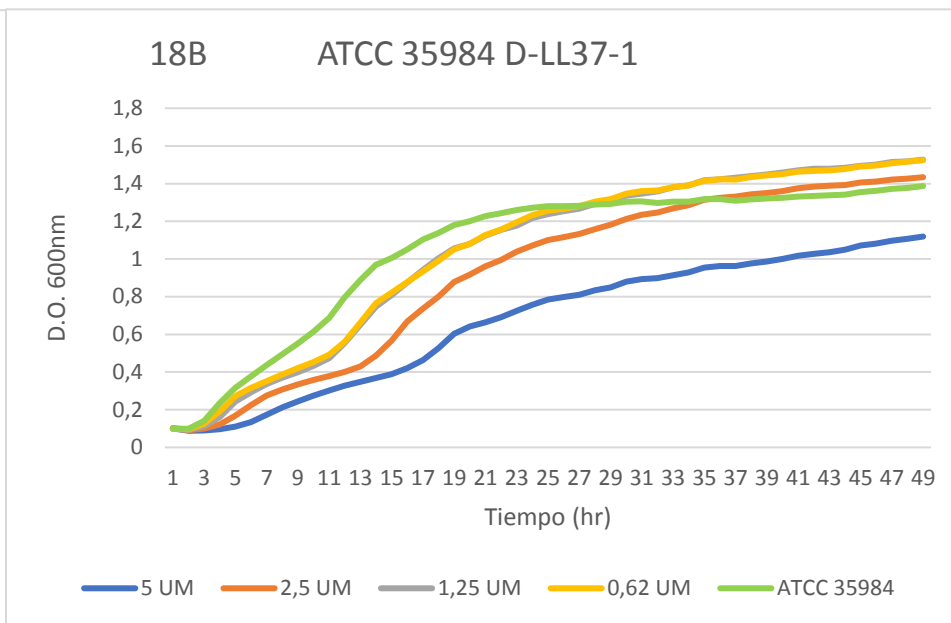


Figura 19A. Cepa 22 epi 39 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

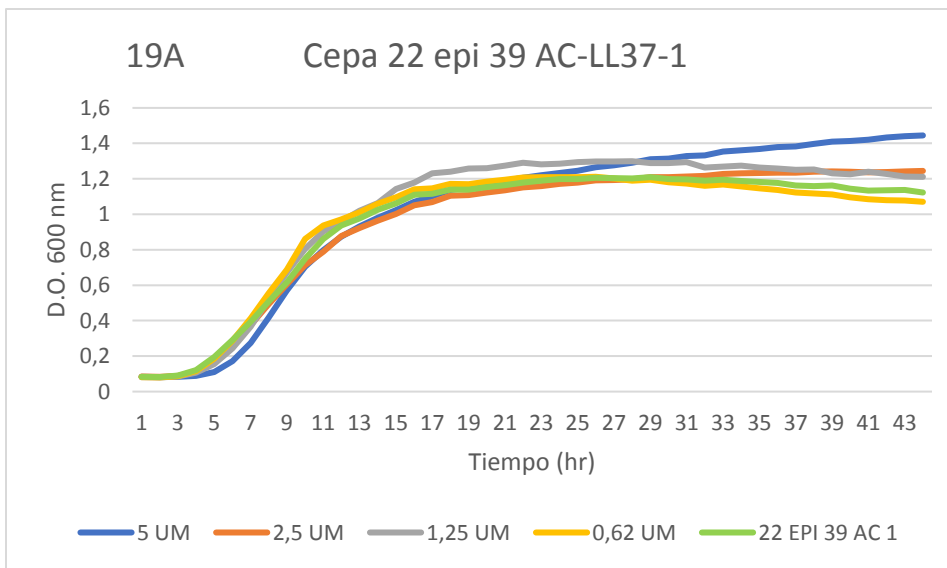


Figura 19B. Cepa 22 epi 39 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

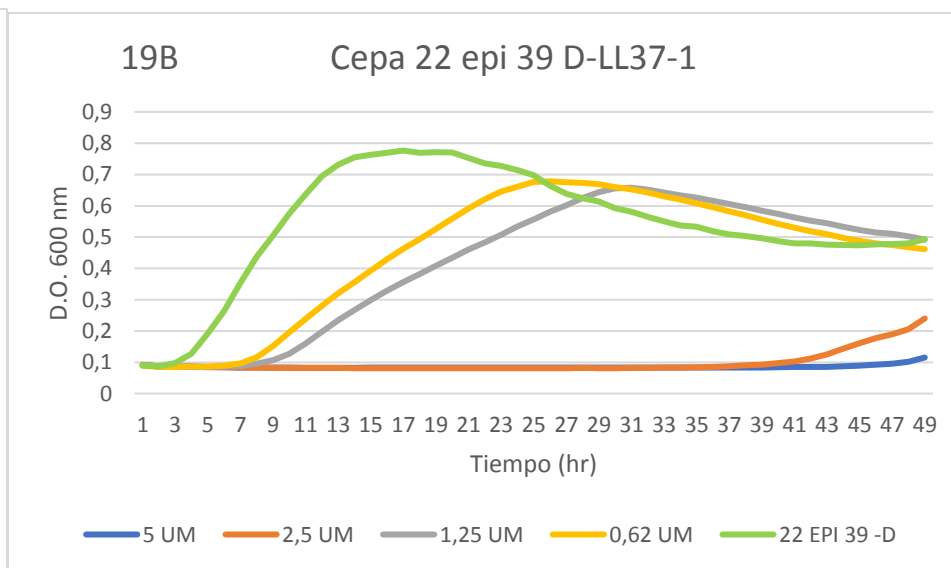


Figura 20A. Cepa 22 epi 18 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

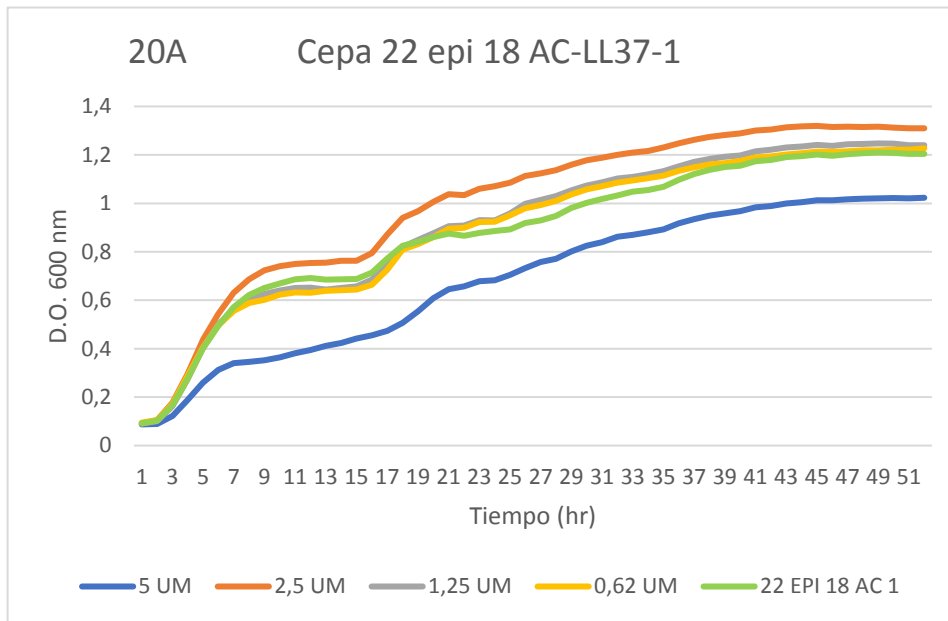


Figura 20B. Cepa 22 epi 18 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

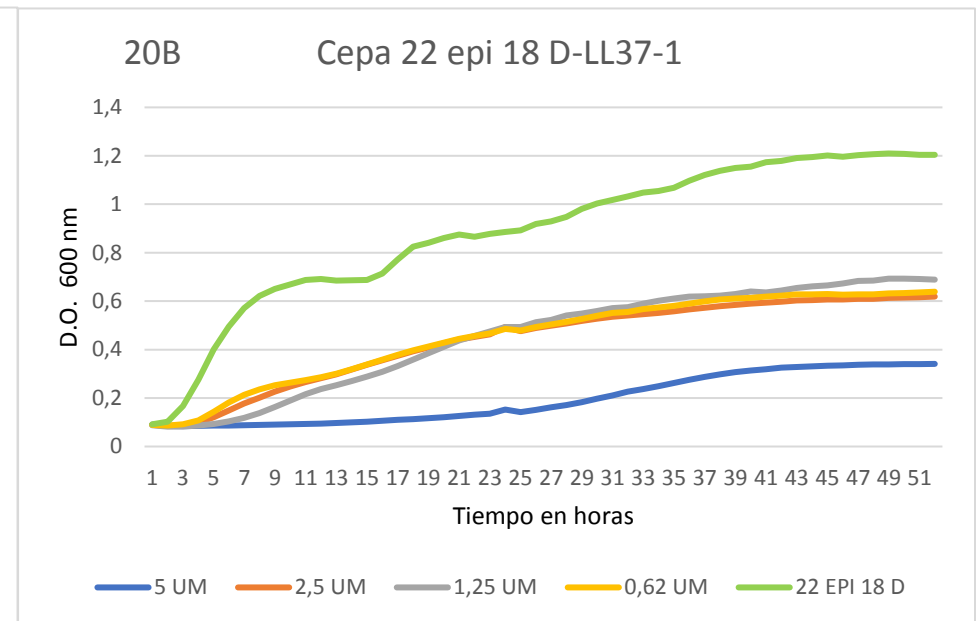


Figura 21A. Cepa 22 epi 45 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

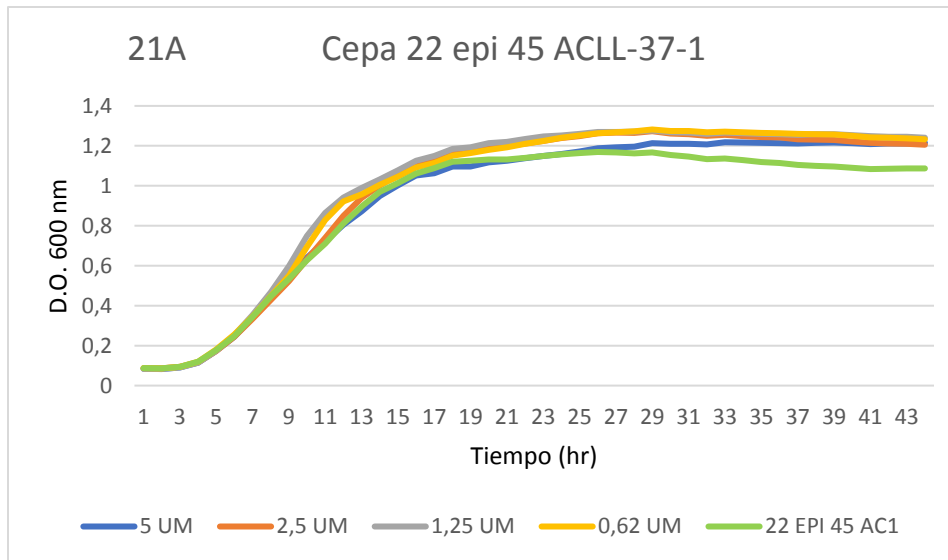


Figura 21B. Cepa 22 epi 45 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

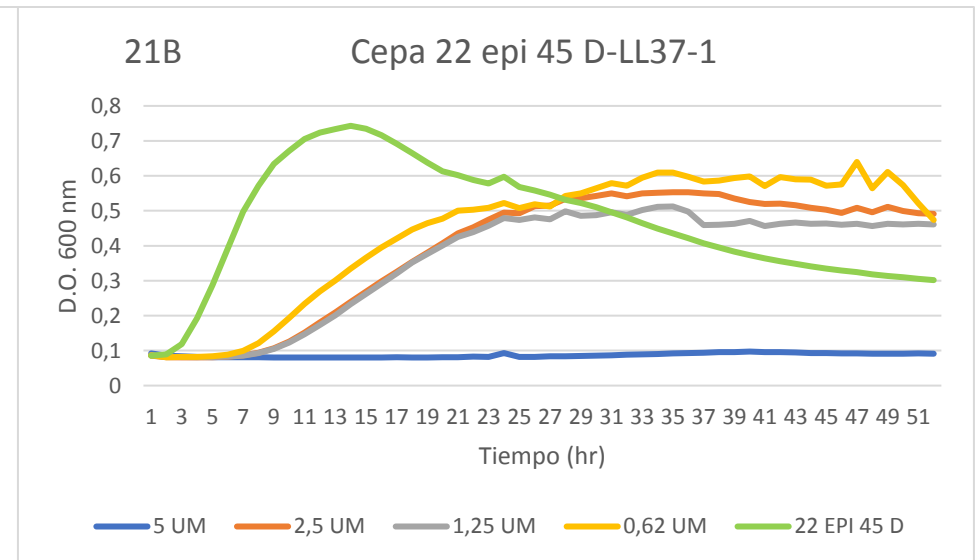


Figura 22A. Cepa 22 epi 57 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

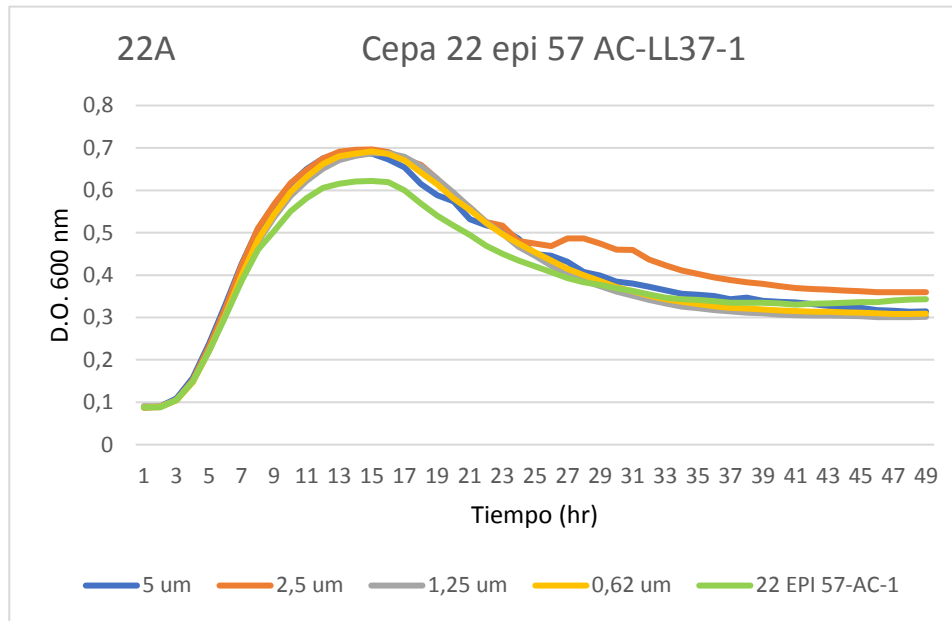


Figura 22B. Cepa 22 epi 57 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

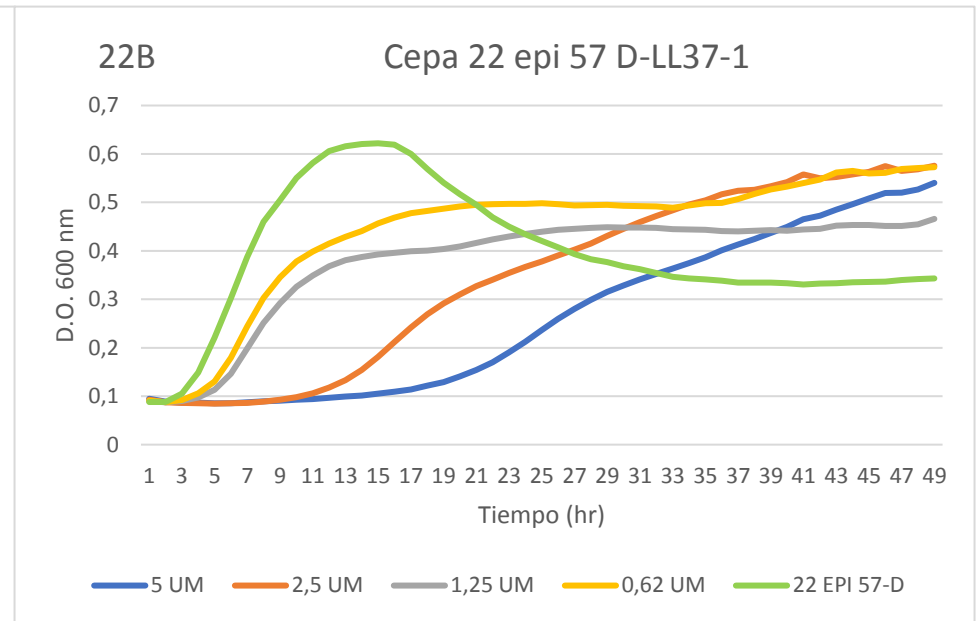


Figura 23A. Cepa 22 epi 58 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

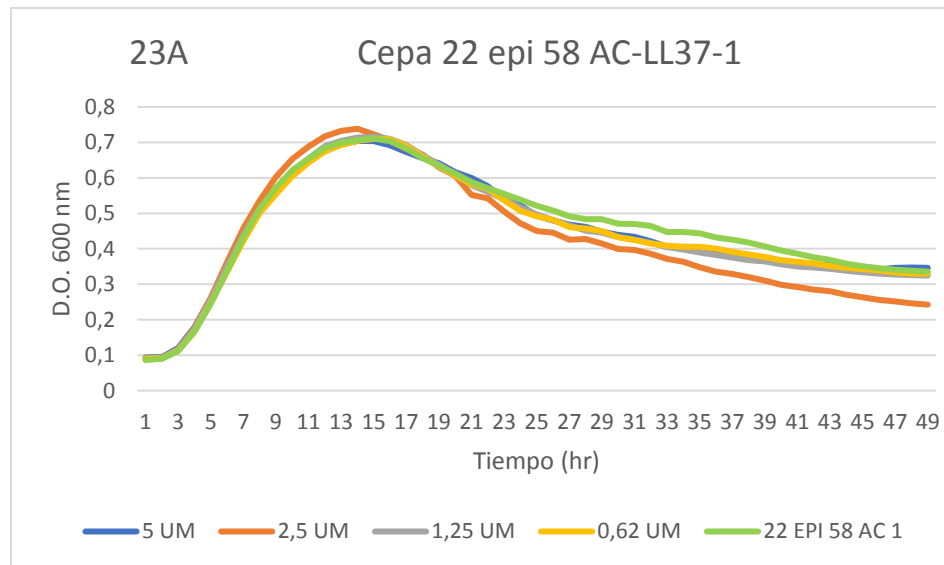


Figura 23B. Cepa 22 epi 58 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

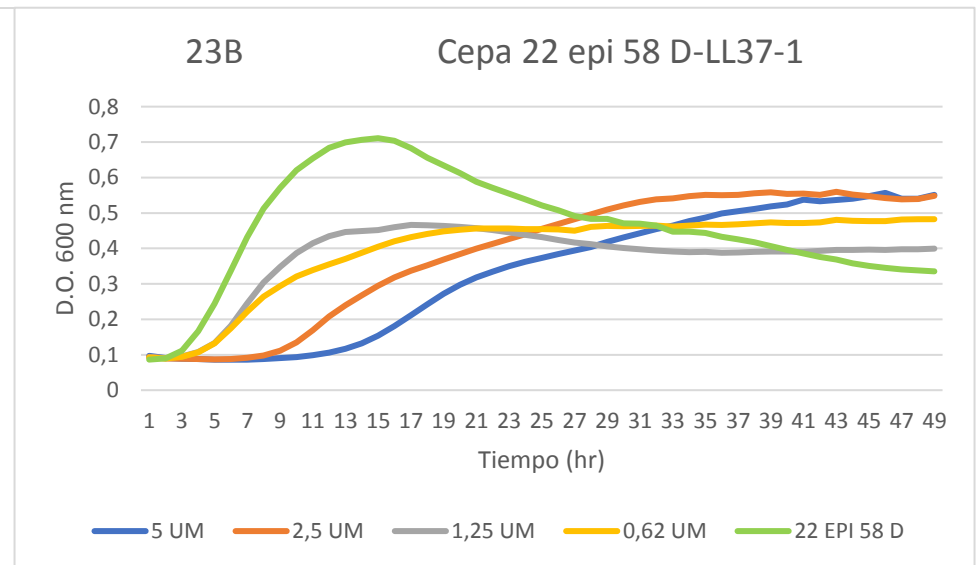




Figura 24A. Cepa 22 epi 60 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

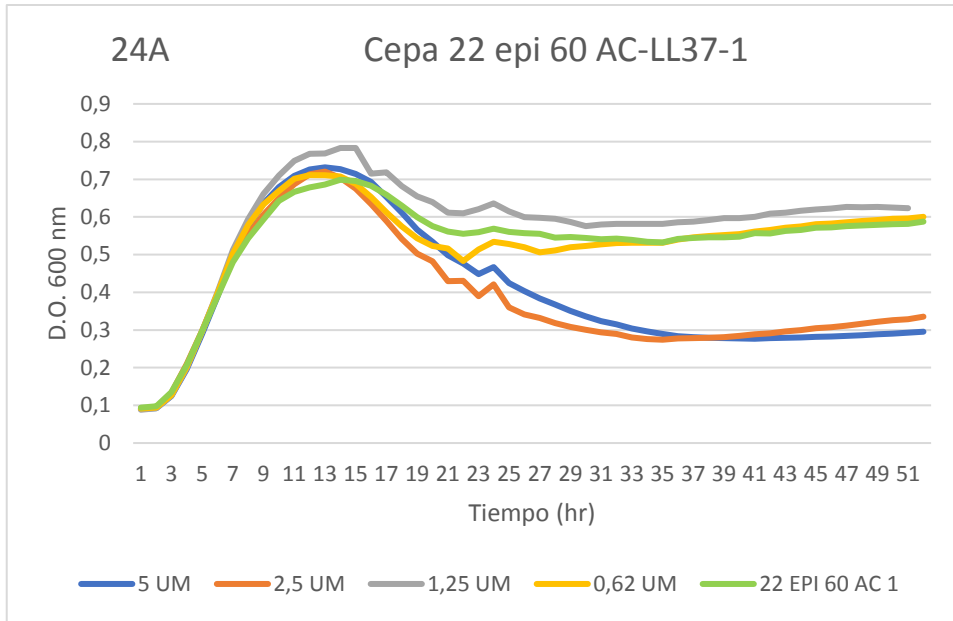


Figura 24B. Cepa 22 epi 60 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

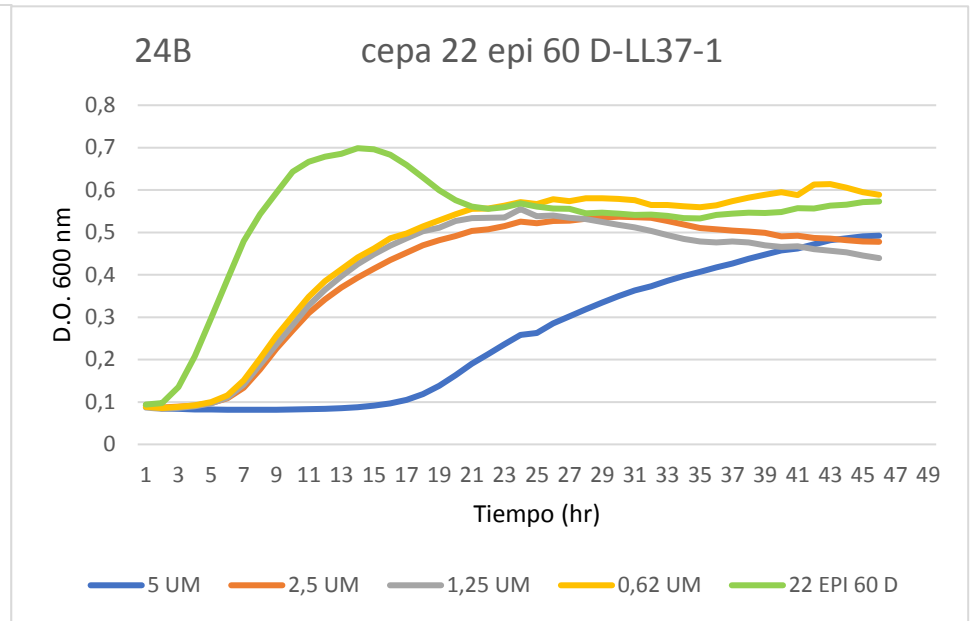


Figura 25A. Cepa 22 epi 61 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

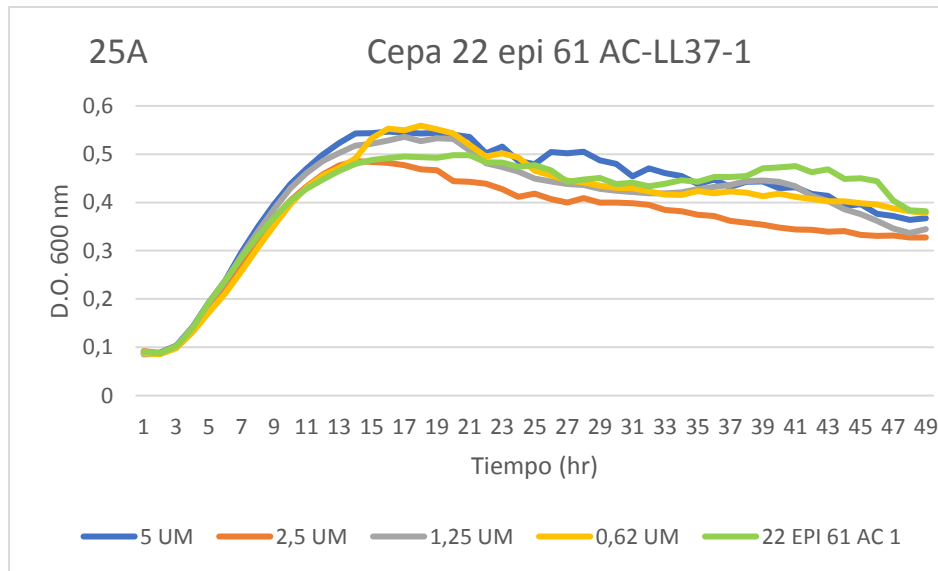


Figura 25B. Cepa 22 epi 61 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

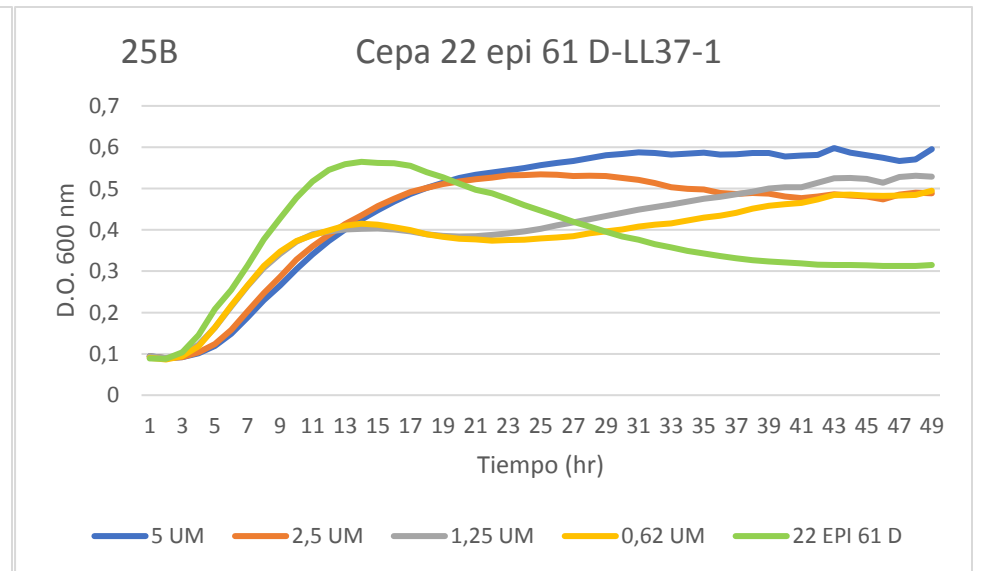


Figura 26A. Cepa 22 epi 71 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

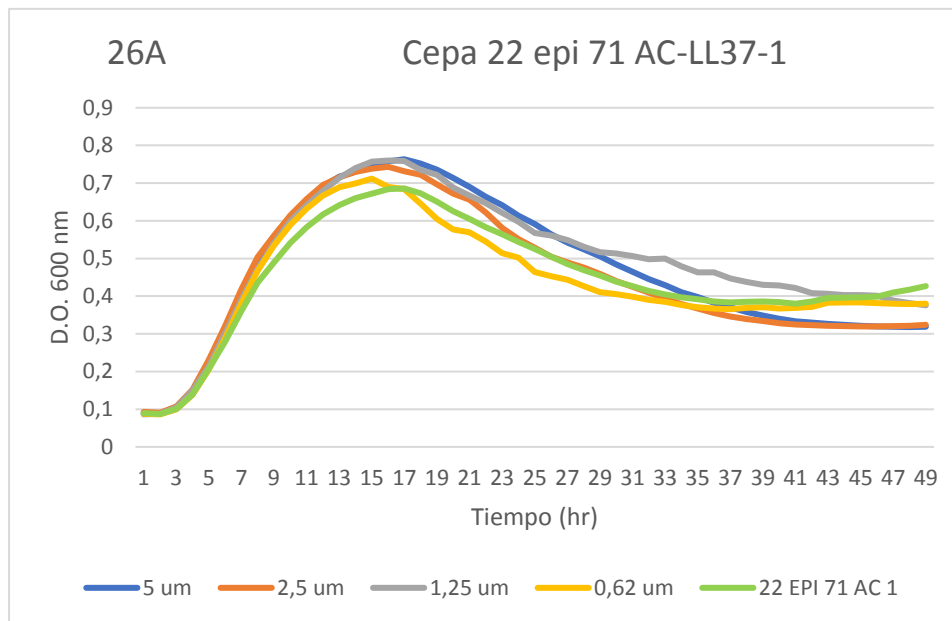


Figura 26B. Cepa 22 epi 71 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

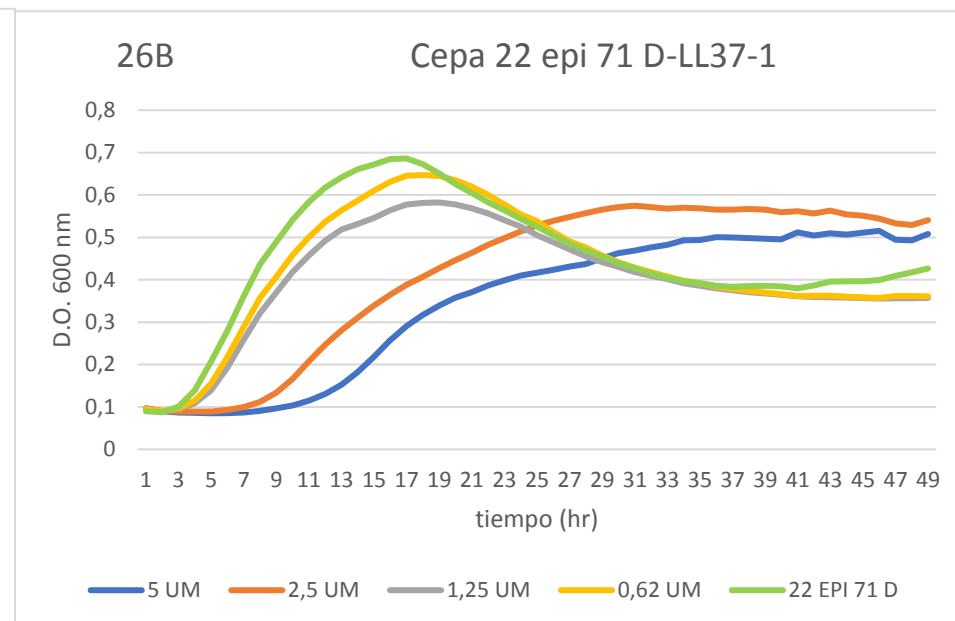


Figura 27A. Cepa 22 epi 72 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

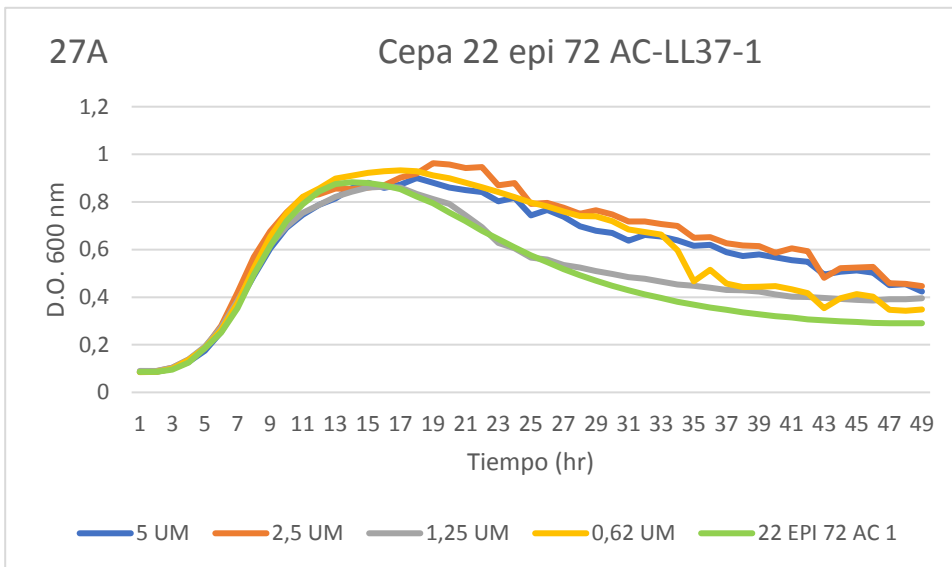


Figura 27B. Cepa 22 epi 72 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

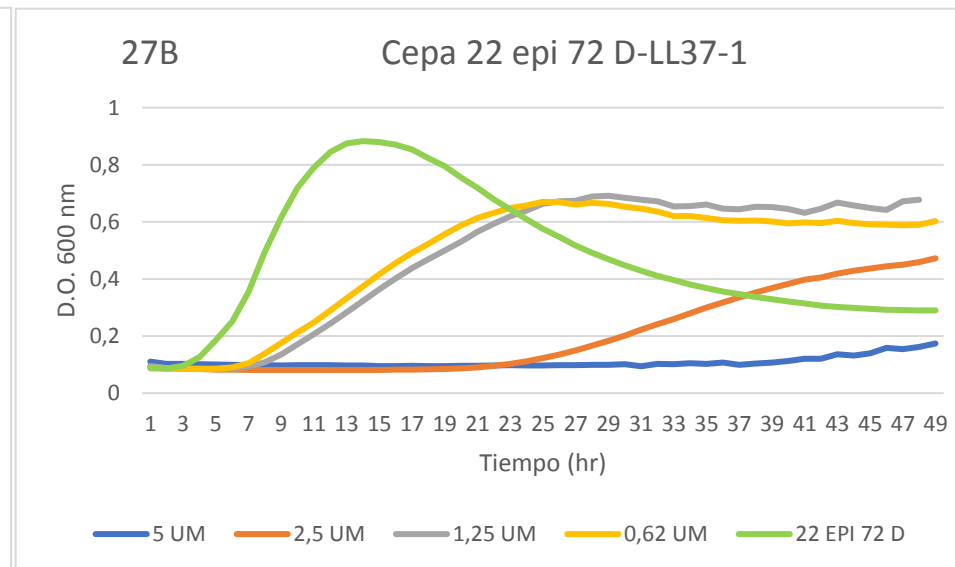


Figura 28A. Cepa 22 epi 81 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 28B. Cepa 22 epi 81 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

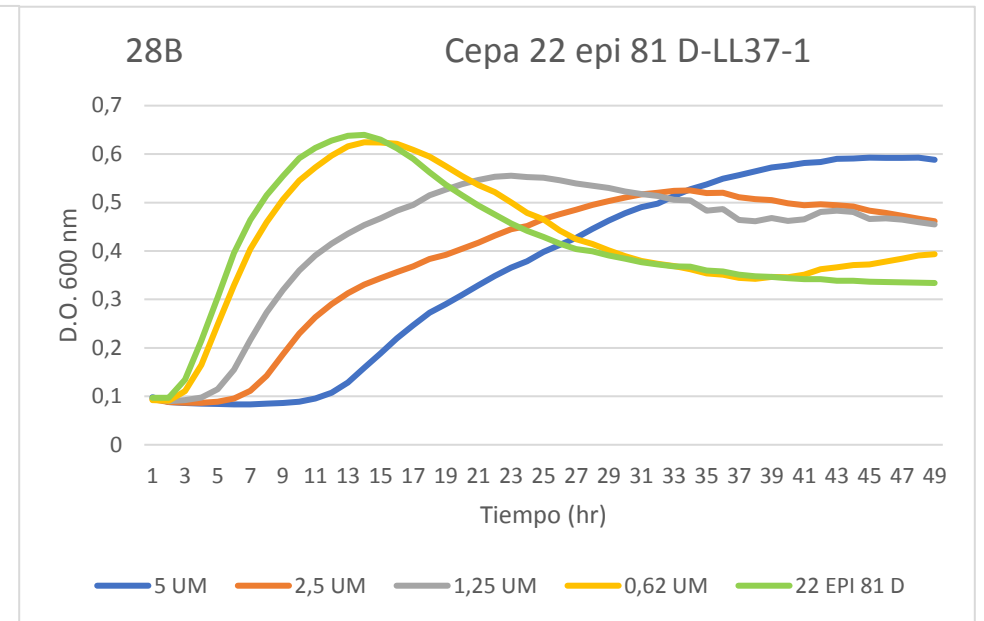
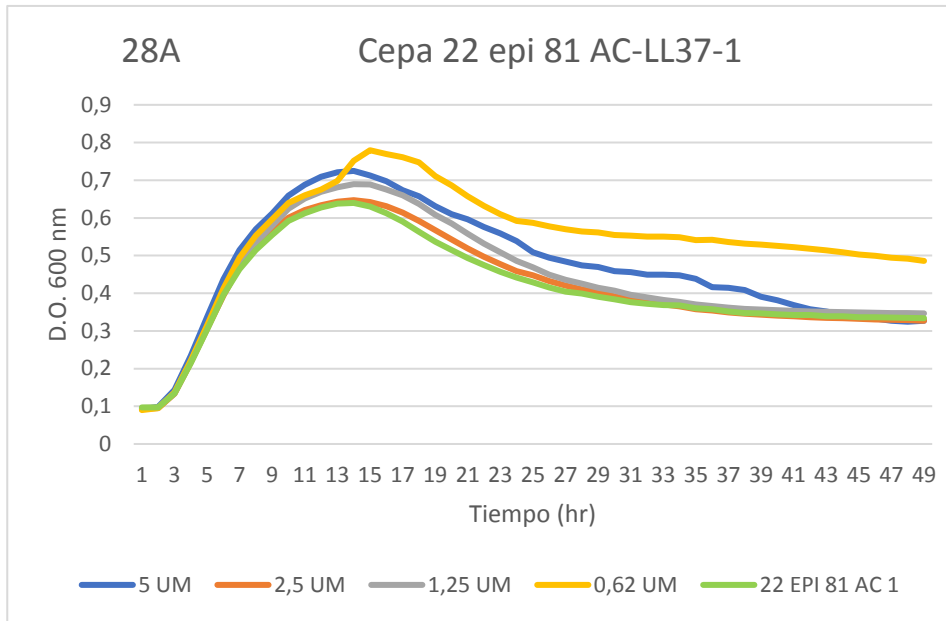


Figura 29A. Cepa 22 epi 82 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 29B. Cepa 22 epi 82 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

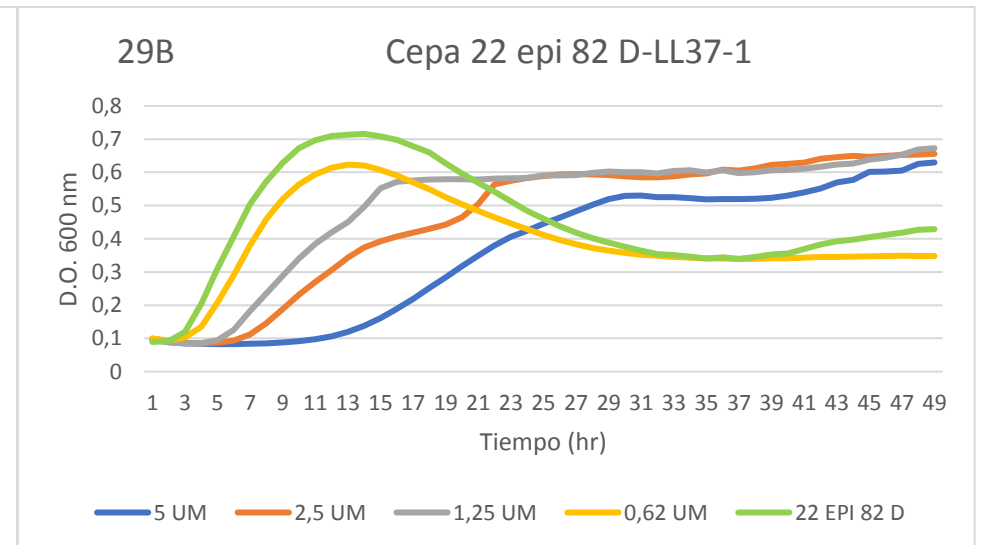
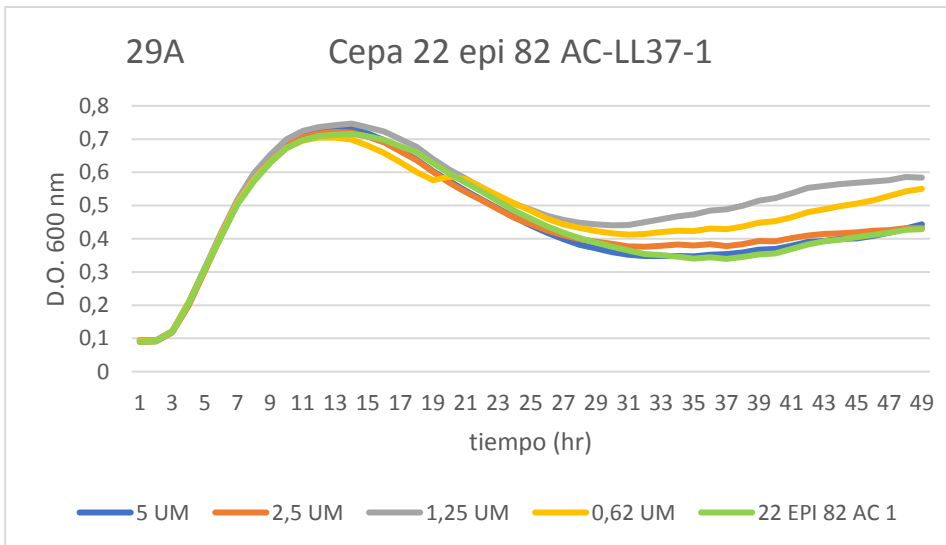


Figura 30A. Cepa 22 epi 83 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

Figura 30B. Cepa 22 epi 83 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

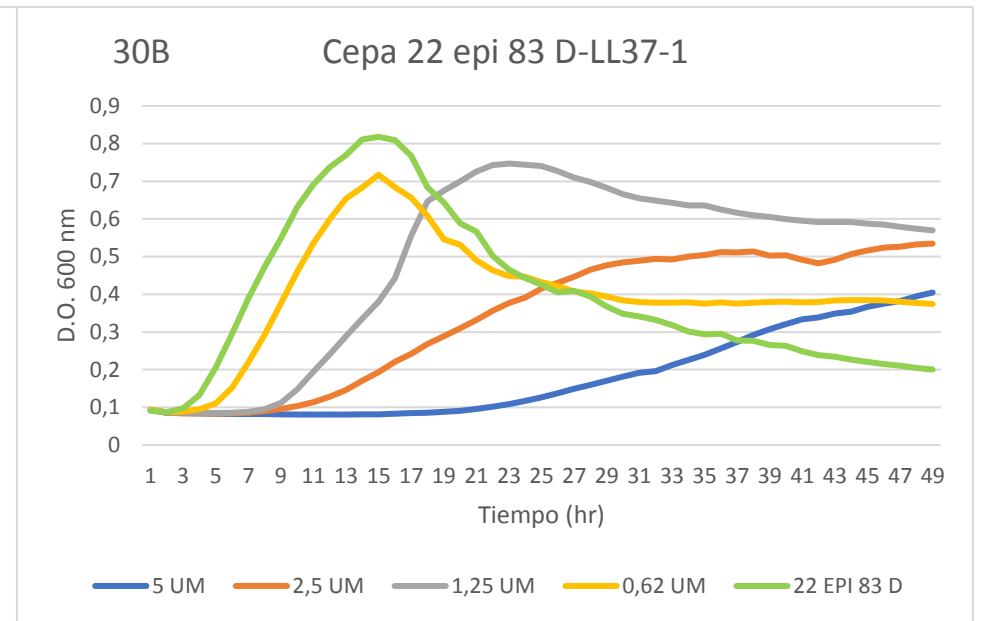
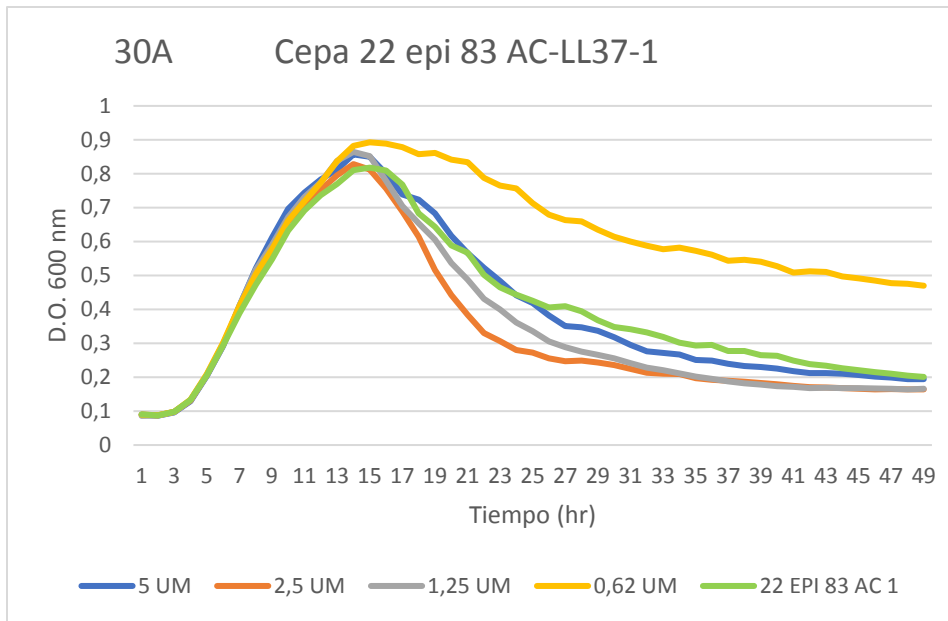


Figura 31A. Cepa 22 epi 84 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

Figura 31B. Cepa 22 epi 84 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,62  $\mu\text{M}$

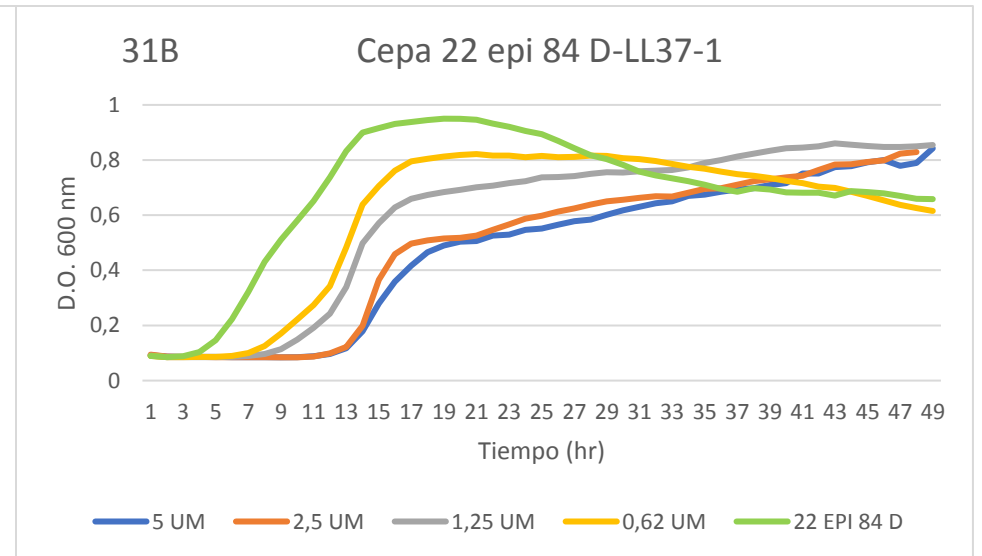
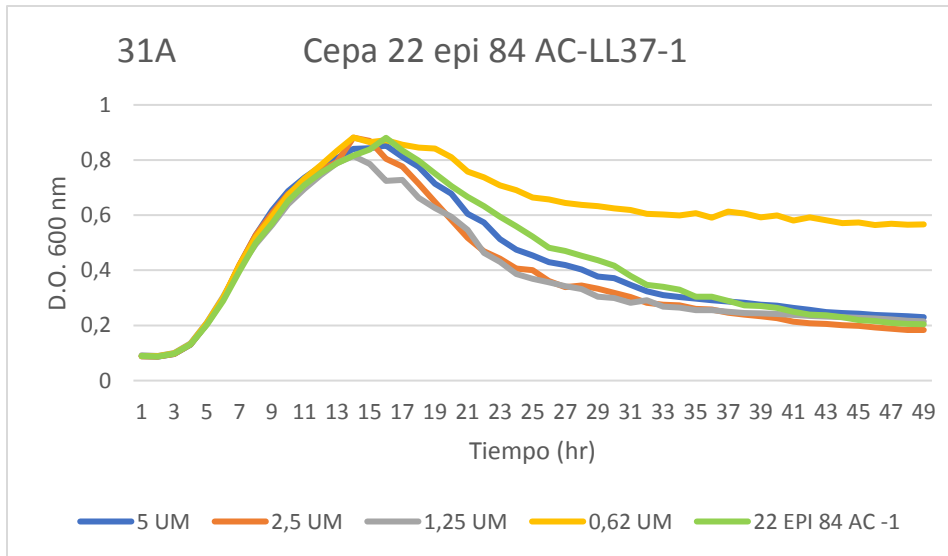


Figura 32A. Cepa 22 epi 91 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

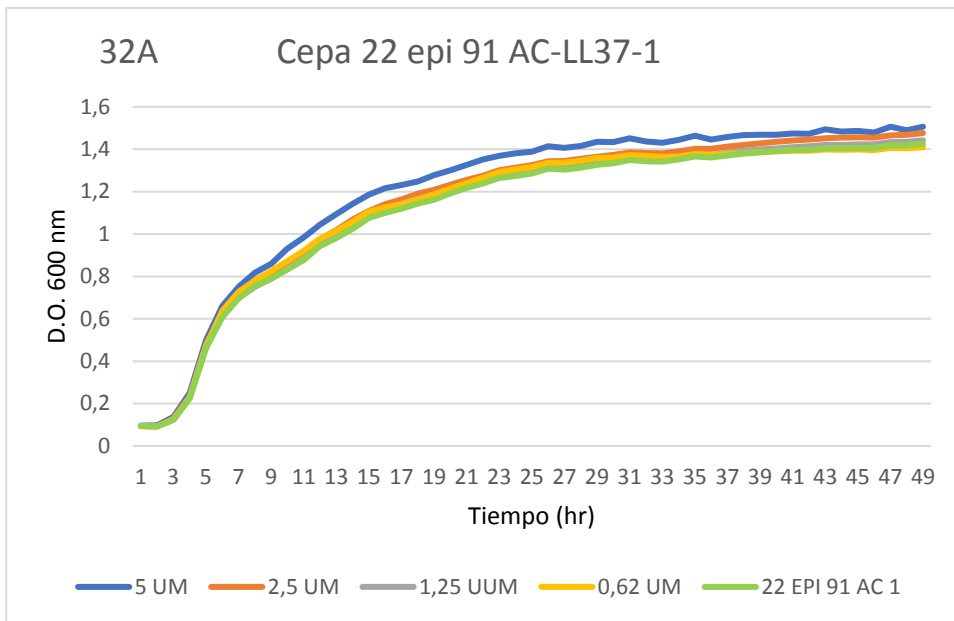


Figura 32B. Cepa 22 epi 91 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

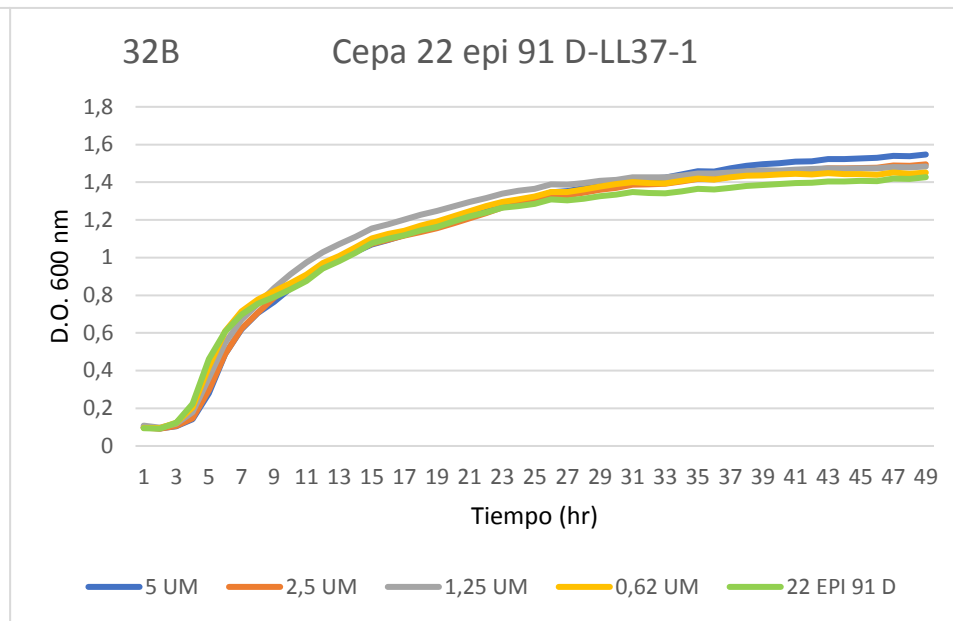


Figura 33A. Cepa 24 epi 225 *S. epidermidis* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

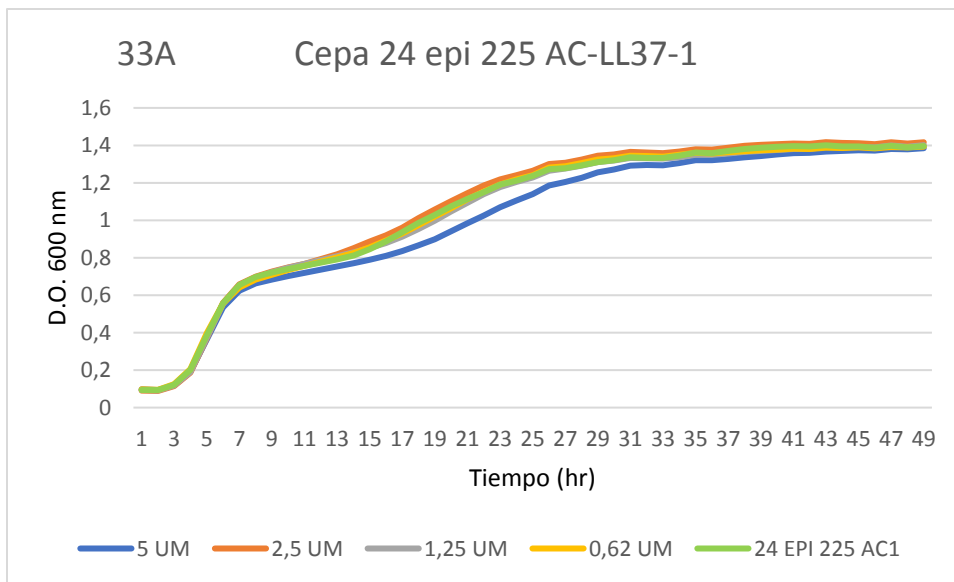
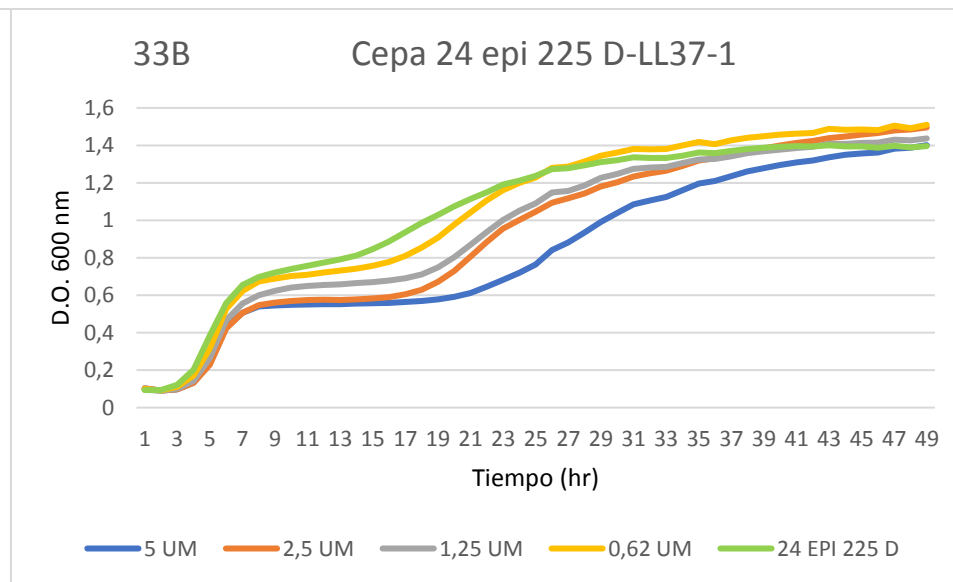


Figura 33B. Cepa 24 epi 225 *S. epidermidis* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$



En cuanto a las bacterias Gram negativas, se analizaron 2 aislamientos de *E. coli* a los cuales se les realizaron por triplicado curvas de crecimiento con y sin la presencia de los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1, a diferentes concentraciones 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  y 0.62  $\mu\text{M}$ . De los cuales se obtuvieron las siguientes graficas:

Figura 34A. Cepa ATCC 35218 *E. coli* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 34B. Cepa ATCC 35218 *E. coli* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

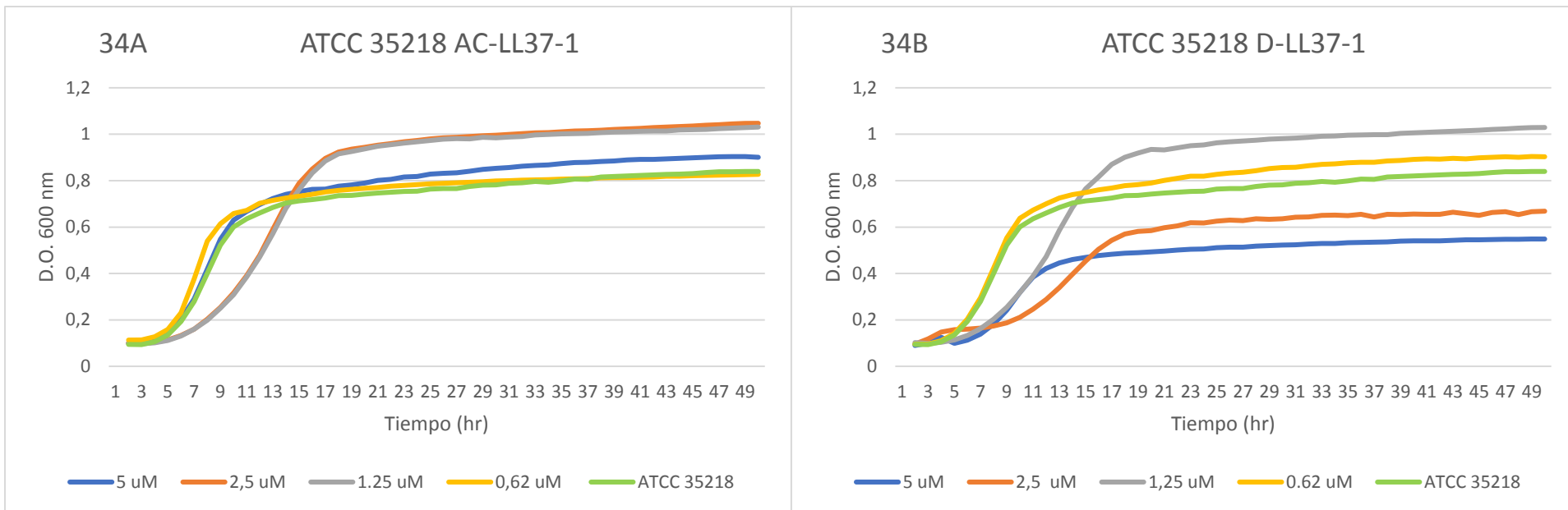


Figura 35A. Cepa 24 coli 492 *E. coli* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 35B. Cepa 24 coli 492 *E. coli* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

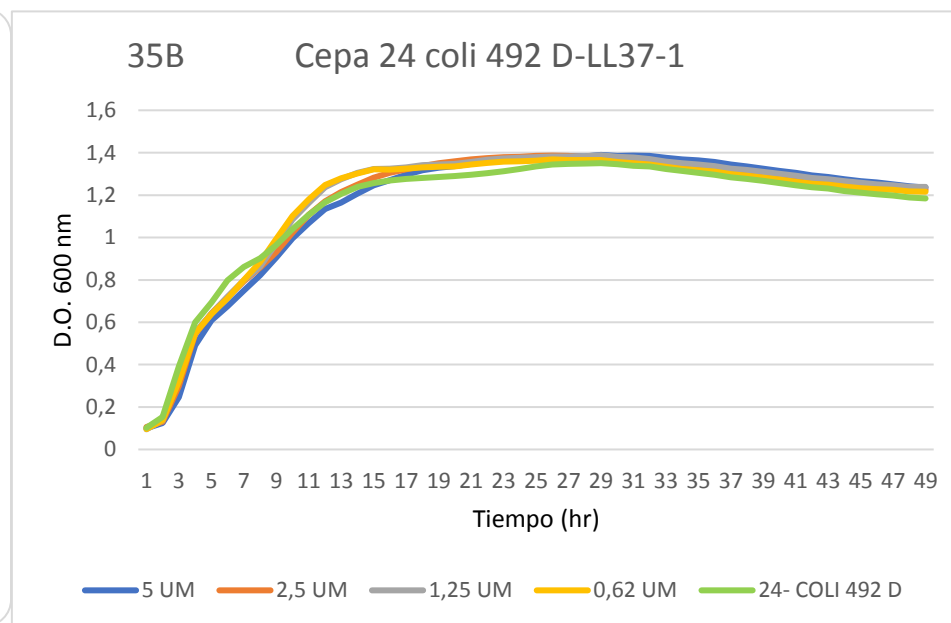
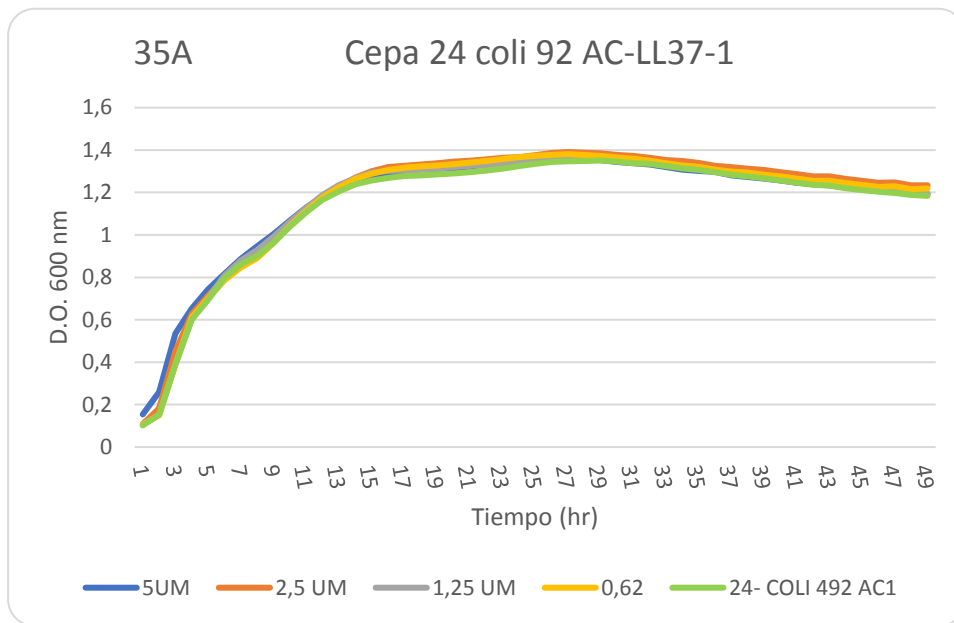
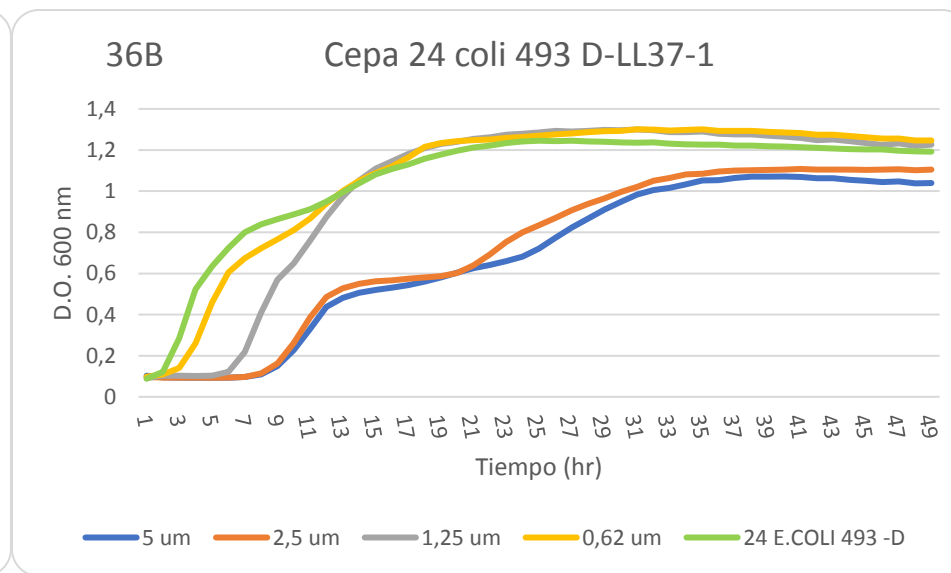
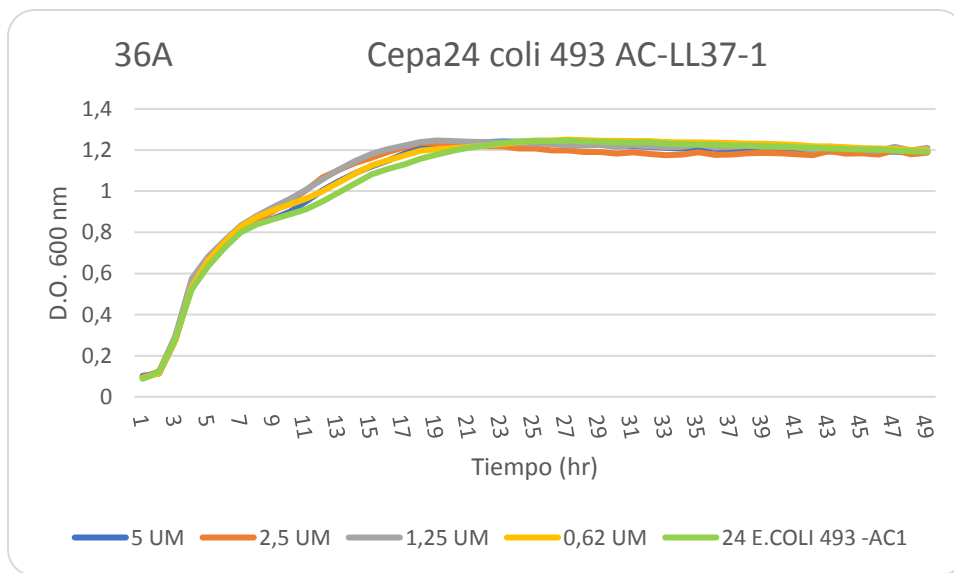


Figura 36A. Cepa 24 coli 493 *E. coli* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2.5,1.25 v 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 36B. Cepa 24 coli 493 *E. coli* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$



Se tomaron cepas de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* a cuáles se les realizaron por triplicado curvas de crecimiento con y sin el estímulo de los péptidos denominados AC-LL37-1 y D-LL37-1, a diferentes concentraciones 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  y 0.62  $\mu\text{M}$ , teniendo en cuenta el control positivo ATCC 27853. De los cuales se obtuvieron las siguientes graficas:

Figura 37A. Cepa ATCC 27853 *P. aeruginosa* control positivo tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 37B. Cepa ATCC 27853 *P. aeruginosa* control positivo tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

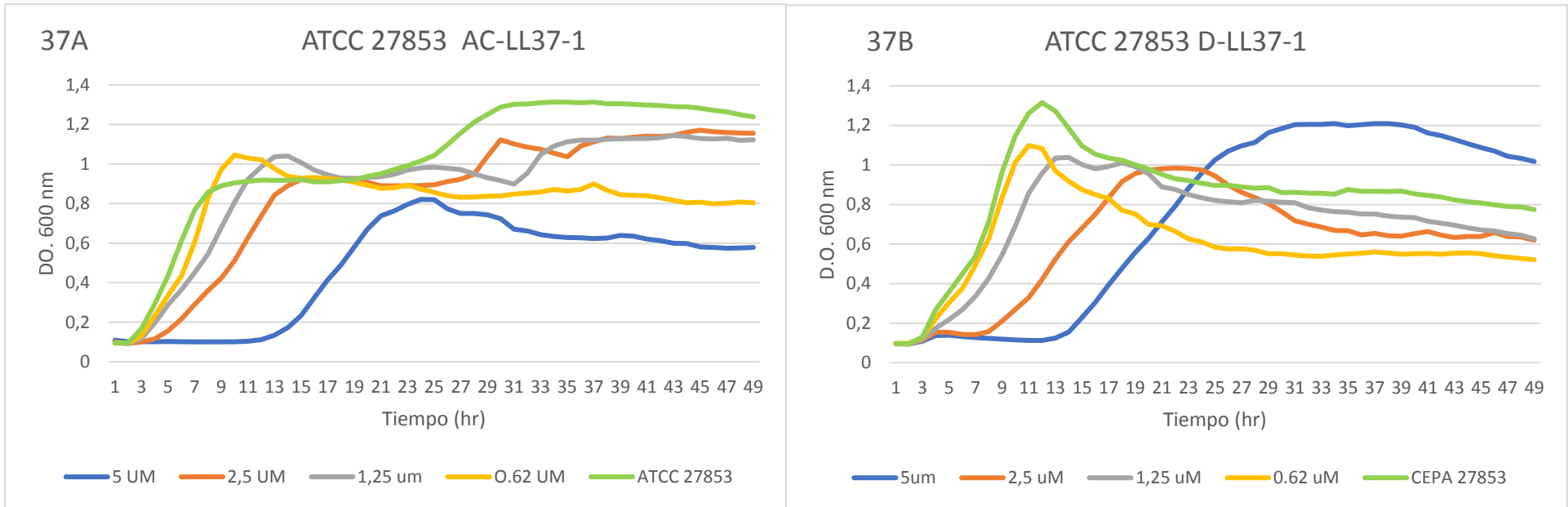




Figura 38A. Cepa 24590 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 38B. Cepa 24590 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

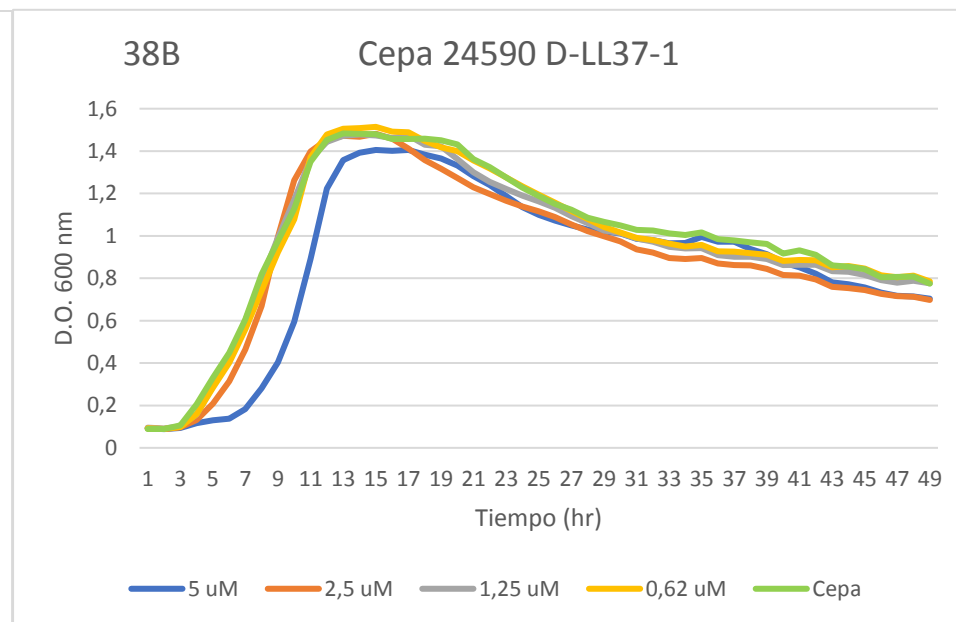
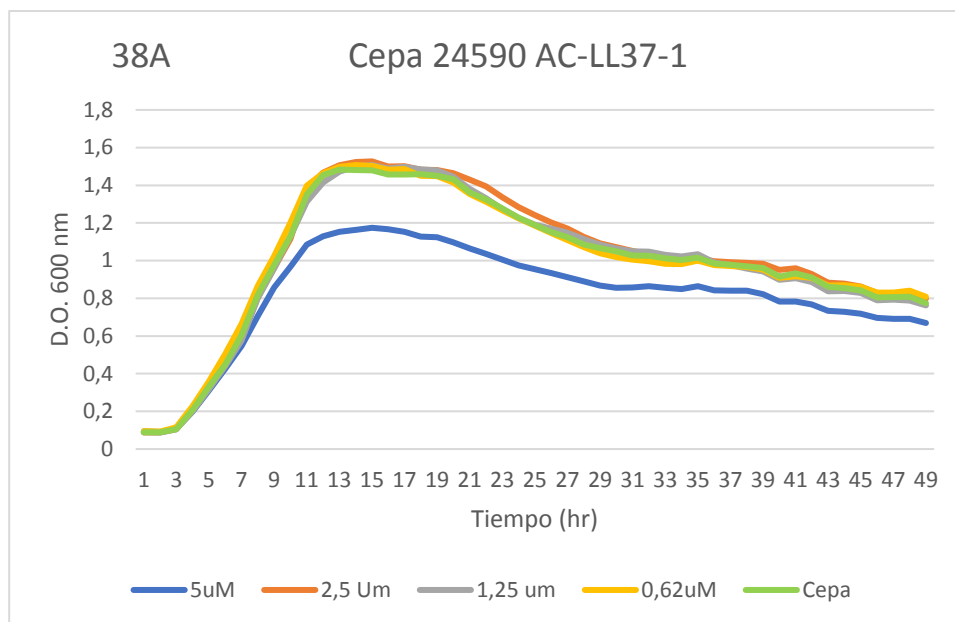


Figura 39A. Cepa 24541 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

Figura 39B. Cepa 24541 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

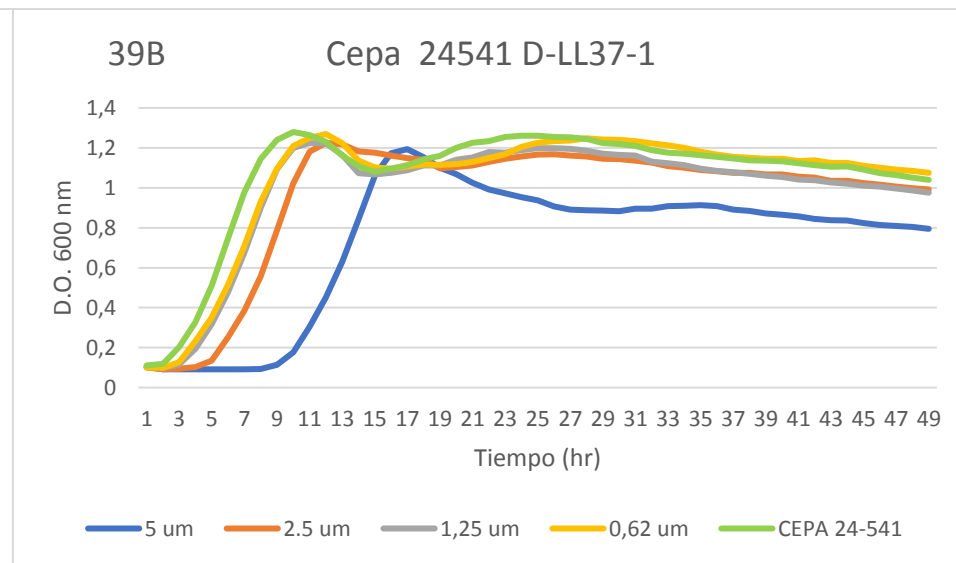
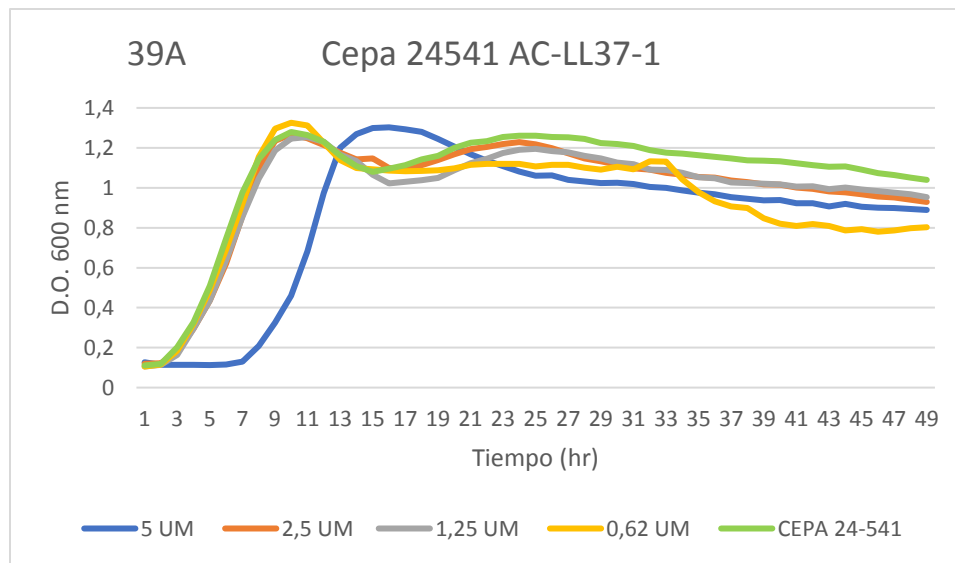


Figura 40A. Cepa 24536 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

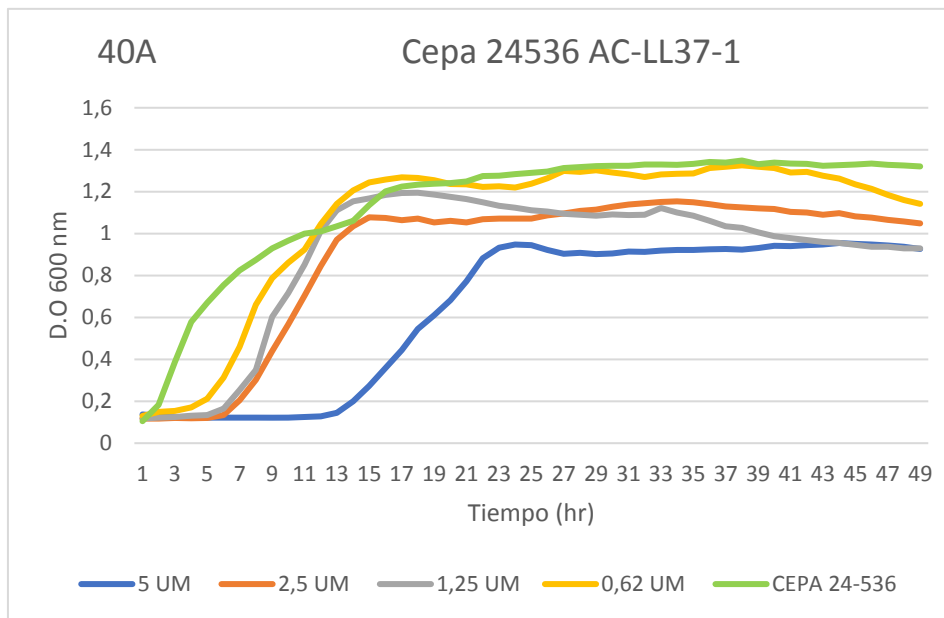


Figura 40B. Cepa 24536 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

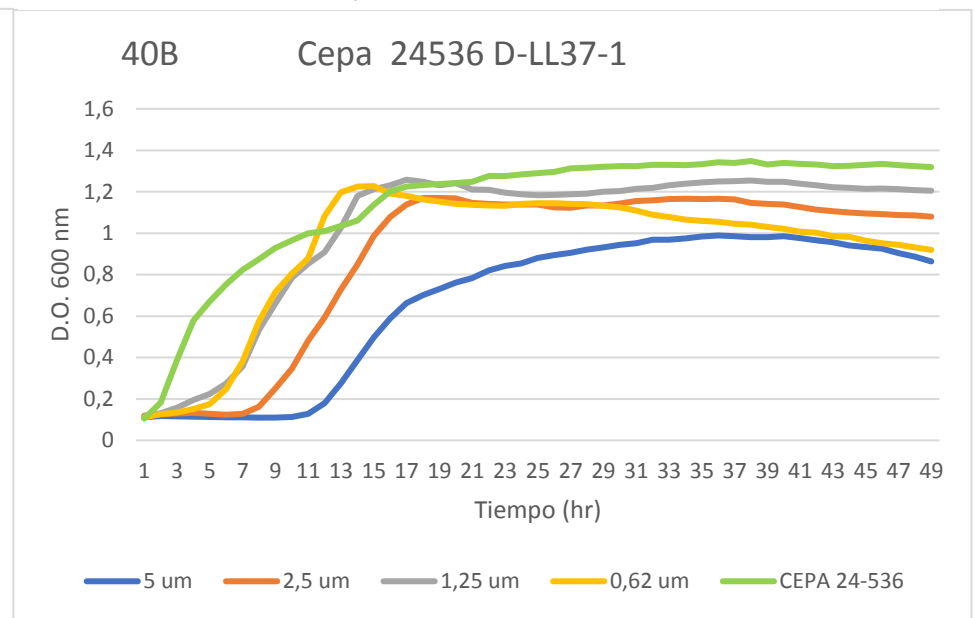


Figura 41A. Cepa 24539 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

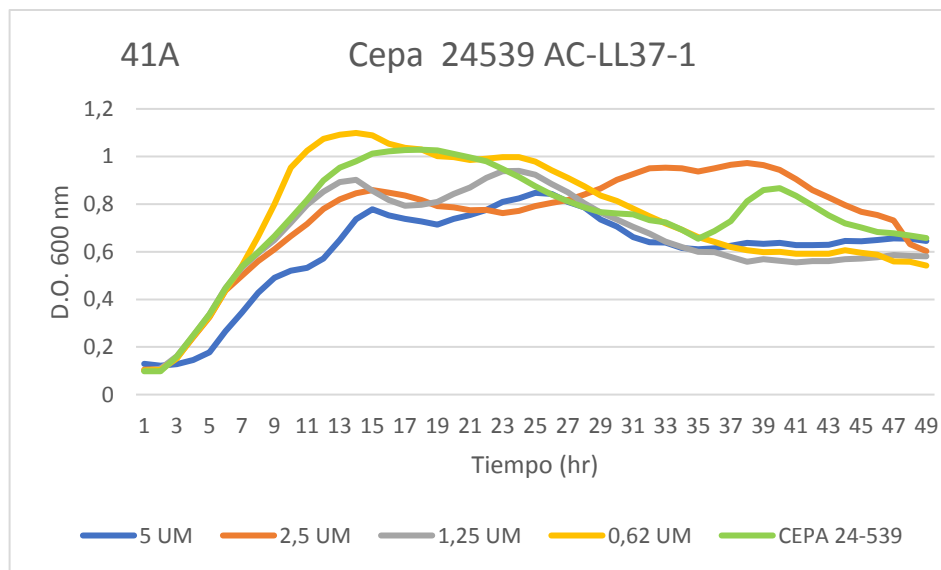


Figura 41B. Cepa 24539 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

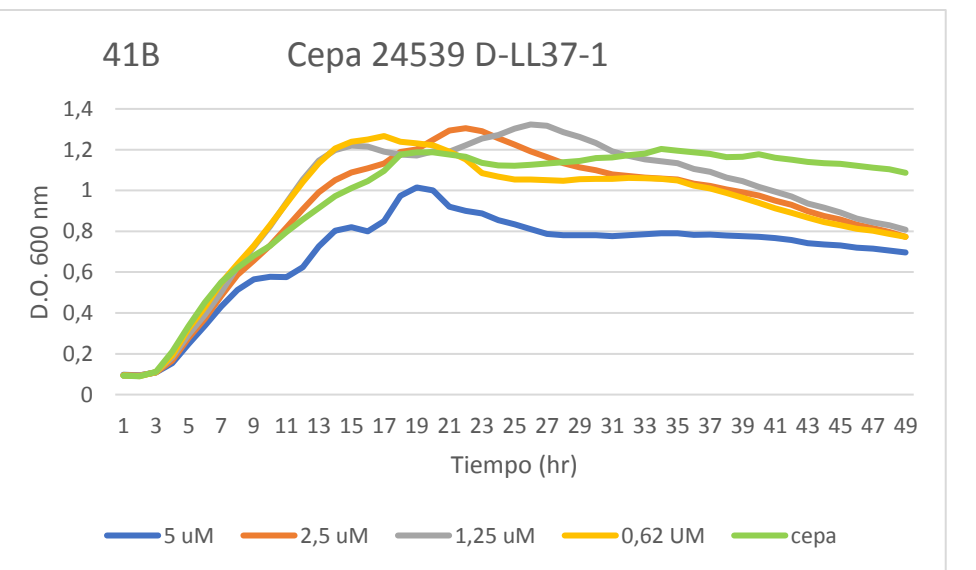


Figura 42A. Ceba 24533 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

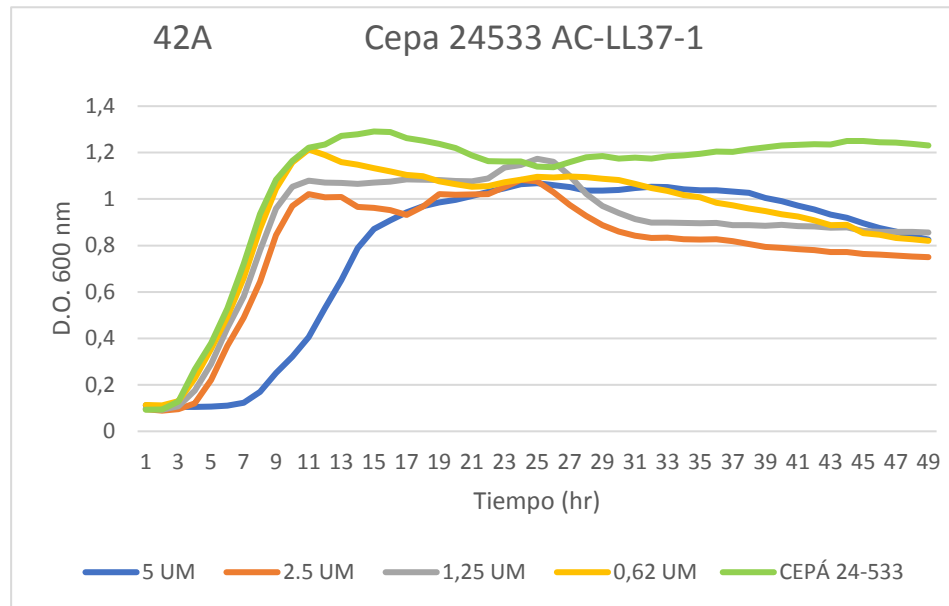


Figura 42B. Ceba 24533 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

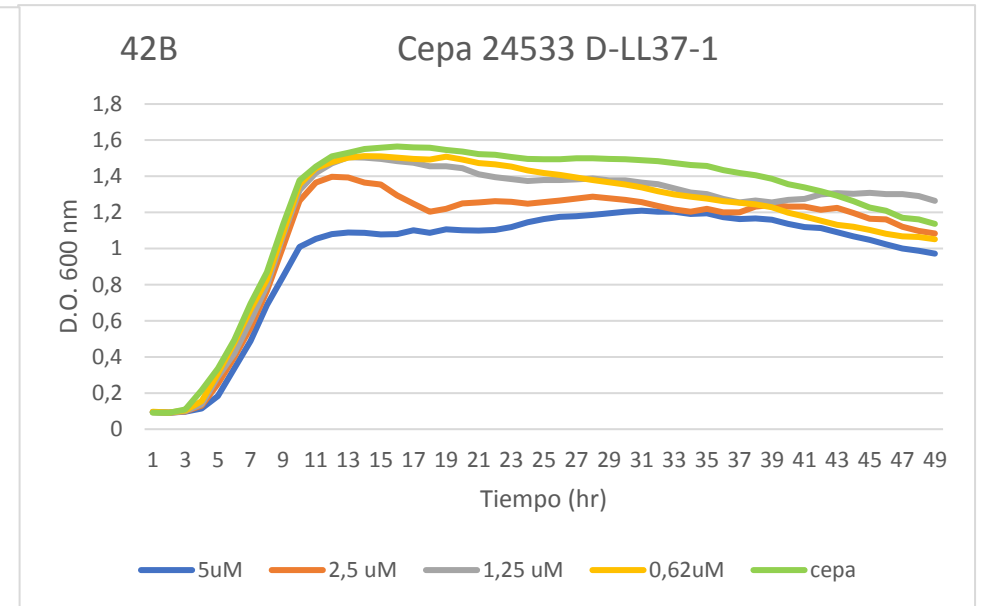


Figura 43A. Ceba 24550 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

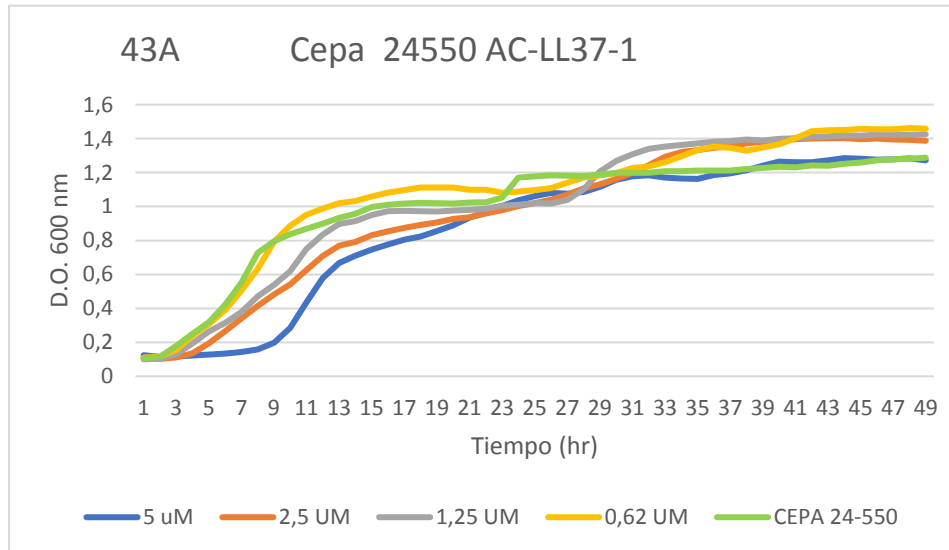


Figura 43B. Ceba 24550 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

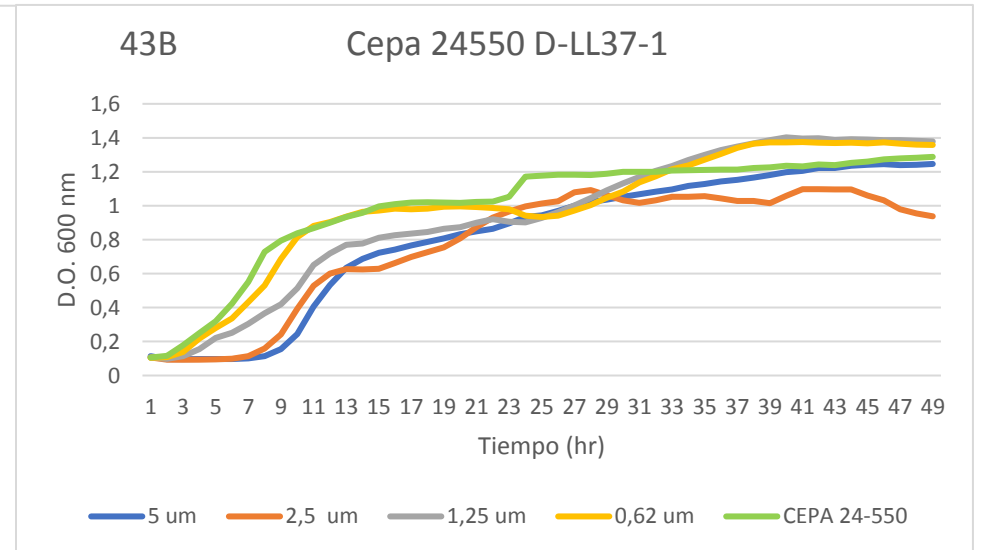


Figura 44A. Cepa 24532 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

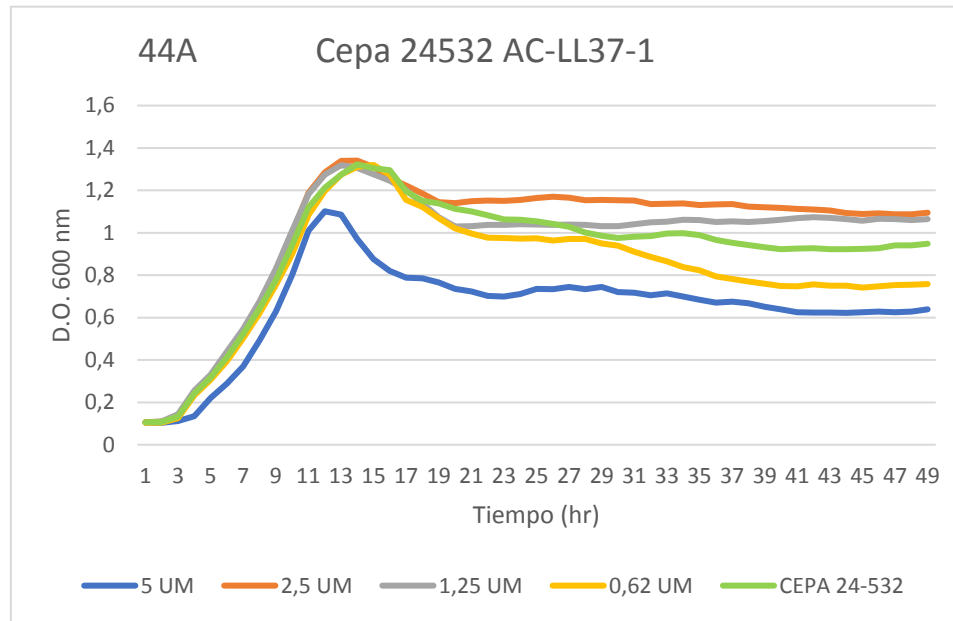


Figura 44B. Cepa 24532 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

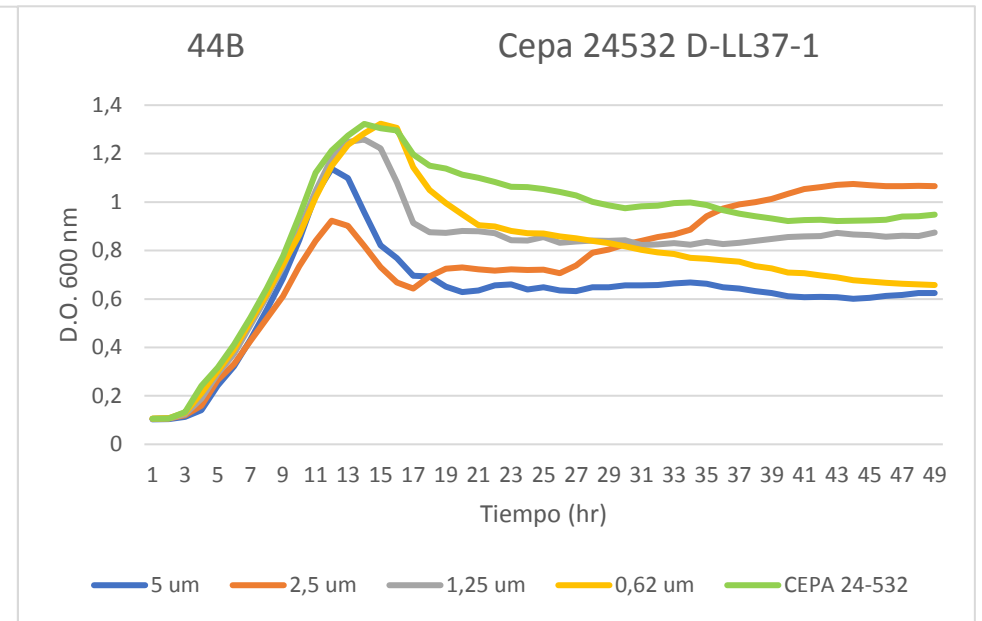


Figura 45A. Cepa 24531 *P. aeruginosa* tratado con péptido AC-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

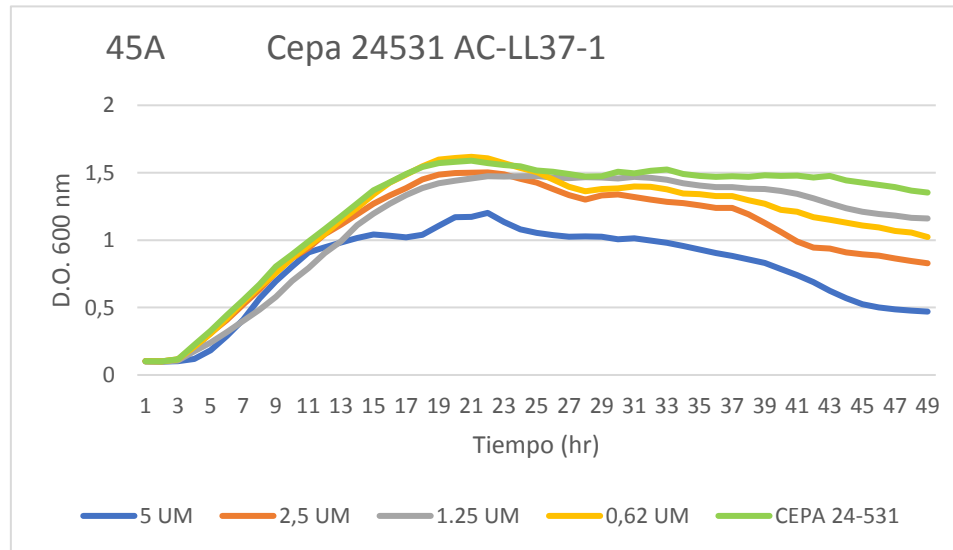
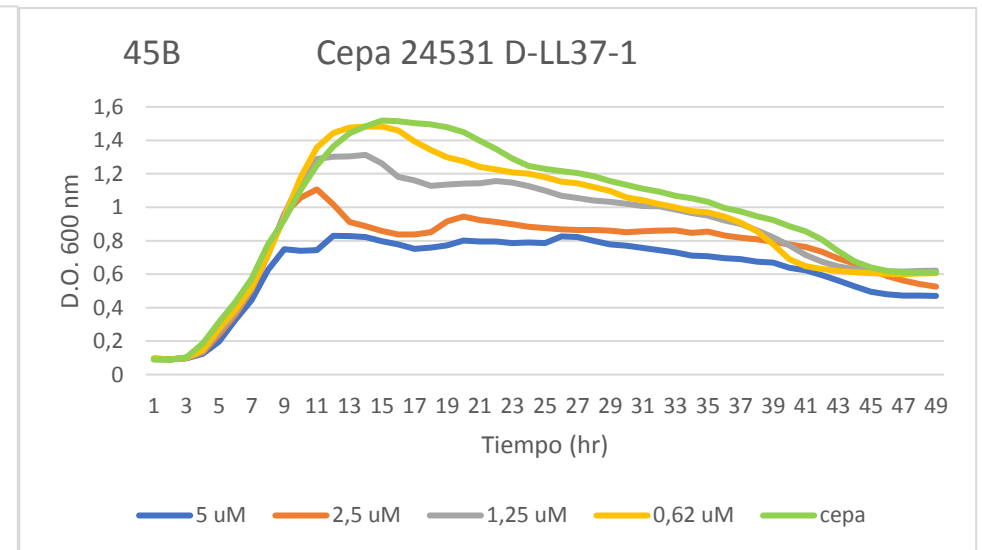


Figura 45B. Cepa 24531 *P. aeruginosa* tratado con péptido D-LL37-1 a concentraciones de 5, 2,5,1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$



ANEXO 2. Promedio de las D.O. de la fase Log tardía de cada cepa para la obtención de tasa de inhibición

Tabla 1. Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Logarítmica tardía para obtener % Tasa de inhibición en cepas *S. aureus*

Cepas de <i>S. aureus</i>	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía sin exposición al péptido	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido AC-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido D-LL-37-1 a 5 $\mu$ M
Control ATCC USA 300	1,174555556	1,072555556	1,05790476
Col 23	1,159233333	1,11188889	1,141
Col 42	1,185106349	1,20113333	1,15526667
Col 77	1,156002646	1,15533333	1,09866667
Col 81	0,862755411	0,95771429	1,01513333
Col 86	1,125883598	1,16006667	1,23644444
Col 111	1,1410625	1,12195238	1,24180952
Col 145	0,969630952	1,01972222	0,89028571
Col 190	1,148276786	1,17209524	1,1625
Col 207	1,069316667	1,02573333	0,95683333
Col 208	0,822222222	0,81733333	0,72813333
Col 227	1,135526786	1,09833333	1,08566667
Col 252	1,146761905	1,25354167	0,98086667
Col 318	0,895	0,87516667	0,88961111
Col 478	0,995041667	1,05191667	0,9925
5 Sau 205	1,006537037	1,04128571	0,92904762

Tabla 2. Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Lag tardía para obtener % Tasa de inhibición en cepas *S. epidermidis*

Cepas de <i>S. epidermidis</i>	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía sin exposición al péptido	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido AC-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido D-LL-37-1 a 5 $\mu$ M
ATCC 12228	1,020625	0,85233333	0,82583333
ATCC 35984	1,15245926	0,96716667	0,70804167
22 epi 18	0,63197222	0,32094444	0,3222

22 epi39	0,88404762	1,0167619	0,09020833
22 epi 45	0,83675	0,97709524	0,0875
22 epi 57	0,5832	0,6382	0,31273333
22 epi 58	0,65923333	0,64146667	0,35338889
22 epi 60	0,67144167	0,68775	0,30152381
22 epi 61	0,4932	0,49453333	0,47388889
22 epi 71	0,64503333	0,70766667	0,37694444
22 epi 72	0,82758333	0,77946667	0,126
22 epi 81	0,59256667	0,6476	0,45158333
22 epi 82	0,65573333	0,67346667	0,46319048
22 epi 83	0,75028889	0,77853333	0,24381481
22 epi 84	0,86377778	0,8006	0,50966667
24 epi 225	0,97325	0,6265	0,51373333
22 epi 91	1,10443519	1,06322222	1,15754167

Tabla 3. Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Logarítmica tardía para obtener % Tasa de inhibición de cepas de *E. coli*

Cepas de <i>E. coli</i>	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía sin exposición al péptido	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido AC-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido D-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido LL-37 a 5 $\mu$ M
Control ATCC 35218	0,6568	0,6676	0,42775	0,086
24-493	0,82785317	0,91692857	0,50316667	0,10166667
24-492	1,09974074	1,10596296	1,04233333	0,418

Tabla 4. Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Logarítmica tardía para obtener el % de la tasa de inhibición de *P. aeruginosa*

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía sin exposición al péptido	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido AC-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido D-LL-37-1 a 5 $\mu$ M	Promedio de las D.O. obtenidas en la fase Log tardía con exposición al péptido LL-37 a 5 $\mu$ M
Control ATCC 27853	1,11143519	1,08288889	0,98433333	0,09666667
24-590	1,25386667	1,08391667	1,32411111	0,90433333
24-550	0,88027302	0,72938095	0,64425	0,17355556
24-533	1,18896111	0,93553333	0,96966667	0,809
24-531	1,43352778	0,99666667	0,688	0,8522963
24-541	1,19835556	1,23433333	1,14211111	0,89604762
24-539	0,96283889	0,47911111	0,55122222	0,39355556
24-532	1,2325	1,056	1,00422222	0,71711111
24-536	1,08931296	0,862	0,74322222	1,1292

ANEXO 3. Curvas de crecimiento de bacterias Gram negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa* expuestas al péptido LL-37

Figura 1. Control positivo ATCC 35218 *E. coli* LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu$ M

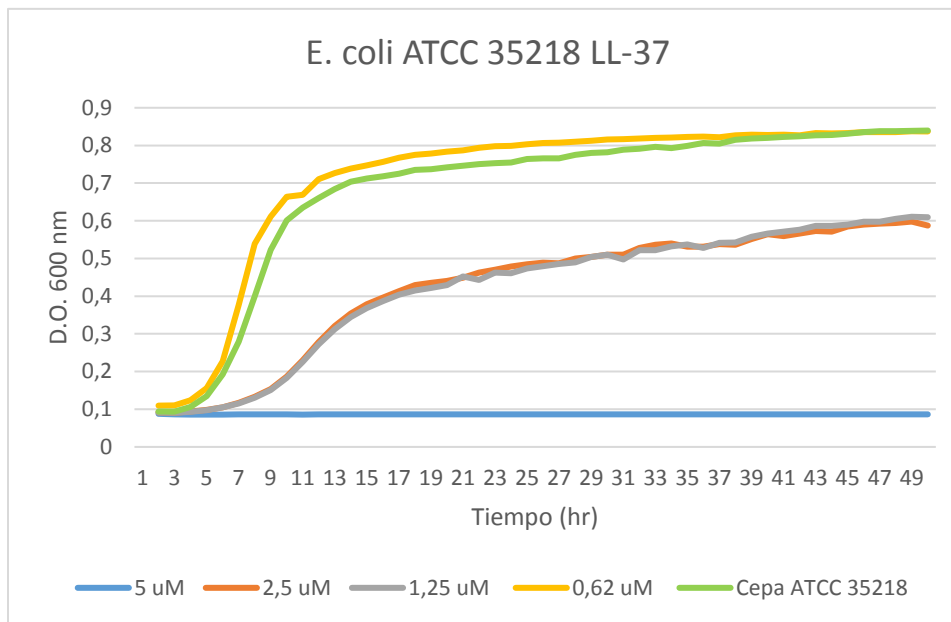


Figura 2. Control positivo *P. aeruginosa* 27853 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu$ M

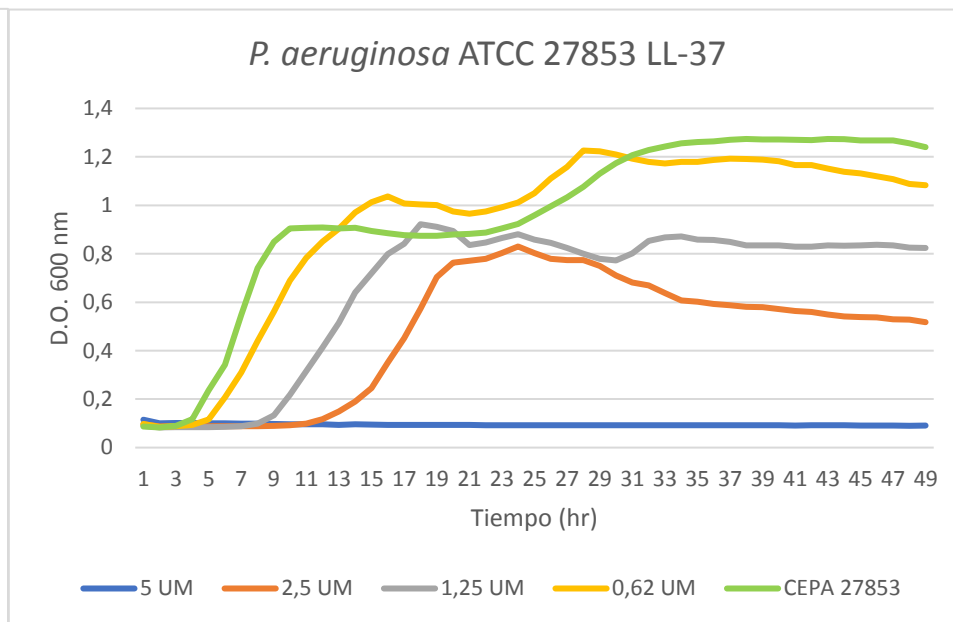


Figura 3. *P. aeruginosa* 24-541 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu$ M

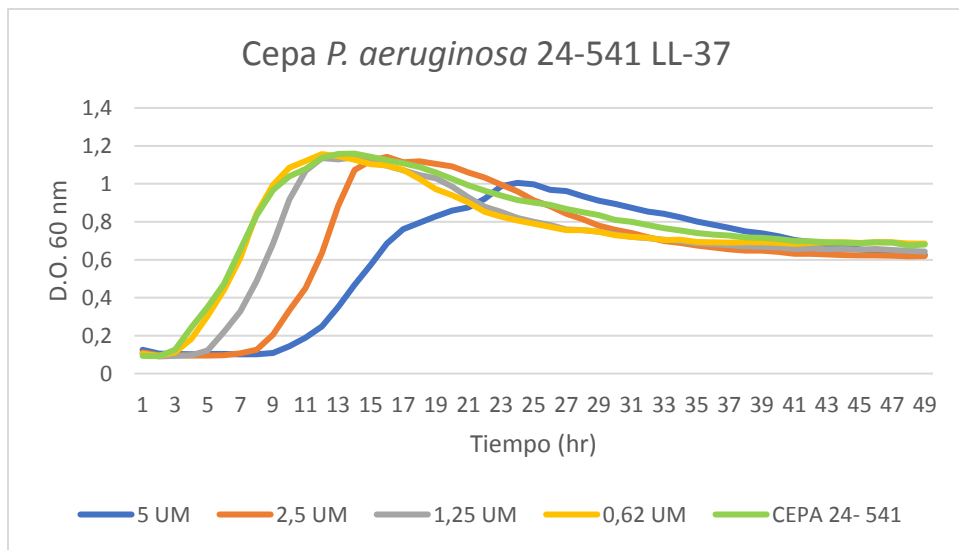


Figura 4. *P. aeruginosa* 24-590 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu$ M

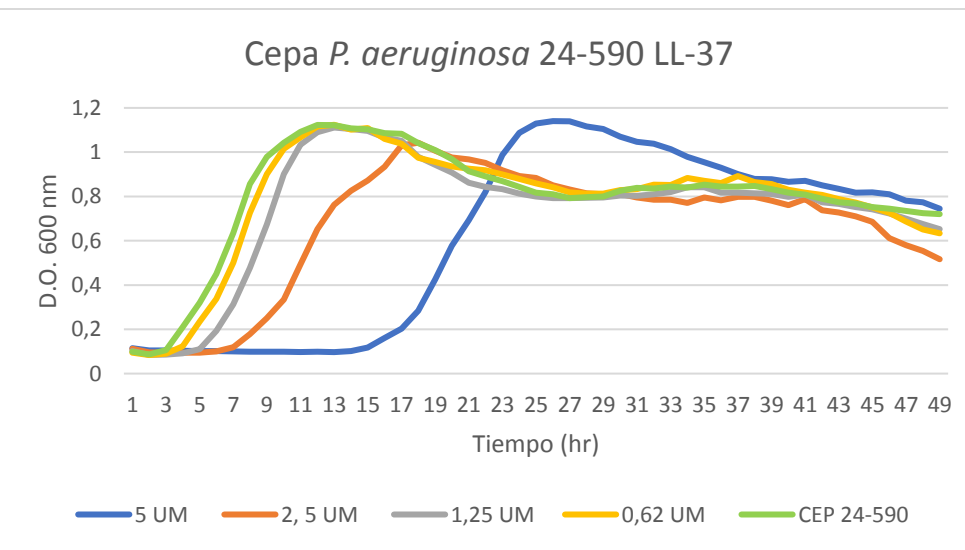




Figura 5. *P. aeruginosa* 24-532 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5. 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

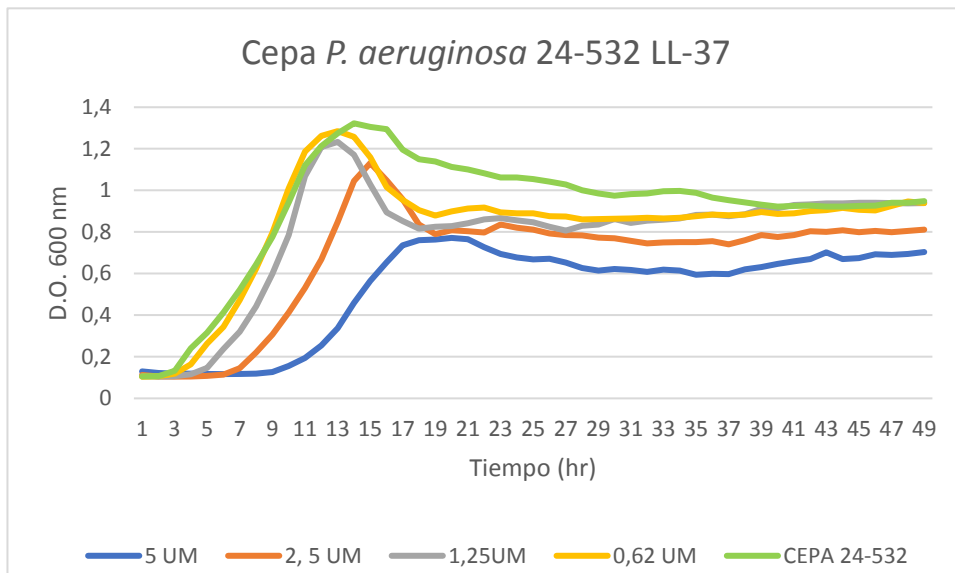


Figura 6. *P. aeruginosa* 24-531 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5. 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

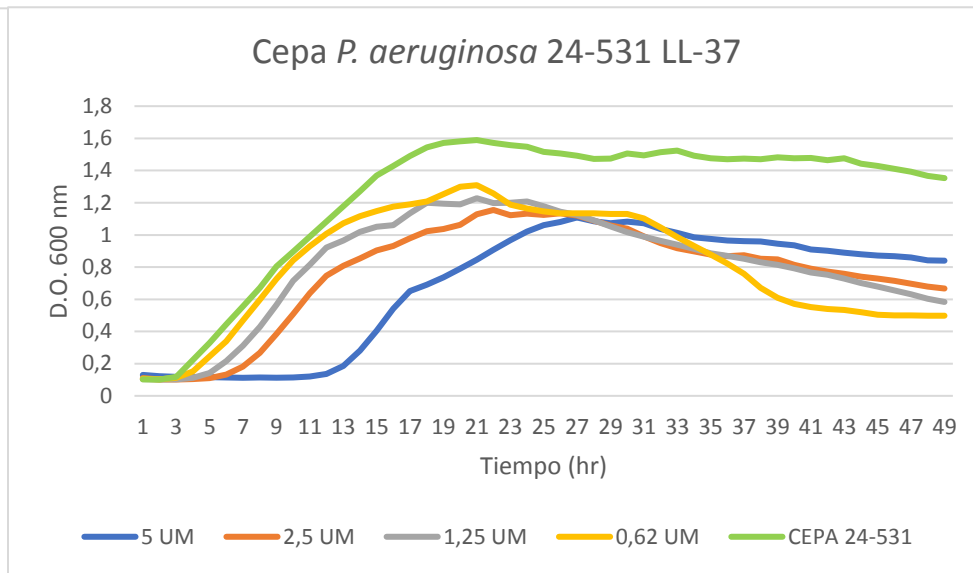


Figura 7. *P. aeruginosa* 24-539 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5. 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

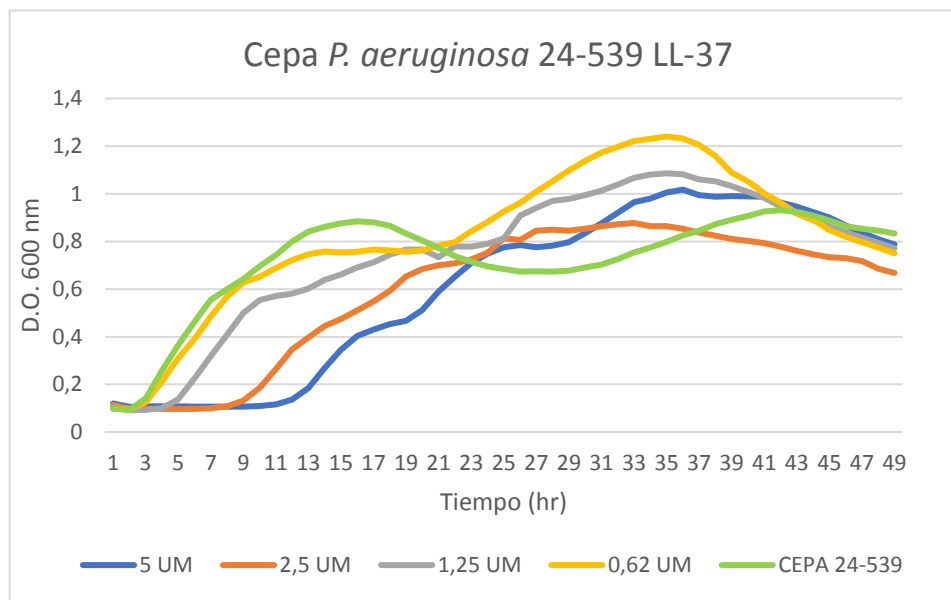


Figura 8. *P. aeruginosa* 24-550 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5. 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

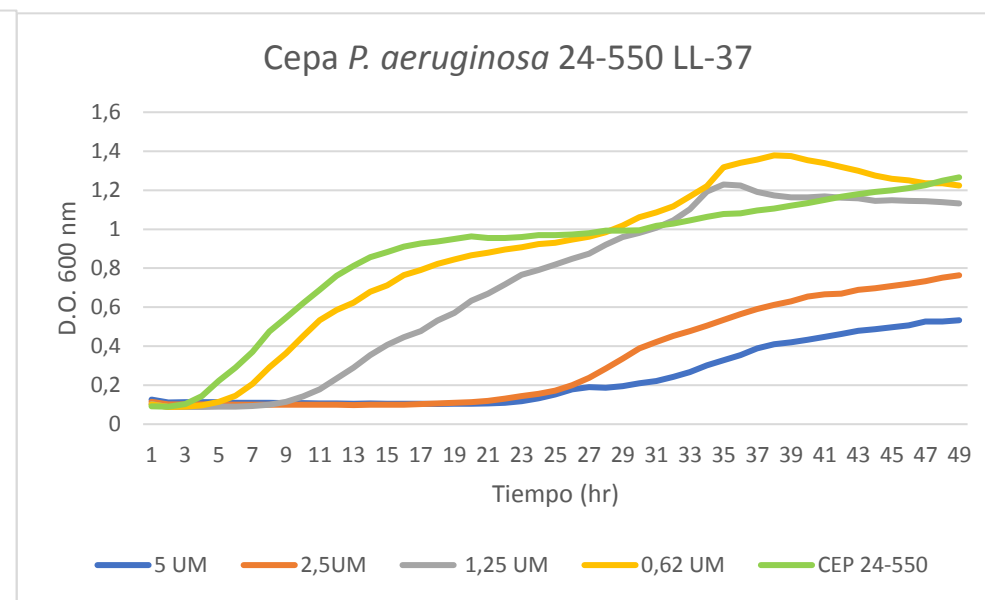


Figura 9. *P. aeruginosa* 24-533 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

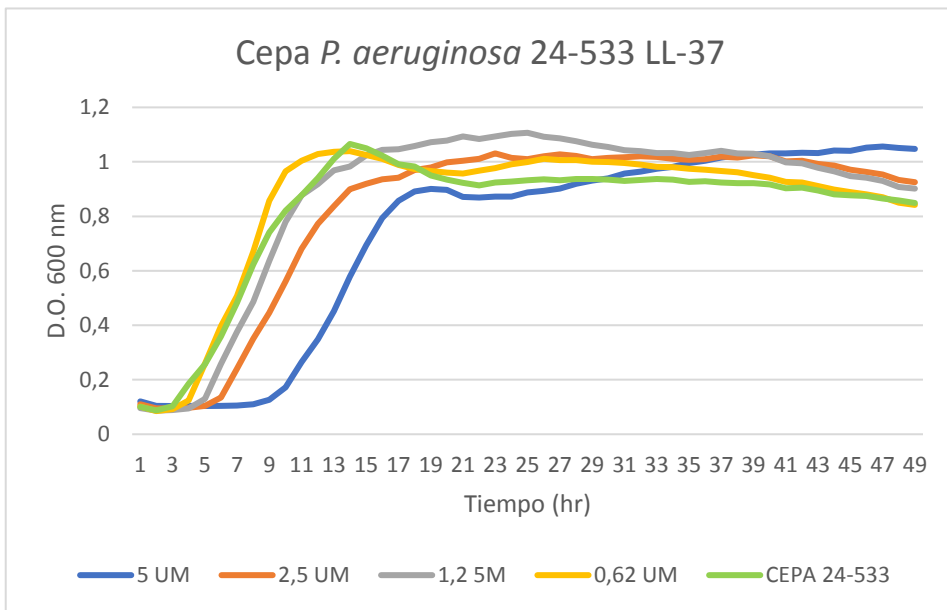


Figura 10. *P. aeruginosa* 24-536 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

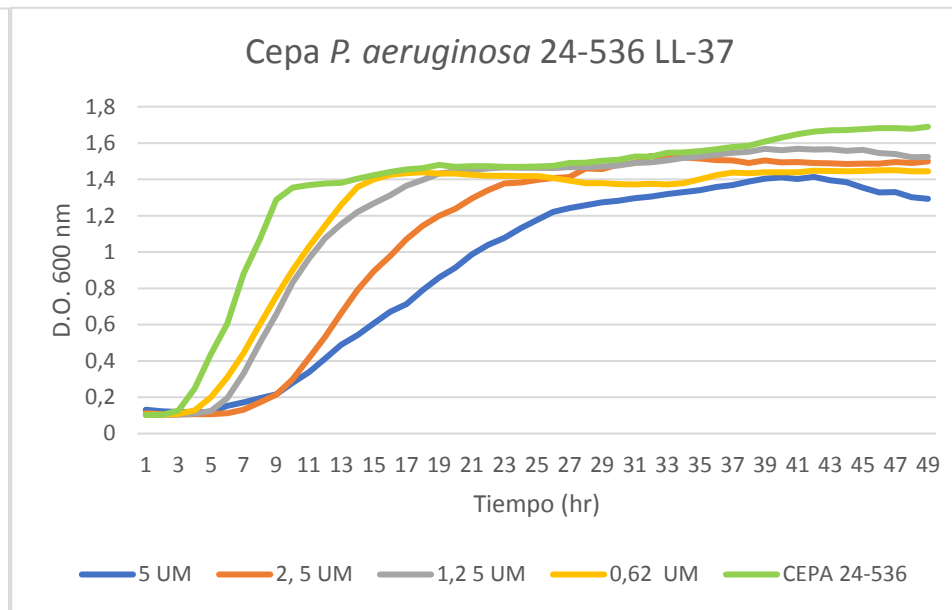


Figura 11. *E. coli* 24-493 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$

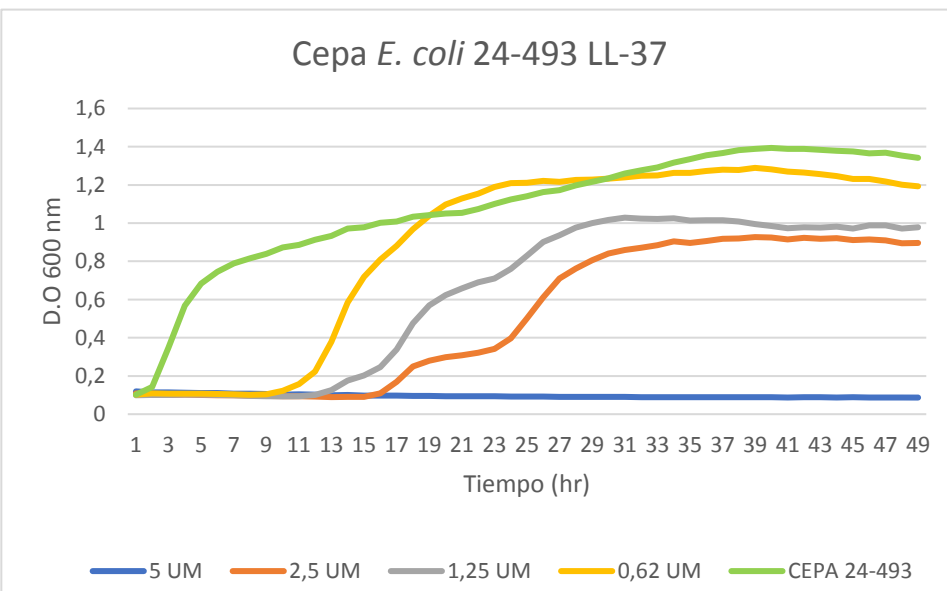
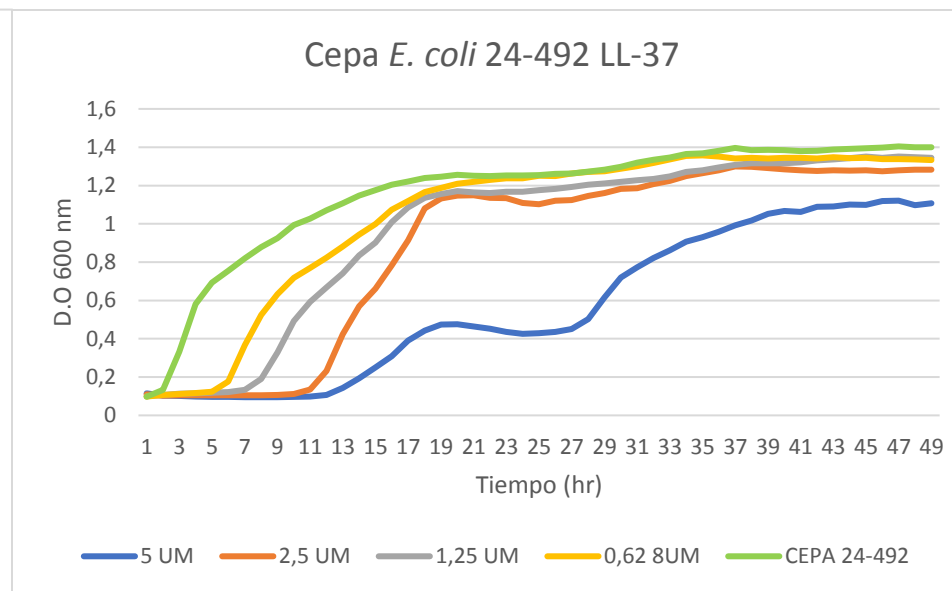


Figura 12. *E. coli* 24-492 LL-37 a concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu\text{M}$



ANEXO 4. Tablas de las tasas de inhibición con cada Uno de los péptidos

Tabla 1. Tasas de inhibición por parte de los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1 en cepas de *S. aureus*

Cepas <i>S. aureus</i>	Concentración (µM)	Péptido AC-LL37-1 (%)	Péptido D-LL37-1 (%)	Péptido LL37-1 (%)
ATCC USA 300	5	8,7	9,8	0,82
	2,5	7,3	8,8	7,6
	1,25	8,08	5,7	4,3
	0,62	4,7	5,1	0,08
Col 23	5	2,8	2,8	10,8
	2,5	3,9	3,08	3,1
	1,25	3,9	-0,5	-10,1
	0,62	3,7	-0,7	-5,4
Col 42	5	-15,0	12,9	-1,41
	2,5	-9,4	1,2	20,7
	1,25	2,02	-0,2	19,1
	0,62	-4,6	-2,9	16,2
Col 77	5	4,2	0,6	22,4
	2,5	9,9	0,9	22,8
	1,25	17,8	-22,7	19,4
	0,62	10,5	-18,9	14,6
Col 81	5	-6,4	-22,8	27,6
	2,5	20,8	-18,3	-13,6
	1,25	-1,2	-39,9	14,6
	0,62	-0,8	-41,1	0,25
Col 86	5	-2,9	-9,8	10,6
	2,5	4,9	-9,8	3,5
	1,25	1,1	-16,3	10,4
	0,62	0,5	-10,2	2,05
Col 111	5	-0,11	-6,9	-1,5
	2,5	-3,02	-5,5	0,90
	1,25	-1,8	-7,5	-0,68
	0,62	-2,9	-8,3	-5,8

Tabla 2. Tasas de inhibición por parte de los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1 en cepas de *S. epidermidis*

Cepas <i>S. epidermidis</i>	Concentración (µM)	Péptido AC-LL37-1 (%)	Péptido D-LL37-1 (%)	Péptido LL37-1 (%)
ATCC 35984	5	18,06	37,03	39,1
	2,5	15,1	20,3	28,9
	1,25	10,1	13,1	22,5
	0,62	13,5	12,5	28,1
ATCC12228	5	17,8	17,7	-2,4
	2,5	15,3	15,6	-48,3
	1,25	11,3	6,2	-53,1
	0,62	6,4	1,5	-63,6
22 epi 18	5	47,6	50,5	-136,8
	2,5	-8,04	10,7	-116,4
	1,25	4,8	28,2	37,5
	0,62	4,1	9,5	23,2
22 epi 39	5	3,3	87,4	-41,4
	2,5	5,0	85,5	-80,5
	1,25	-3,7	17,5	14,7
	0,62	0,7	16,2	-17,3
22 epi 45	5	4,6	86,5	-33,0
	2,5	-4,4	28,4	53,5
	1,25	-6,6	30,5	30,7
	0,62	-4,3	26,2	4,4
22 epi 57	5	-11,6	47,4	34,4
	2,5	-14,0	43,1	22,0
	1,25	-13,7	39,09	7,9
	0,62	-13,9	21,7	-46,1
22 epi 58	5	0,6	47,4	-60,4
	2,5	-5,08	44,1	-39,4
	1,25	-1,1	37,4	13,2
	0,62	-2,8	37,2	-25,9

Col 145	5 2,5 1,25 0,62	0,7 2,5 -6,0 -2,4	2,32 1,6 -4,1 0,09	-7,8 -8,42 55,2 37,8
Col 190	5 2,5 1,25 0,62	-1,9 -6,3 -2,7 -3,3	-1,3 -2,3 -2,4 -0,63	-63,2 -30,0 -49,3 -71,7
Col 207	5 2,5 1,25 0,62	7,2 9,6 3,7 3,7	7,2 5,01 0,50 -1,66	5,4 -9,5 -6,2 -17,1
Col 208	5 2,5 1,25 0,62	2,9 2,6 -15,6 -2,2	9,2 1,7 1,36 1,33	14,4 -2,4 -14,4 7,6
Col 227	5 2,5 1,25 0,62	3,2 0,68 -5,04 -2,4	4,4 3,8 -0,36 -0,46	12,4 4,7 0,27 -1,87
Col 252	5 2,5 1,25 0,62	-1,69 -1,47 0,16 -2,8	2,3 0,8 -1,7 -0,8	15,7 -3,08 5,3 -5,3
Col 318	5 2,5 1,25 0,62	2,2 -2,5 1,6 -4,5	0,06 -10,2 -10,5 -3,7	-16,1 -25,09 -20,5 -27,7
Col 478	5 2,5 1,25 0,62	-1,5 -7,02 -5,08 -6,8	-4,03 -5,9 -17,3 -0,94	-5,01 -11,9 -14,2 -16,8
5 Sau 205	5 2,5 1,25 0,62	-0,5 -1,8 -0,7 -9,2	4,9 -3,04 -4,9 -1,9	12,6 7,1 -1,1 -1,6

22 epi 60	5 2,5 1,25 0,62	-2,8 -2,2 -8,02 -1,5	55,2 25,2 24,06 21,7	-11,8 -20,4 3,1 -20,4
22 epi 61	5 2,5 1,25 0,62	-7,1 2,2 -7,8 -8,4	9,6 5,3 28,5 25,2	29,4 28,8 23,6 10,9
22 epi 71	5 2,5 1,25 0,62	-8,01 -4,1 -7,8 -0,03	40,6 15,3 13,7 6,1	58,7 37,1 56,7 51,4
22 epi 72	5 2,5 1,25 0,62	8,08 -3,2 5,1 -2,7	84,3 47,7 19,04 19,2	-17,3 -8,3 -23,3 53,8
22 epi 81	5 2,5 1,25 0,62	-11,6 -3,1 -7,4 -22,8	25,3 20,8 13,6 6,2	2,4 51,5 10,1 4,7
22 epi 82	5 2,5 1,25 0,62	-2,7 -1,4 -4,00 -0,1	29,3 17,7 15,4 12,6	-56,6 -26,9 -32,9 -54,1
22 epi 83	5 2,5 1,25 0,62	-6,9 -2,9 -6,5 -10,2	68,4 42,4 11,06 11,3	-6,2 -95,7 13,8 -8,9
22 epi 84	5 2,5 1,25 0,62	-0,3 -1,8 1,7 -1,1	45,1 36,05 33,4 20,3	60,9 -0,3 -31,2 -27,5
22 epi 91	5 2,5 1,25 0,62	-2,1 -1,4 -2,8 -0,8	0,9 11,9 10,8 -1,2	-205,8 -278,6 -275,8 -324,1
24-225	5 2,5 1,25 0,62	10,9 1,4 2,02 3,3	58,6 58,07 52,5 47,4	-120,2 -74,6 -110,2 23,7

Tabla 3. Tasas de inhibición por parte de los péptidos AC-LL37-1 y D-LL37-1 en cepas Gram negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa*

Cepas <i>E.coli</i>	Concentración (µM)	Péptido AC-LL37-1 (%)	Péptido D-LL37-1 (%)	Péptido LL-37 (%)
ATCC 35218 <i>E.coli</i>	5	18,06	37,03	39,1
	2,5	15,1	20,3	28,9
	1,25	10,1	13,1	22,5
	0,62	13,5	12,5	28,1
24-492	5	-3,9	2,03	64,3
	2,5	-3,5	1,2	11,07
	1,25	-2,0	0,01	11,7
	0,62	-3,08	-4,6	9,4
24-493	5	-0,7	41,02	100
	2,5	-18,1	36,2	65,3
	1,25	-15,5	-28,02	19,2
	0,62	-18,3	-26,8	-55,7

Cepas <i>P. aeruginosa</i>	Concentración (µM)	Péptido AC-LL37-1 (%)	Péptido D-LL37-1 %	Péptido LL-37 %
ATCC 278523 <i>P. aeruginosa</i>	5	12,7	20,7	100
	2,5	3,0	27,3	20,07
	1,25	20,7	23,4	7,7
	0,62	4,3	14,8	-6,7
24-590	5	17,3	4,0	15,6
	2,5	-4,4	-1,2	11,7
	1,25	-8,6	3,9	-0,6
	0,62	-6,0	1,5	0,5
24-550	5	18,7	28,2	79,4
	2,5	13,2	34,8	24,1
	1,25	7,8	26,1	13,2
	0,62	2,1	-0,1	3,8
24-533	5	19,07	33,9	14,2
	2,5	13,8	8,5	7,4
	1,25	7,7	2,6	0,6
	0,62	1,4	2,8	0,1
24-531	5	31,6	50,3	41,5
	2,5	3,07	24,7	32,1
	1,25	6,02	11,4	28,2
	0,62	0,5	-2,9	16,8
24-541	5	2,02	9,3	16,6
	2,5	0,6	4,4	-2,08
	1,25	2,4	3,7	-2,4
	0,62	-4,06	1,3	-4,1
24-539	5	51,1	49,08	52,2
	2,5	19,4	6,7	32,2
	1,25	13,7	-0,2	20,8
	0,62	-3,6	-6,6	16,6
24-532	5	14,3	18,5	41,8
	2,5	-3,1	32,4	11,7
	1,25	-2,09	6,02	5,07
	0,62	-2,2	-1,2	-1,02
24-536	5	20,8	21,09	8,7
	2,5	0,98	-1,5	-1,1
	1,25	-2,07	-10,1	-3,9
	0,62	-6,4	-11,7	-8,2

ANEXO 5. Actividad antibiopelícula con el método Cristal violeta

Tabla 1. Datos % Tasas de Inhibición en bacterias Gram negativas con los diferentes péptidos

Cepas bacterias Gram negativas	Cristal violeta 6 horas con péptido LL-37 con concentración 5 $\mu$ M (%)	Cristal violeta 12 horas con péptido LL-37 con concentración 5 $\mu$ M (%)	Cristal Violeta Péptido AC-LL37-1 a las 12 horas con concentración 5 $\mu$ M (%)	Cristal Violeta Péptido D-LL37-1 a las 12 horas con concentración 5 $\mu$ M (%)
<i>E.coli</i> 24-492	18,8915419	44,18267074	47,9364591	-691,87521
<i>E.coli</i> 24-493	0,0524098	7,62331936	25,1781465	-1084,92671
<i>P. aeruginosa</i> 590	41,1433653	66,42120452	-51,7108293	-396,442648
<i>P. aeruginosa</i> 550	-94,3032442	-64,81787761	65,6764424	61,8946327
<i>P. aeruginosa</i> 533	16,0639185	23,51243477	-43,9065116	-21,3162941
<i>P. aeruginosa</i> 539	-70,8364470	71,94363793	27,7291798	-129,958868
<i>P. aeruginosa</i> 541	-23,4787270	34,16377652	54,7156812	-22,7342983
<i>P. aeruginosa</i> 532	15,0333492	-292,739137	33,223868	73,4502035
<i>P. aeruginosa</i> 531	-1,2791565	70,53883846	-93,3132984	-102,96024
<i>P. aeruginosa</i> 536	35,5375851	-198,0920291	-216,969962	-546,411789
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	36,3972289	97,15370007	83,2838102	26,0150273