



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA SECUENCIA RRWQWR DE LACTOFERRICINA BOVINA

Derly Yesenia Grueso Mariaca

Trabajo de investigación para optar al Título de Bacteriólogo y Laboratorista
Clínico

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá
2019



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA SECUENCIA RRWQWR DE LACTOFERRICINA BOVINA

Derly Yesenia Grueso Mariaca

Trabajo de investigación para optar al Título de Bacteriólogo y Laboratorista
Clínico

Asesor Interno

MSc. Sandra Mónica Estupiñán Torres
Facultad Ciencias De La Salud

Asesor Externo

Ph.D. Javier Eduardo García Castañeda
Universidad Nacional de Colombia

Co-Asesor Externo

MSc. Yerly Vargas Casanova
Universidad Nacional de Colombia

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá

2019

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1. Péptidos Antimicrobianos	24
4.1.1. Definición	24
4.1.2. Actividad antimicrobiana.....	24
4.2. Generalidades de la Lactoferrina Bovina.....	25
4.3. Generalidades de la Lactoferricina Bovina.....	27
4.3.1. Estructura y propiedades de la Lactoferricina Bovina	27
4.3.2. Función biológica	27
4.3.3. Dominio activo.....	28
4.3.4. Mecanismo de acción antibacteriano.....	28
4.4. Sustituciones de aminoácidos en PAMs.....	29
4.4.1. Sustituciones de Arg por Lys en PAMs	29
4.4.2. Sustituciones de Arg por Lys en péptidos derivados de LFB	30
4.5. Características biológicas de <i>Escherichia coli</i>	30
4.5.1. Patogenia.....	30
4.5.2. Tratamiento	31
4.4.3. <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	31
4.6. Características biológicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
4.6.1. Patogenia.....	32
4.6.2. Tratamiento	33
4.6.3. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	33
4.7. Características biológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.7.1. Patogenia.....	34
4.7.2. Tratamiento	34
4.7.3. <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	35

5. DISEÑO METODOLÓGICO	36
5.1. Población	36
5.1.2. Muestra	36
5.2. Hipótesis	36
5.2.1. Variables	36
5.3. Materiales	36
5.3.1. Cepas bacterianas.....	37
5.3.2. Péptidos derivados de LfcinB.....	37
5.4. Técnicas y Procedimientos.....	38
Figura 2. Esquema de las tres etapas realizadas en el trabajo	38
5.4.2. Obtención de péptidos derivados de Lactoferricina Bovina.....	39
5.4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	39
5.4.4. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida.....	40
5.4.5. Actividad Hemolítica	41
5.4.6. Curvas de letalidad-muerte	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
6.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida	44
6.2. Actividad Hemolítica	52
6.3. Curvas de Letalidad.....	56
7. CONCLUSIONES	62
8. RECOMENDACIÓN	63
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
10. ANEXOS	75

Índice Tablas

Tabla 1. Fases clínicas de prueba de Talactoferrina de <i>Agennix</i> para su aplicación terapéutica	22
Tabla 2. Productos comerciales derivados de LFB con aprobación pendiente de la FDA	22
Tabla 3. Productos comercializados en el mercado y aprobados por la FDA	23
Tabla 4. Características de <i>E. coli</i> ATCC	29
Tabla 5. Características de <i>P. aeruginosa</i> ATCC	30
Tabla 6. Características de <i>S. aureus</i> ATCC	32
Tabla 7. Péptidos sintéticos derivados de LfcinB evaluados	34
Tabla 8. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra <i>E. coli</i> ATCC 25922	39
Tabla 9. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	41
Tabla 10. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923	42
Tabla 11. Péptidos con Lys, que presentaron la mayor actividad antibacteriana, según la cepa ATCC estudiada	45
Tabla 12. Resumen de la cinética de muerte de los péptidos evaluados contra las cepas ATCC	53

Índice Figuras

Figura 1. Estructura de LfcinB	24
Figura 2. Esquema de las tres etapas realizadas en el trabajo	35
Figura 3. Distribución de la caja multipozos para hallar la CMI	37
Figura 4. Rotulación de la caja de Petri para hallar la CMB en agar MH	37
Figura 5. CMB de LfcinB (20 – 25) para <i>E. coli</i> 25922	40
Figura 6. CMB de ^(R->) LfcinB (20 – 25) para <i>E. coli</i> 25922	40
Figura 7. CMB de LfcinB (20 – 25) ₂ para <i>P. aeruginosa</i> 27923	42
Figura 8. CMB de ^(R->) LfcinB (20 – 25) ₂ para <i>P. aeruginosa</i> 27923	42
Figura 9. CMB de LfcinB (20 – 25) ₄ para <i>S. aureus</i> 25923	43
Figura 10. CMB de ^(R->) LfcinB (20 – 25) ₄ para <i>S. aureus</i> 25923	43

Índice Gráficas

Gráfica 1. Comparación de la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25) y ^(R->K) LfcinB (20-25)	46
Gráfica 2. Comparación de la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25) ₂ y ^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	47
Gráfica 3. Comparación de la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25) ₄ y ^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	48
Gráfica 4. Comparación la actividad hemolítica entre LfcinB (21-25) _{pal} y ^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	48
Gráfica 5. Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de <i>E.coli</i> 25922	51
Gráfica 6. Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de <i>P.aeruginosa</i> 27853	52
Gráfica 7. Tetrámero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de <i>S.aureus</i> 25923	53

*“El camino del progreso no es ni rápido
ni fácil.”*

- Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta este punto, es el resultado de muchos años de esfuerzos, sacrificios y dedicación; cada lágrima de tristeza y alegría valió la pena. Fue un proceso largo que hoy se culmina de la mejor manera, agradeciendo.

Agradeciendo a la vida y principalmente a Dios por ponerme en donde estoy; por cada obstáculo que me hizo cada vez más fuerte y más valiente, cada caída que me hacía luchar aún más por mis sueños.

Este gran logro, uno de los muchos que espero alcanzar, está dedicado especialmente a mi papá, el hombre que me enseñó a ser feliz y me forjó con carácter para afrontar todas las situaciones de la vida. Desde el cielo ha estado acompañándome siempre, después de su partida. Esto es por y para ti papá, no sé qué sería de mí, si no me hubieses dejado tu sabiduría, tus consejos, tu amor, tu bondad y tu paciencia. Te amo infinitamente.

A mi mamá, quién ha estado conmigo siempre, incondicionalmente, apoyándome, guiándome, también le agradezco inmensamente. Gracias por amarme tal y como soy, por siempre darme una palabra de aliento en los momentos más difíciles, no me alcanzan las palabras para expresarte lo mucho que te amo. A mi hermano, la persona más valiente que conozco, gracias por cada consejo de vida, por estar siempre para mí, por enseñarme el significado del esfuerzo y de los sacrificios, te amo con mi vida. A toda mi familia, en especial a mi prima Geithnester, que con su partida me enseñó el verdadero valor de la vida, y de la familia.

Es de gran importancia agradecer con un cariño especial a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mi institución durante 5 años, y al programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, por formar profesionales de calidad académica y humana; por ser una universidad que da la oportunidad a muchos estudiantes de soñar y poder ser profesionales.

También agradezco a mi asesor externo de tesis, el profesor Javier García y la profesora Zuly Rivera, por brindarme esta gran oportunidad de trabajar con ellos, y de pertenecer al grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional; por la dedicación, el tiempo y el empeño que le pusieron a este trabajo, gracias profes.

A la profesora Sandra Mónica Estupiñán, quien además de ser mi asesora interna, primero fue mi docente, y por quién aprendí a amar la Microbiología; gracias por las asesorías y por la dedicación siempre.

A mi coasesora externa de tesis, Yerly Vargas, gracias por la paciencia, la disposición, el esfuerzo y la dedicación para siempre enseñarme y guiarme de la mejor manera; sin ella, esto no hubiese sido posible.

A Héctor Pineda, que me asesoró y siempre estuvo dispuesto a ayudarme, y a brindarme su apoyo.

Al personal del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, por su servicio y calidad humana.

A mi gran amiga Katherine Hernández, que siempre fue incondicional y estuvo para mí. Vivimos toda esta experiencia juntas, y por tu gran corazón considero que tu amistad es la más valiosa que me deja la universidad.

A todos los que estuvieron conmigo durante este proceso, e hicieron parte de esta gran experiencia, de todo corazón, gracias; ustedes ayudaron en mi formación como persona y como profesional.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA SECUENCIA RRWQWR DE LACTOFERRICINA BOVINA

RESUMEN

La resistencia antibacteriana es un problema de salud pública y como posible solución, se han estudiado los péptidos antimicrobianos (PAMs) ya que estos, generan menos resistencia que los antibióticos convencionales. La Lactoferricina Bovina (LfcinB) es un PAM que ha demostrado tener gran actividad contra bacterias como: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, microorganismos que presentan altas tasas de resistencia frente a tratamientos convencionales, según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y hemolítica de péptidos monoméricos y polivalentes derivados de la LfcinB y sus análogos con sustituciones de Arg por Lys, contra cepas bacterianas ATCC, mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB), Curvas de Letalidad y porcentaje de hemólisis. Los péptidos con Lys que exhibieron mayor actividad antibacteriana fueron: el dímero (KKWQWK)₂K-Ahx contra *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 24 y 48 µM, respectivamente), y el tetrámero (KKWQWK)₄K₂-Ahx₂-C₂ contra *S. aureus* ATCC 25923 (MIC 47 µM). Para la cinética de muerte a las 48 horas, el péptido (KKWQWK)₂K-Ahx presentó efecto bacteriostático contra a *E. coli* ATCC 25922 y bactericida contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 y el péptido (KKWQWK)₄K₂-Ahx₂-C₂, efecto bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923. Adicionalmente, se evidenció una disminución de la actividad hemolítica de los péptidos con Lys, de 2 a 7 veces comparados con los péptidos originales. Estos resultados indican que el cambio de Arg por Lys en péptidos derivados de LfcinB puede ser una estrategia para obtener moléculas promisorias a menores costos.

Palabras claves: Lactoferricina, sustituciones, Arginina, Lisina, actividad antibacteriana.

1. INTRODUCCIÓN

Según la OMS, la farmacorresistencia, se genera cuando los microorganismos (bacterias, parásitos, hongos y virus) sufren cambios o mutaciones, que hacen que los medicamentos que son empleados comúnmente para tratar las infecciones causados por estos, dejen de ser eficaces¹. Cuando se habla específicamente de la Resistencia Antibacteriana (RA), se hace referencia al fenómeno que sufren las bacterias, cuando dejan de ser afectadas por los antibióticos para los que anteriormente eran sensibles, situación que ha crecido rápidamente en los últimos años²; en este escenario, la RA se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial³.

En el año 2017, la OMS, publicó “una lista de las bacterias para las que se necesitaban urgentemente nuevos antibióticos”³; la lista divide a las bacterias en tres categorías según la urgencia con la que se requieren los nuevos fármacos: prioridad crítica, elevada y media.³ Las bacterias que encabezan el grupo de prioridad crítica son *Acinetobacter*, ***Pseudomonas*** y varias enterobacterias (***Escherichia coli***, *Serratia spp*, *Klebsiella spp*); dentro de las bacterias de prioridad elevada se encuentran ***Staphylococcus aureus*** y *Enterococcus faecium*, y en prioridad media se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp*³.

Con el fin de recopilar información epidemiológica sobre la RA y así poder controlarla, la OMS creó el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS), en donde participan 22 países. GLASS reportó que, *E. coli* ha presentado resistencia a la ciprofloxacina entre un 8% y 65%⁴; en lo que respecta a *S. aureus*, informa que los pacientes que presentan infecciones causadas por SARM (*S. aureus* Meticilino Resistente), tienen una probabilidad de mortalidad del 64%, comparado con los pacientes que presentan infecciones no resistentes⁵. También afirma que, *P. aeruginosa* ha presentado alta resistencia a los carbapenémicos³. Debido a que *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* son

microorganismos que encabezan la lista de prioridad crítica y elevada descrita por la OMS, se eligieron para ser evaluadas en este proyecto de investigación.

S. aureus, *E. coli* y *P. aeruginosa* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, las infecciones generadas por estas bacterias se asocian principalmente al ambiente hospitalario⁶; llegando a causar desde una diarrea hasta una meningitis en el caso de *E. coli*, una bacteriemia o infecciones de piel en el caso de *S. aureus*, e incluso una neumonía o infecciones del tracto urinario en el caso de *P. aeruginosa*⁷. La patogénesis de estos microorganismos se debe principalmente a aspectos como: mínimos requerimientos nutricionales, factores de virulencia, resistencia intrínseca contra un gran número de antibióticos y tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas⁷.

Esta situación hace que se preste mayor atención al uso inadecuado de los antibióticos convencionales y lleva a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, entre estas, se ha considerado el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs), moléculas que han marcado trascendencia en los últimos 25 años debido a que presentan diversas funciones biológicas como: actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, antitrombótica, antitumoral, entre otras⁸⁻⁹. Adicionalmente, los PAMs como fármacos presentan ventajas como: (i) múltiples mecanismos de acción, (ii) amplio espectro de actividad y (iii) bajo potencial de resistencia¹⁰. El diseño de nuevos fármacos implica tener en cuenta el costo de producción, la actividad antibacteriana, el sistema de obtención, la vía de administración, entre otros.

Un PAM ampliamente estudiado es la Lactoferricina Bovina (LfcinB), la cual proviene de una proteína llamada Lactoferrina Bovina (LFB) y ha presentado actividad antibacteriana contra bacterias Gram Positivas y Gram Negativas⁹. Varios autores han evaluado péptidos derivados de LfcinB, evidenciando que modificaciones en las secuencias pueden potenciar la actividad antibacteriana. En previos estudios se ha reportado que péptidos monoméricos, diméricos y tetraméricos derivados de la LfcinB han presentado alta actividad contra bacterias

Gram positivas y Gram negativas y son considerados como promisorios agentes terapéuticos, pero, se ha visto también que estos péptidos, presentan actividad hemolítica, lo cual, sería un problema al momento de ser administrados al ser humano. Por otro lado, estas moléculas contienen un número elevado de residuos de Arginina lo que los hace costosos de producir y dificultan su síntesis. Se ha visto en otros estudios que cambios de Arginina (R) por Lisina (K), pueden ayudar a mejorar las anteriores desventajas, por esta razón, en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923. y la actividad hemolítica de ocho péptidos derivados de LfcinB, incluyendo un monómero, dímero, tetrámero y palíndromo, ricos en R a los cuales se les realizó sustituciones por K.

2. ANTECEDENTES

Aunque previamente han habido investigaciones en las que se describieron otras funciones biológicas para los PAMs, sólo hasta la década de los años 80 fueron reconocidos como moléculas antimicrobianas¹¹. Uno de los primeros péptidos en ser evaluado frente a distintas cepas bacterianas (Gram negativas y Gram positivas) fue la Magainina, un PAM producido por anfibios, y que presenta alta actividad antibacteriana¹². Luego surgieron otros péptidos con actividad antimicrobiana, entre ellos se encuentran: las cecropinas, defensinas, catelicidinas, histatinas, lactoferrinas, entre otras¹².

Desde inicios de la década de los 90, se empezó a estudiar la Lactoferrina (LF); una glicoproteína que hace parte de la familia de las transferrinas (por su capacidad de quelar hierro)¹³ y que puede ser encontrada en la leche, saliva, secreciones vaginales, semen, entre otros. Dentro de sus funciones biológicas se encuentra la actividad antimicrobiana, presentando actividad antibacteriana contra *E. coli*, *L. pneumophila*, *V. cholerae*, *S. mutans*, y otras bacterias^{13,14}.

LFB está involucrada en la prevención de diarrea en niños menores de 5 años, debido a que es “la segunda proteína más abundante en la leche materna, encontrándose en una concentración de 10 mg/mL en el calostro humano y 1 mg/mL en la leche madura”¹². Teniendo en cuenta esto, Coveñas et al¹⁵ analizó los efectos de la LFB contra aislados clínicos bacterianos de *E. coli*, en donde las muestras eran provenientes de niños con diarrea, y se obtuvo “que las cepas expuestas a LFB disminuyeron la formación de biofilm incluso a bajas concentraciones (0,01 mg/mL) al igual que el estudio realizado en cepas prototipos de *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)”¹⁵.

A la LF se le han atribuido varios mecanismos de acción, en primer lugar, la capacidad de quelar el hierro, que impide que las bacterias adquieran este nutriente esencial para su metabolismo y, en segundo lugar, la unión a las porinas y al lípido A del polisacárido de las bacterias Gram negativas, ocasionando así la

permeabilidad de la membrana¹⁴. Adicionalmente, autores sugieren que LF estaría cumpliendo una función precursora, ya que los dominios activos para la LFB y LF Humana (LFH) son la LfcinB (FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFA) y la Lfcin Humana (LfcinH), respectivamente; estas secuencias se derivan de la región N-terminal de la proteína de origen⁹.

Aguilera, et al¹⁶ menciona que LfcinB y LfcinH, provienen de la digestión ácido-pepsina de LFB y LFH y que estas moléculas, presentan una mayor actividad antibacteriana contra una gran variedad de microorganismos, con respecto a la actividad de la LF nativa; y adicionalmente se ha visto que LfcinB tiene mayor actividad antibacteriana que LfcinH¹⁶.

Bellamy, et al⁹ evaluó la actividad antibacteriana de LfcinB contra 31 cepas ATCC de especies bacterianas (algunas de ellas son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris*, entre otras) y observó que “LfcinB causó una pérdida detectable de capacidad de formación de colonias en la mayoría de las cepas examinadas. En algunos casos, más del 99.9% de las células fueron eliminadas dentro de los 60 min de exposición”⁹.

Estudios previos sobre el mecanismo de acción de la LfcinB y otros péptidos derivados, mostraron la capacidad de estos para unirse a lipopolisacáridos de *E. coli*, seguido de daños y alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias¹⁶. A pesar de lo anteriormente dicho, el mecanismo de acción antibacteriano de la LfcinB y péptidos derivados aún no está totalmente claro¹⁶.

Existen varias razones que han limitado hasta ahora la implementación clínica de los PAMs, algunas de ellas son: i) alta susceptibilidad a la degradación por proteasas endógenas y microbianas, ii) toxicidad debido a la alta concentración necesaria para inhibir las bacterias y iii) vida media corta debido a la alta unión a proteínas¹⁷.

Debido a lo anterior, investigadores han realizado modificaciones en las secuencias peptídicas, con el objetivo de encontrar péptidos cortos que superen esas desventajas mencionadas anteriormente, por ejemplo, Mishra, *et al*¹⁸ encontraron que, los péptidos en los que predomina el Trp o la Pro, pueden actuar frente a los microorganismos, mediante el ataque a blancos intracelulares y de esta manera logran ser menos tóxicos para las células sanas.

Se han reportado ciertas modificaciones en PAMs, con la finalidad de obtener una versión proteolíticamente resistente de estos; esto sucede principalmente, por el uso de D-aminoácidos y de variaciones en la secuencia; debido a lo anterior, se ha visto que, “el diseño de la cadena peptídica, particularmente mediante la introducción de múltiples puntos de ramificación para obtener PAMs dendrímeros sintéticos (PAMDs), parece una solución prometedora para superar los problemas antes mencionados”¹⁷.

En vista que las modificaciones pueden potenciar la actividad de los péptidos, el grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional, ha evaluado péptidos derivados de LfcinB, con diferentes modificaciones. León, *et al*¹⁹ evaluaron la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB con diferentes modificaciones, como: presencia de aminoácidos naturales, reducción o elongación de la secuencia, repetición del motivo mínimo, entre otros, y encontraron que péptidos más cortos que LfcinB, como un palíndromo y un tetrámero, presentaron la mayor actividad contra cepas ATCC de *E. coli* y *E. faecalis* que la LfcinB y la LFB, por lo tanto se comprobó que “es posible diseñar y obtener péptidos sintéticos que exhiben actividad antibacteriana mejorada utilizando una metodología que es rápida y que permite obtener productos con un alto grado de pureza y alto rendimiento”¹⁹.

Posteriormente, Huertas, *et al*²⁰ evidenciaron que: i) péptidos monoméricos y polivalentes que contienen el motivo mínimo RRWQWR presentaron actividad antibacteriana contra *S. enteritidis* ATCC 13076 y *E. coli* ATCC 11775; ii) La

proteína LFB no mostró actividad antibacteriana ya que presentó valores CMI/CMB de $>200 \mu\text{g/mL}$ iii) el péptido dimérico mostró actividad frente a *S. maltophilia* ATCC 13636, con valores de CMI/CMB de $50 \mu\text{g/mL}$. Este estudio demuestra que la polivalencia es una estrategia para potenciar la actividad de los péptidos, ya que como se observó, los péptidos derivados del motivo mínimo de LfcinB, exhiben alta actividad antibacteriana, incluso mayor que LfcinB y LFB.

Vargas et al²¹ reportó que, los péptidos dímero y tetramero, LfcinB (20–25)₂ y LfcinB (20–25)₄ exhibieron mayor actividad antibacteriana contra 3 cepas ATCC de *E. coli* estudiadas, al compararlos con la actividad del motivo mínimo; de esta forma, presentaron un rango de CMI de 5 a $22 \mu\text{M}$. Además de esto, LfcinB (20–25)₄ presentó también actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* con valores de CMI de 11 y $22 \mu\text{M}$, respectivamente. Por otro lado, cabe resaltar que LfcinB (21–25)_{pal} presentó mayor actividad antibacteriana, especialmente contra las cepas ATCC de *E. coli* evaluadas en un rango de 17 a $67 \mu\text{M}$, adicional a esto, LfcinB (20–25)₂ y LfcinB (21–25)_{pal}, no exhibieron alto efecto hemolítico (~5%) a las concentraciones evaluadas a diferencia de LfcinB (20–25)₄ (~22%), los resultados indican que estos péptidos son promisorios para el desarrollo terapéutico, pero se necesitan estrategias para su administración.

Se ha podido evidenciar que la posición de los residuos básicos en la secuencia afecta la actividad antimicrobiana de los PAMs. Aquellos que son ricos en Prolina, se caracterizan por interactuar con el ribosoma 70S e inhibir la síntesis de proteínas; además de ello inducen a un plegamiento incorrecto de proteínas. En cuanto a los PAMs ricos en Triptófano, pueden atravesar las membranas bacterianas sin afectar la integridad de la misma y también actúan a través de dianas intracelulares¹⁸.

Los residuos de aminoácidos son de gran importancia en cuanto al desempeño que tienen los péptidos contra las bacterias, ya que algunas modificaciones de aminoácidos generan variaciones en la actividad, por ejemplo, Arias, et al²² afirma

que las sustituciones realizadas de Arginina (Arg) por Lisina (Lys) podrían potenciar la actividad antibacteriana, los residuos básicos, cargados positivamente, juegan un papel importante en la interacción electrostática con moléculas cargadas negativamente de las membranas bacterianas²².

En el estudio de Arias, *et al*²² analizó la permeabilidad de la membrana citoplasmática de *E. coli*, de péptidos con residuos cargados positivamente, como Arg y Lys; los resultados sugieren, que estas sustituciones, podrían mejorar la actividad de los PAMs; además de ello, se ha visto que al momento de la síntesis de los péptidos usando residuos de Lys, se reducen los costos²³.

Sung, *et al*²⁴ diseñaron, sintetizaron y evaluaron los péptidos: tritripticina y SYM11 que contenían Arg y sus homólogos TRK y SYM11KK, que contenían Lys, obteniendo que los péptidos con sustituciones por Lys presentaron actividad antibacteriana casi dos veces mayor que los que tenían Arg y adicionalmente no mostraron actividad hemolítica²⁴.

Chen, *et al*²⁵ evaluó péptidos ricos en residuos básicos, derivados de LfcinB de la secuencia 20 a 29. Estos residuos básicos se modificaron con Arg, Trp, Lys, Ile y Phe y se evaluaron frente *E. coli* ATCC 25922, un aislado de *E. coli* (resistente a gentamicina, ampicilina, kanamicina, estreptomicina, azitromicina, entre otros), *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212. El péptido LFB-KW (KKWWWKKKKKW) presentó la mayor actividad contra las cepas de *E. coli* (*E. coli* 25922 CMI y CMB: 7,2 µM; aislado de *E. coli* CMI y CMB: 4,8 µM), en comparación con el péptido LFB-RW (RRWWWRWRRW) (*E. coli* 25922 CMI 8,8 µM y CMB: 13,1 µM; aislado de *E. coli* CMI 3,3 µM y CMB: 13,1 µM)²⁵.

Como se puede observar, los cambios de estos aminoácidos son una estrategia prometedora para potenciar la actividad de los PAMs y disminuir la actividad hemolítica, reduciendo costos, por lo tanto, en este proyecto se planteó evaluar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB, a los cuales se les realizó sustituciones de Arg por Lys. Esto se realizó con el fin corroborar si para

secuencias derivadas del motivo mínimo de LfcinB se puede modificar la actividad antibacteriana y hemolítica, al realizar estas sustituciones, minimizando costos durante el proceso de síntesis, ya que, el precio de la Arg es tres veces mayor, que el precio de la Lys; además, la Arg necesita más ciclos de acople que la Lys para ser introducido en la cadena peptídica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB(20-25) que presentan sustituciones de Arginina por Lisina, contra las cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los péptidos sintéticos contra las cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Calcular la actividad hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de LfcinB.
- Realizar la curva de letalidad para el péptido análogo que presente mayor actividad antibacteriana y menor actividad hemolítica contra las cepas ATCC mencionadas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Péptidos Antimicrobianos

4.1.1. Definición

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas de bajo peso molecular, que están compuestas por alrededor de 10 a 100 aminoácidos²⁶; estos péptidos generalmente contienen residuos hidrófobos como el Triptófano y aminoácidos básicos, como la Arginina, estos últimos se encargan de conferirle la carga positiva a la molécula²⁷. Los PAMs se pueden clasificar teniendo en cuenta la estructura²⁸. Según la estructura secundaria se clasifican principalmente en: hojas β y las hélices α . De este mismo modo, hay otros péptidos que pueden estar constituidos por formaciones cíclicas, vueltas o random coil¹².

Los PAMs componen el sistema inmune de la mayoría de organismos vivos como bacterias, plantas, insectos y vertebrados¹²; en los invertebrados, es la principal defensa del sistema inmune innato, y en los vertebrados tienen un papel importante en la “modulación del sistema inmune adaptativo en la defensa ante los patógenos”¹². Se pueden expresar de forma constitutiva, cuando se encuentran almacenados como precursores inactivos en los gránulos de las células, o por estímulos¹⁰ y se han logrado aislar y caracterizar con técnicas como: inmuno-métodos químicos, Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), análisis de aminoácidos y Espectrometría de Masas (MS); también se pueden sintetizar a través de la SPPS (Síntesis de Péptidos en Fase Sólida)¹¹.

4.1.2. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los PAMs es atribuida a cuatro aspectos principalmente: carga neta (generalmente catiónica), composición de aminoácidos (residuos catiónicos e hidrófobos), anfipaticidad y tamaño (hasta 100 aminoácidos). Estas características son las que promueven la interacción del péptido con las bicapas lipídicas que forman las membranas citoplasmáticas de

ciertos patógenos (bacterias, virus envueltos, parásitos y hongos), en las cuales, se ha visto formación de poros por acción de los PAMs²⁹.

4.2. Generalidades de la Lactoferrina Bovina

La Lactoferrina Bovina (LFB) es la proteína de la cual proviene la LfcinB; LFB es derivada de la leche y posee múltiples propiedades biológicas, tales como: regulación homeostática, actividad antimicrobiana, modulación de la respuesta inmune, entre otras⁹. En la actualidad hay múltiples estudios basados en LFB y péptidos derivados que se encuentran en fase preclínica y clínica, por ejemplo: (i) Talactoferrina, la cual está en fase clínica (Tabla 1), (ii) Productos comerciales con aprobación pendiente de la FDA (Food and Drug Administration); LFB se usa como ingrediente o componente principal, para estos medicamentos, en E.E.U.U y en algunos países de Europa (Tabla 2)³⁰ y (iii) la Lactoferrin Gold 1.8[®] y Apolactoferrina que ya están comercializados en el mercado (Tabla 3)^{31,32}.

Tabla 1. Fases clínicas de prueba de Talactoferrina de *Agennix* para su aplicación terapéutica³⁰

Talactoferrina	Aplicación	Fase actual
Oral	Carcinoma renal	Fase II resultados
	Sepsis	Fase II preparación
	Otros tipos de cáncer	Fase I resultados
Tópica	Úlceras de pie diabético	Fase II resultados
	Úlcera venosas , varices	Fase I

Fase I: Fase inicial, prueba del producto en individuos sanos para estimar la dosis óptima, inocuidad y efectos colaterales; **Fase II:** Se prueba en pacientes para estimar seguridad, eficacia y dosis óptima para tratamiento

Tabla 2. Productos comerciales derivados de LFB con aprobación pendiente de la FDA³⁰

Producto	Efecto	Aplicación	Compañía
Crema dental	Antimicrobiano, anti-inflamatorio.	Higiene dental, gingivitis, periodontitis	Immunotec USA www.immunotech.com

Crema, enjuague e hilo dental, goma de mascar	Antimicrobiano, anti-inflamatorio.	Gingivitis, inflamación, boca seca	Biotene USA fuente: www.drugstore.com
BioTears Gel Caps con bLf	Antimicrobiano	Resequedad ocular crónica severa	NaturalEyeCare USA www.naturaleyecare.com
Lactoferrin cápsulas	Antimicrobiano, anti-oxidante, anti-anémico	Como nutracéutico, favorece absorción de hierro	Jarrow Formulas USA www.evitamins.com
Lacromin (rhLf)	Promotor del crecimiento celular	Cultivos in vitro de líneas celulares	Ventria Bioscience www.ventria.com
Praventin, bebida preparada con péptidos bioactivos y bLf	Antimicrobiano, anti-oxidante, anti-inflamatorio	Ayuda a reparar daño tisular en piel	DMV Países Bajos www.dmv-international.com

Tabla 3. Productos comercializados en el mercado y aprobados por la FDA^{31,32}

Producto	Aplicación	Laboratorio
Lactoferrin Gold 1.8	Alternativa para digerir productos lácteos con alto contenido de grasa	bioQuad
Lactoferrin (Apolactoferrin)	Suplemento que estimula el sistema inmunológico; promueve crecimiento de flora bacteriana	LifeExtension

positivas y Gram negativas, con respecto a las Lfcin provenientes de otras especies³⁵; el mecanismo de acción antibacteriano se explicará más adelante. Además de ello, en varios estudios, se ha visto reflejada la actividad antifúngica que presenta LfcinB, la cual va relacionada con la interacción péptido-membrana citoplasmática del hongo, y con el aumento de la producción de leucocitos polimorfonucleares^{37,38}. Con respecto a la actividad antiparasitaria, se desconoce con exactitud el mecanismo de acción, pero se cree que va dirigido hacia “la atracción de cargas entre la superficie celular negativa de algunos protozoarios y la Lfcin”³⁵.

4.3.3. Dominio activo

El motivo responsable de la actividad antimicrobiana selectiva de la LfcinB es la secuencia LfcinB (20–25) : ²⁰RRWQWR²⁵ ³⁵, la cual posee residuos de cargas positivas (Arg y Lys) y residuos hidrofóbicos (Trp) que interfieren en su mecanismo de acción³⁶. Se han diseñado moléculas con modificaciones en la secuencia original de la LfcinB, con el fin de potenciar su actividad antimicrobiana, basándose en los siguientes parámetros: la hidrofobicidad, la carga neta, la asimetría de la carga, la afinidad micelar y la lipofilia³⁵. Algunos cambios específicos que se han realizado consisten en: (i) la incorporación de aminoácidos no naturales, (ii) la reducción o elongación del motivo, (iii) la sustitución de residuos básicos por residuos no cargados, (iv) la presentación múltiple del motivo RRWQWR en secuencias palindrómicas, diméricas y tetraméricas, y (v) la variación de la longitud de secuencia^{35,36}.

4.3.4. Mecanismo de acción antibacteriano

El mecanismo de acción de LfcinB se basa en su afinidad con la membrana plasmática de las bacterias, a través de interacciones electrostáticas entre los componentes de la membrana bacteriana cargados negativamente y los residuos positivos del péptido (Arg)³⁹. Posterior a ello, los residuos hidrófobos (Trp), interactúan con la bicapa lipídica de la membrana, promoviendo disrupción; lo que

conduce a la desestabilización y al incremento de la permeabilidad de la misma, lo que finalmente ocasiona su lisis^{40,41}.

4.4. Sustituciones de aminoácidos en PAMs

La mayoría de los PAMs presentan carga positiva, esto, facilita en gran medida la interacción electrostática que se presenta entre los péptidos y la carga negativa que poseen los microorganismos; de este modo se provoca el desequilibrio del microorganismo y se puede llegar a generar la lisis celular⁴². Las sustituciones de aminoácidos no sólo se realizan con el fin de mejorar la actividad antibacteriana, también se ha visto que pueden mejorar la actividad antifúngica de ciertos péptidos⁴³.

El incremento de la actividad (antibacteriana o antifúngica) del péptido al hacer los cambios de aminoácidos en ciertas posiciones de la cadena péptida, se logra aumentando la carga neta positiva y/o la hidrofobicidad del péptido⁴².

4.4.1. Sustituciones de Arg por Lys en PAMs

Los cambios de Arg por Lys logran mantener o incrementar la actividad antibacteriana de ciertos péptidos cuando son evaluados contra cepas bacterianas; Yang et al²⁴ evidenció que los péptidos sustituidos con Lys (TRK y SYM11KK) exhibieron casi dos veces mayor actividad antibacteriana que los péptidos originales. Además de ello, evaluó el porcentaje de hemólisis de estas moléculas, y observó que no presentaban actividad hemolítica a concentraciones de 100 y 200 µg/mL²⁴.

Por otro lado, se ha visto que al usar residuos de Lys para el diseño y la construcción de estos péptidos cortos derivados de LfcinB, resulta ser mucho más económico que usar Arg; esto se debe a que, industrialmente, la compra de Lys es menos costosa⁴⁴.

Al realizar este tipo de sustituciones, no siempre se logra incrementar la actividad antibacteriana del péptido, ya que en ciertas ocasiones la actividad puede

mantenerse o puede disminuirse, con respecto a la actividad del péptido original. Arias et al²² observó que al realizar los cambios de Arg por Lys en sus péptidos ricos en Triptófano, lograba mantener la actividad antibacteriana en la mayoría de los casos contra *E. coli* ATCC 25922, por ejemplo, como se evidenció para Tritrp3–Arg y Tritrp3–Lys, donde ambos péptidos presentaron CMI de 2 µM. En el único caso en donde se disminuyó la actividad antibacteriana fue para Tritrp7–Arg y Tritrp7–Lys, donde presentaron MIC de 8 y 32 µM, respectivamente²².

4.4.2. Sustituciones de Arg por Lys en péptidos derivados de LFB

Chen et al²⁵ estudió péptidos cortos derivados de la Lactoferrina Bovina, en donde observó que la actividad antibacteriana se mantiene, con respecto a la actividad que presenta el péptido original, como ocurre con LFB-RW y LFB-KW; por ejemplo, para *E. coli* ATCC 25922 presentaron MIC de 8.80 y 7.20 µM, respectivamente²⁵. El propósito de este reporte fue diseñar péptidos análogos cortos, con mayor actividad que la LfcinB, mediante el concepto de carga catiónica, usando residuos positivos como la Lys.

4.5. Características biológicas de *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo no esporulado, perteneciente a la familia de las enterobacterias; es móvil, oxidasa negativo, catalasa positivo, reductor de nitratos a nitritos, capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, con producción de ácido y gas⁴⁵. *E. coli* está compuesta por tres antígenos que la caracterizan: i) Antígeno O: Somático. ii) Antígeno K: De superficie y iii) Antígeno H: Flagelar⁴⁶.

4.5.1. Patogenia

Hasta el momento, se encuentran descritos seis serotipos de *E. coli* patógenos productores de diarrea en individuos; *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC)⁴⁷. El mecanismo de patogenicidad del microorganismo para poder generar la diarrea, depende del

serotipo de *E. coli* que infecte al individuo; de este modo, puede hacerlo por medio de: invasividad, producción de citotoxinas, enterotoxinas y por adherencia a la superficie de la mucosa del intestino⁴⁶.

El hombre y los animales de sangre caliente, son los principales reservorios de esta bacteria; el modo de transmisión se puede producir por vía fecal-oral, o por consumir agua y alimentos contaminados con el microorganismo⁴⁶. Además de producir diarrea, *E. coli* puede diseminarse por fuera del intestino, llegar al torrente sanguíneo y causar bacteriemias; adicional a ello, también es responsable de generar infecciones urinarias (cistitis aguda, pielonefritis), infecciones hepatobiliares, cutáneas y pulmonares; en neonatos especialmente con nacimiento prematuro puede causar meningitis⁴⁸.

4.5.2. Tratamiento

En la actualidad, se ha visto un incremento de la resistencia de *E. coli* a ciertos antibióticos que se consideraban antes como convencionales para su tratamiento, especialmente en enfermedades de tipo urinarias; entre ellos encontramos ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina⁴⁹. Ahora, se están implementando otros antibióticos como forma de terapia para el control de estas enfermedades, y son los siguientes: nitrofurantoína, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, cefuroxima, fluoroquinolona⁵⁰.

4.4.3. *E. coli* ATCC 25922

En la siguiente tabla se encuentran las características de la cepa

Tabla 4. Características de *E. coli* ATCC⁵¹

Nombre	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani y Chalmers (ATCC ® 25922™)
Clasificación	Enterobacteriaceae
Aislamiento	Aislado clínico
Nivel de bioseguridad	Nivel 1
Formato del producto	Liofilizado
Medio de cultivo	Agar Trypticasa Soja
Condiciones de crecimiento	37°C. Ambiente aeróbico
Aplicaciones	Control de calidad para medios de cultivo microbiológicos; métodos para determinar la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos; estándares de rendimiento para pruebas de sensibilidad de antimicrobianos en discos.

4.6. Características biológicas de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo ligeramente curvo, perteneciente a la familia Pseudomonaceae; es móvil debido a que posee un flagelo polar⁵², es oxidasa y catalasa positivo⁵³. Las cepas de *P. aeruginosa* se caracterizan principalmente, por la producción de pigmentos en los medios de cultivo, tales como: i) Piocianina: Pigmento azulado. ii) Pioverdina: Pigmento amarillo-verdoso ante la luz UV. iii) Piorrubina: Pigmento rojo y iv) Piomelanina: Pigmento marrón⁵⁴.

4.6.1. Patogenia

Es una bacteria oportunista, asociada principalmente a infecciones intrahospitalarias; puede generar infecciones leves en órganos externos (oídos, folículos pilosos), infecciones graves en órganos internos (Torrente sanguíneo, pulmones, válvulas cardíacas)⁵⁵, además de infecciones en las vías urinarias⁵⁵. Los factores de virulencia asociados con la patogenia de *P. aeruginosa* son “la capacidad de adherencia, producción de toxinas y producción de glycocalix”⁵⁶.

Esta bacteria se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, está presente en el suelo, el agua y las plantas, y soporta una gran variedad de condiciones físicas (temperatura, presión, pH)⁵⁶. El modo exógeno de transmisión, es por el

contacto de las manos contaminadas del personal de salud, con las superficies y dispositivos médicos que carecen de limpieza y desinfección⁵⁷.

4.6.2. Tratamiento

P. aeruginosa ha mostrado alta resistencia contra los tratamientos terapéuticos de la ciprofloxacina, gentamicina, aztreonam, ceftazidime, cefepime, antibióticos que tienen baja actividad antibacteriana contra este microorganismo⁵⁷. Aún en el mercado se encuentran disponibles otros antibióticos para los cuales, esta bacteria no ha presentado resistencia y dentro de ellos tenemos la amikacina, meropenem, piperacilina-tazobactam⁵⁸.

4.6.3. *P. aeruginosa* ATCC 27853

En la siguiente tabla se encuentran las características de la cepa

Tabla 5. Características de *P. aeruginosa* ATCC⁵⁹

Nombre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC ® 27853™)
Clasificación	Pseudomonadaceae
Aislamiento	Sangre
Nivel de bioseguridad	Nivel 2
Formato del producto	Liofilizado
Medio de cultivo	Agar Trypticasa Soja
Condiciones de crecimiento	37°C. Ambiente aeróbico
Aplicaciones	Control de calidad para medios de cultivo microbiológicos; estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en discos.

4.7. Características biológicas de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un coco Gram positivo, perteneciente a la familia Staphylococcaceae, y generalmente se agrupa en racimos⁶⁰. Esta bacteria es inmóvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, coagulasa positivo, fermentadora de manitol⁶¹. La fácil y rápida diseminación de la bacteria, se debe a que se encuentra en la microbiota normal en piel y las mucosas, específicamente en la zona nasal-oral⁶¹.

4.7.1. Patogenia

S. aureus, también es asociado a infecciones intrahospitalarias producidas en pacientes inmunocomprometidos, pero además de ello, es causante de otras enfermedades como endocarditis, shock tóxico, osteomielitis, neumonía, foliculitis, impétigo, celulitis, síndrome de piel escaldada, abscesos, mastitis y bacteriemias⁶². Además de esto, se ha dicho que la presencia de *S. aureus* también está relacionada con la mala higiene e inadecuada manipulación de los alimentos; la intoxicación se debe a una enterotoxina estafilocócica, caracterizada por ser resistente a altas temperaturas⁶³.

La patogenia de *S. aureus* es mediada por la producción de exotoxinas encargadas de dañar las membranas de las células del individuo hospedero; estas exotoxinas son “ α -hemolisina, β -hemolisina, γ -hemolisina, leucocidina y la leucocidina PVL”⁶⁴. Este microorganismo se encuentra principalmente en la piel, axilas, zonas íntimas, cabello, boca, garganta y fosas nasales de individuos sanos⁶⁵. *S. aureus* hace parte de la microbiota normal, pero cuando se genera alguna lesión, esta bacteria actúa como un patógeno oportunista y causa infecciones⁶⁵.

4.7.2. Tratamiento

Anteriormente, las infecciones causadas por SARM estaban asociadas únicamente al ámbito intrahospitalario, pero con el pasar del tiempo esto cambió y empezó a afectar a individuos sanos, sin antecedentes de intervención hospitalaria⁶⁶. Hasta el momento se conoce que SARM no sólo es resistente a la meticilina sino que también ha generado resistencia contra “cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas”⁶⁷; Así entonces, SARM sólo es sensible a glucopéptidos y los antibióticos convencionales ya no tienen actividad antibacteriana contra esta cepa⁶⁷. Para *S. aureus* sensible, los antibióticos usados para el tratamiento de sus infecciones son vancomicina, oxacilina, ciprofloxacina, tetraciclina, entre otros⁶⁸.

4.7.3. *S. aureus* ATCC 25923

En la siguiente tabla se encuentran las características de la cepa

Tabla 6. Características de *S. aureus* ATCC⁶⁹

Nombre	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 25923™)
Clasificación	Staphylococcaceae
Aislamiento	Aislado clínico
Nivel de bioseguridad	Nivel 2
Formato del producto	Liofilizado
Medio de cultivo	Agar Trypticasa Soja
Condiciones de crecimiento	37°C. Ambiente aeróbico
Aplicaciones	Protocolos para la evaluación del agar Mueller-Hinton deshidratado; estándares de rendimiento para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en discos.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Población

Péptidos derivados de LfcinB, con sustituciones de aminoácidos catiónicos en su secuencia.

5.1.2. Muestra

La muestra utilizada en este estudio fueron 8 péptidos sintéticos derivados de LfcinB (20-25): LfcinB (20-25), ^(R->K)LfcinB (20-25), LfcinB (20-25)₂, ^(R->K)LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-25)₄, ^(R->K)LfcinB (20-25)₄, LfcinB (21-25)_{pal}, ^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal}, los cuales, fueron evaluados para comprobar su actividad antibacteriana.

5.2. Hipótesis

Péptidos derivados de LfcinB (20-25): RRWQWR con sustituciones de Arginina por Lisina presentarán similar o mayor actividad antibacteriana que su secuencia original, frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5.2.1. Variables

5.2.1.1. Dependiente

La variable dependiente de este estudio, es el crecimiento de las diferentes cepas de estudio de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Igualmente se incluyen, la acción inhibitoria o bactericida de los péptidos de LfcinB sobre las cepas de estudio.

5.2.1.2. Independiente

Como variable independiente se considerada la concentración de los péptidos sintéticos derivados de la LfcinB.

5.3. Materiales

Agar Triptona de Soya (TSA), agar Standard Plate Count (SPC), agar y caldo Mueller Hinton (MH), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Agua peptonada, todos de la marca OXOID, Agua destilada estéril, Ciprofloxacina (Bayer),

Vancomicina (Hospira. Inc- Pfizer), tubos vacutainer con EDTA, asa curva metálica, cajas de Petri NEST, Placas de Test 96 Pozos Fondo Plano, TC Estéril – NEST, Filtros Nylon Acrodisc 0,2 µm, pipeta multi canal, pipeta 100-1000 µL, pipeta de 2-20 µL, puntas amarillas de 200 µL, puntas azules de 101-1000 µL, puntas blancas 0,1-10 µL, tubos Eppendorf de 2 mL, cámara de flujo laminar, lector de ELISA (Expert Plus ASYS), Bioscreen C.

5.3.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, suministradas por el grupo de investigación SAMP.

5.3.2. Péptidos derivados de LfcinB

Tabla 7. Péptidos sintéticos derivados de LfcinB evaluados

Clasificación	Secuencia	Código del Péptido
Monómero con Arg	RRWQWR	LfcinB (20-25)
Monómero con Lys	KKWQWK	^(R->K) LfcinB (20-25)
Dímero con Arg	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	LfcinB (20-25) ₂
Dímero con Lys	(KKWQWK) ₂ K-Ahx	^(R->K) LfcinB (20-25) ₂
Tetrámero con Arg	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	LfcinB (20-25) ₄
Tetrámero con Lys	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	^(R->K) LfcinB (20-25) ₄
Palíndromo con Arg	RWQWRWQWR	LfcinB (21-25) _{pal}
Palíndromo con Lys	KWQWKWQWK	^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}

5.4. Técnicas y Procedimientos

Este trabajo se llevó a cabo en tres etapas como se muestra en la Figura 2: la primera etapa consistió en la evaluación de la actividad antibacteriana de los 8 péptidos sintéticos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida, en la segunda etapa se calculó el porcentaje de hemólisis de los péptidos con Lys y se compararon con reportes anteriores de los mismos péptidos con Arg, con estos resultados, se seleccionaron los péptidos con Lys con la mayor actividad antibacteriana por cada cepa y menor actividad hemolítica, que siguieron a la se tercera etapa, donde se realizó la cinética de la actividad antibacteriana de los péptidos a 48 horas, reflejada en curvas de letalidad.

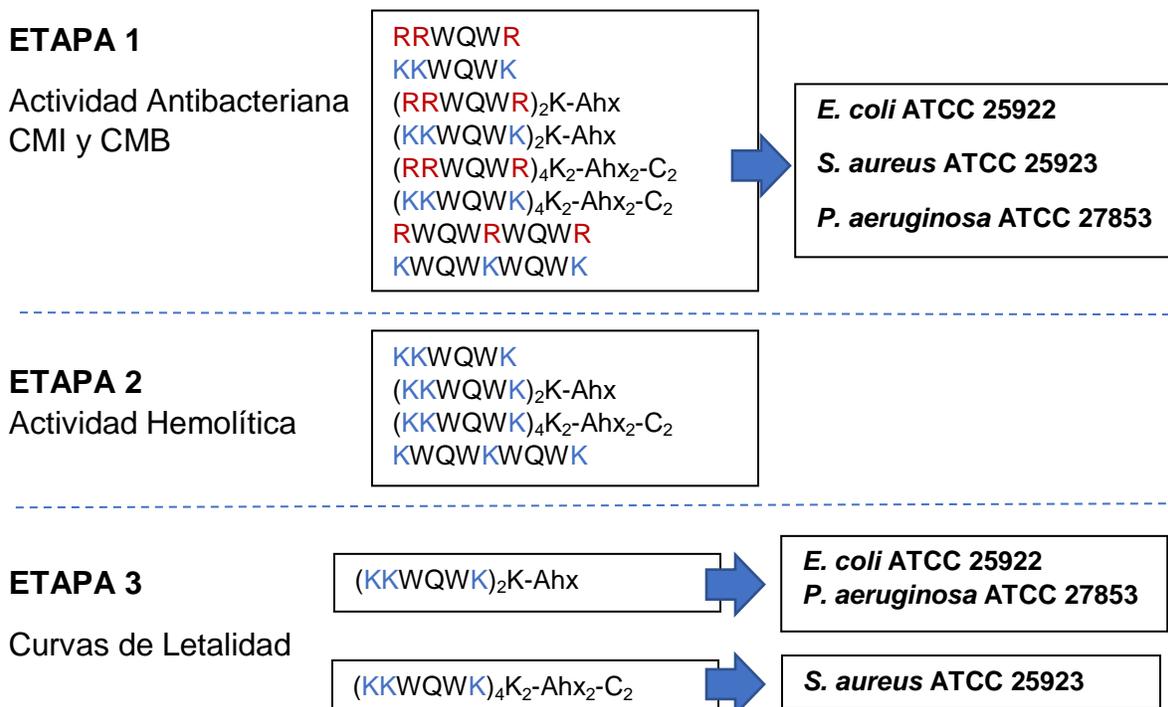


Figura 2. Esquema de las tres etapas realizadas en el trabajo

5.4.1. Activación, confirmación y mantenimiento de las cepas bacterianas ATCC

Las cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 fueron activadas teniendo en cuenta el protocolo establecido por el proveedor (Microbiologics). Se realizaron 3 pases seriados hasta obtener la tasa de crecimiento óptima; con el fin de confirmar y tener certeza de la pureza de los microorganismos, se realizó tinción de Gram.

Cuando se obtuvo el aislamiento de los microorganismos en el medio Tripteína Soya Agar (TSY), estos medios se almacenaron a una temperatura de 4 °C, durante 60 días máximo. Después de cumplir con este tiempo, o de observar contaminación en el medio de cultivo TSY, fue necesario desecharlos e iniciar nuevamente con la activación de las cepas como ya se describió previamente. El almacenamiento de las cepas se realizó a una temperatura de -70°C, usando crioviales que contenían medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Glicerol al 20%.

5.4.2. Obtención de péptidos derivados de Lactoferricina Bovina

Los ocho péptidos derivados de LfcinB, fueron sintetizados mediante la estrategia Fmoc/tBu en fase sólida; estas moléculas fueron purificadas por Extracción en Fase Sólida (SPE) y caracterizadas por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Inversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF. Lo anterior fue realizado por el grupo SAMP de la Universidad Nacional de Colombia, quienes proporcionaron cantidades liofilizadas de los péptidos para la evaluación en este proyecto.

5.4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Este ensayo se llevó a cabo empleando el Método de Microdilución en Caldo, según las normas del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷⁰; el ensayo se realizó por duplicado, y se inició adicionando 90 µL de medio caldo Mueller Hinton (MH) en una caja multipozos; posterior a ello, se adicionaron 90 µL del péptido y se realizaron diluciones de este en base 2, partiendo desde una

concentración de 200 µg/mL hasta 6,2 µg/mL. Seguido a esto, se agregaron en todos los pozos 10 µL del inoculo bacteriano previamente ajustado (5×10^6 UFC/mL). Este ensayo requirió de 4 controles y fueron los siguientes: i) **Control Negativo:** Agua destilada, ii) **Control Positivo:** Antibiótico. Para *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se usó Ciprofloxacina (0,2 y 0,4 µg/mL, respectivamente), para *S. aureus* ATCC 25923, se usó Vancomicina (3,2 µg/mL). (iii) **Control Técnica:** Agua peptonada. iv) **Control Crecimiento:** Cepa bacteriana.

Por último, se realizó la incubación de la caja multipozos a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, se procedió a leer las absorbancias obtenidas en un Lector de ELISA a una longitud de onda de 630 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			H ₂ O			H ₂ O			H ₂ O			H ₂ O
B	H ₂ O	200 µg/mL P1: 90µL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL	6,2 µg/mL	P4: 200 µg/mL	P4	C-	CT	H ₂ O
C		P1						100 µg/mL		C-	CT	
D		P2						50 µg/mL		C-	CT	H ₂ O
E	H ₂ O	P2						25 µg/mL		C+	CC	
F		P3						12,5 µg/mL		C+	CC	
G		P3						6,2 µg/mL		C+	CC	H ₂ O
H	H ₂ O			H ₂ O			H ₂ O			H ₂ O		

Figura 3. Distribución de la caja multipozos para hallar la CMI. Se observan las concentraciones finales del péptido (µg/mL). Control positivo (C+), Control negativo (C-), Control de crecimiento (CC), Control técnica (CT).

5.4.4. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida

Se realizó según la norma del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁷¹, en donde, después de hacer la lectura de las absorbancias

de la caja multipozos, se llevó a cabo un sub-cultivo en Agar MH de cada uno de los péptidos en donde no se observó crecimiento (Figura 4). Cada péptido se sembró por

duplicado. La actividad bactericida, se definió como la concentración mínima requerida del péptido donde no se evidenció crecimiento.

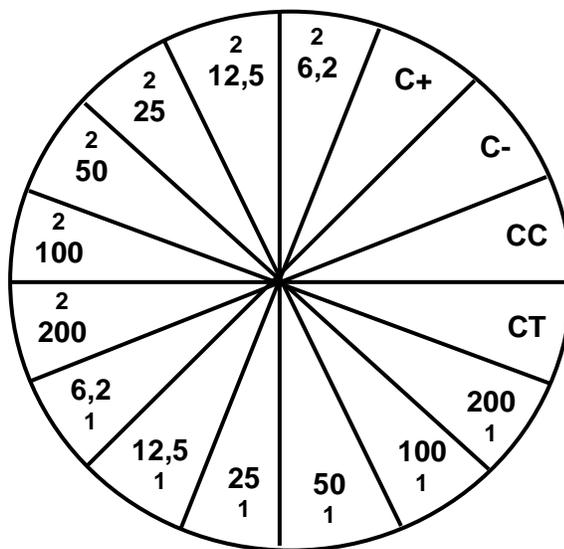


Figura 4. Rotulación de la caja de Petri para hallar la CMB en agar MH. Los valores hacen referencia a las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ del péptido utilizado para el sub-cultivo.

5.4.5. Actividad Hemolítica

Este ensayo llevó a cabo según Solarte et al³⁴. Sangre O+ con EDTA fue centrifugada a 500 rpm durante 15 min; los eritrocitos fueron separados y lavados tres veces con solución salina (NaCl) al 0,9%. Posteriormente, 100 μL del péptido (en concentraciones de 200 a 6,2 $\mu\text{g/mL}$) se mezclaron con 100 μL de eritrocitos (4% de hematocrito) y se incubó a 37 °C por 2 horas. Luego se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 450 nm. Se usaron dos controles: i) Control positivo: Agua destilada con la suspensión de glóbulos rojos al 4% ii) Control negativo: Solución salina 0,9% con la suspensión

de glóbulos rojos al 4%. El porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%Hemolisis = \frac{Abs \text{ Péptido} - Abs \text{ Solución salina}}{Abs \text{ Agua destilada} - Abs \text{ Solución salina}} * 100$$

5.4.6. Curvas de letalidad-muerte

Se realizaron según lo descrito en el protocolo CLSI⁷¹, con algunas modificaciones, se agregaron 270 μ L de péptido (0,5CMI, CMI y 2CMI), en caldo MH que ya había sido agregado previamente en la caja multipozos; posteriormente a esto, se dispensaron 30 μ L de la cepa previamente ajustada a 5×10^6 UFC/mL; el ensayo se realizó por triplicado. Las cajas multipozos se incubaron durante 48 horas a 37°C en el quipo Bioscreen C; la lectura de las absorbancias de los pozos se realizó cada hora a una longitud de onda de 600 nm. Se usaron 3 controles: i) Antibiótico ii) Cepa iii) Caldo Muller Hinton.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

Objetivo: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los péptidos contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

6.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

Los péptidos evaluados fueron agrupados en pares según la secuencia (monómeros, dímeros, tetrámeros y palíndromos) y la sustitución de Arginina por Lisina que se planteó inicialmente. En las tablas 8,9 y 10 se encuentran los valores de CMI y CMB de cada uno de los péptidos, contra las cepas estudiadas. En el anexo 1 se encuentran los resultados de las absorbancias obtenidas de la CMI y las imágenes de la CMB para cada uno de los péptidos con respecto a las 3 cepas ATCC.

Tabla 8. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra *E. coli* ATCC 25922

<i>E. coli</i> ATCC 25922		
Código	Secuencia	CMI / CMB (μ M)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
^(R->K) LfcinB (20-25)	KKWQWK	222/222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	6/11
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ K-Ahx	24/24
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	11/11
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	17/34
^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	KWQWKWQWK	36/36

Como se puede ver en la tabla 8, con respecto al motivo mínimo de LfcinB, no se observan cambios en la actividad antibacteriana de *E. coli* ATCC 25922, al comparar el péptido que contiene Arg: LfcinB (20-25) (CMI: 203 μ M) y el péptido que contiene Lys: $^{(R \rightarrow K)}$ LfcinB (20-25) (CMI: 222 μ M); para el caso de los péptidos polivalentes, se observa que por el contrario, la actividad antibacteriana para los péptidos con Lys: $^{(R \rightarrow K)}$ LfcinB (20-25)₂, $^{(R \rightarrow K)}$ LfcinB (20-25)₄, $^{(R \rightarrow K)}$ LfcinB (21-25)_{pal} (CMI: 24 μ M -222 μ M), se obtuvo variación, con un intervalo de diferencia entre dos y cuatro diluciones, aproximadamente, con respecto a los péptidos con Arg (CMI: 6 μ M -203 μ M), resaltando que la actividad antibacteriana se mantuvo dentro del rango de las concentraciones evaluadas, adicionalmente los péptidos polivalentes tanto Arg como con Lys presentaron mayor actividad que el motivo mínimo.

A continuación, como ejemplo de la CMB, se presentan los péptidos diméricos con Arg (Figura 5) y con Lys (Figura 6), contra *E. coli* 25922. En el anexo 1 se encuentran las imágenes de los demás resultados obtenidos. Se puede observar que los dos péptidos presentaron actividad bactericida a las 24 h y se presentó una dilución de variación dentro de las concentraciones evaluadas, del péptido sustituido (50 μ g /mL), con respecto a su análogo (25 μ g /mL).

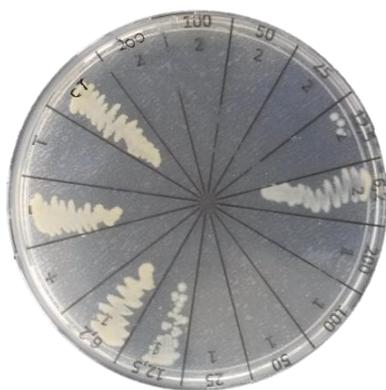


Figura 5. CMB de LfcinB (20-25)₂ para *E. coli* 25922
CMB: 25 μ g /mL

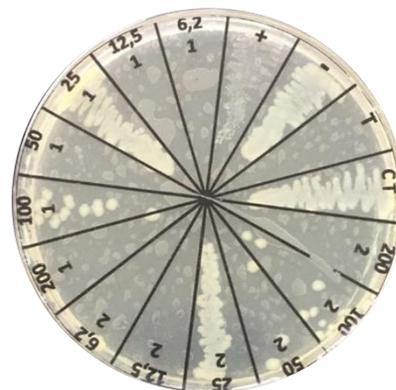


Figura 6. CMB de $^{(R \rightarrow K)}$ LfcinB(20-25)₂ para *E. coli* 25922
CMB: 50 μ g /mL

Tabla 9. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra *P. aeruginosa* ATCC 27853

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
Código	Secuencia	CMI / CMB (μM)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
^(R->K) LfcinB (20-25)	KKWQWK	>222/>222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	23/91
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ K-Ahx	48/95
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	11/22
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	67/135
^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	KWQWKWQWK	143/143

Para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabla 9) se obtuvo un resultado similar al de *E. coli* ATCC 25922, (Tabla 8), el motivo mínimo y su análogo no evidenciaron cambios en su actividad antibacteriana; a diferencia de los demás péptidos polivalentes, en donde se ve nuevamente que la actividad antibacteriana se mantiene para los péptidos con Lys (CMI: 27 μM -143 μM), dentro de los rangos de las concentraciones estudiadas, con variación respecto a sus análogos con Arg (CMI: 11 μM -57 μM), de una a cuatro diluciones aproximadamente. También se puede notar que los péptidos polivalentes exhiben mayor actividad que el motivo mínimo para esta cepa.

Las siguientes figuras (7 y 8), muestran los resultados obtenidos de la CMB para *P. aeruginosa* ATCC 27853. En donde se evidencia que ambos péptidos son bactericidas a las 24 h y la actividad antibacteriana se mantuvo dentro de las concentraciones evaluadas, con un rango de variación de una dilución; se

obtuvieron CMB de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para el péptido tetramero sustituido y el original, respectivamente.

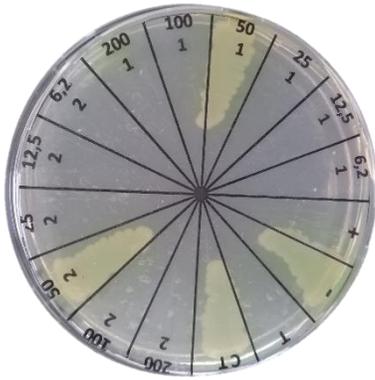


Figura 7. CMB de LfcinB (20-25)₄ para *P. aeruginosa* 27853
CMB: 100 µg /mL

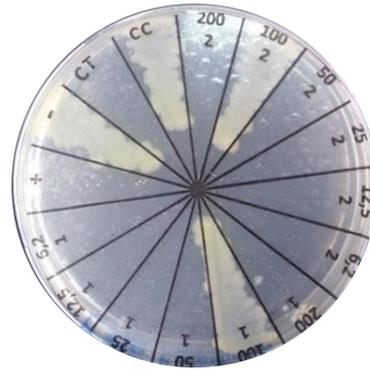


Figura 8. CMB de ^(R->K)LfcinB (20-25)₄ para *P. aeruginosa* 27853
CMB: 200 µg /mL

Tabla 10. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos contra *S. aureus* ATCC 25923

<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
Código	Secuencia	CMI / CMB (µM)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
^(R->K) LfcinB (20-25)	KKWQWK	>222/>222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	91/91
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ K-Ahx	>95/>95
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	22/44
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	135/>135
^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	KWQWKWQWK	143/>143

Para la tabla 10, se observa que no hubo cambios en la actividad antibacteriana de los péptidos originales LfcinB (20-25), LfcinB (20-25)₂, LfcinB (21-25)_{pal} (CMI: 91 µM - 203 µM) con respecto a sus análogos ^(R->K)LfcinB (20-25), ^(R->K)LfcinB (20-25)₂, ^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal} (CMI: 143 µM - 203 µM). En el caso del tetrámero, se evidencia que la actividad antibacteriana de ^(R->K)LfcinB (20-25)₄ (CMI: 22 µM) se

mantuvo dentro de las concentraciones evaluadas y presentó variación en una dilución aproximadamente, con respecto a LfcinB (20-25)₄ (CMI: 47 μM).

Como de ejemplo, se muestran las CMB obtenidas para el tetrámero (sustituido y el original) contra a *S. aureus* 25923; en donde se observa que la actividad antibacteriana se mantuvo al comparar ambos péptidos, debido a que exhiben valores de CMB de 200 μg/mL como se observa en la figura 9 y 10.



Previamente la actividad antibacteriana de los péptidos: monomérico, palindrómico y polivalentes derivados del motivo mínimo de LfcinB, que contenían Arg en la secuencia original (RRWQWR, (RRWQWR)₂K-Ahx, (RRWQWR)₄K₂-Ahx₂-C₂, RWQWRWQWR) había sido evaluada en bacterias Gram Positivas y Gram negativas, exhibiendo CMIs entre 6 y >200 μM^{19,9}. Los resultados obtenidos con esas mismas secuencias, pero con sustituciones de Arg por Lys se muestran en las tablas de la 8-10. De manera general, se puede deducir que, para las tres cepas ATCC, la actividad antibacteriana de los péptidos que contienen Lys, se mantuvo dentro de los rangos de concentración evaluados (6,2 -200 g.mL) con CMI entre 24 y >200 μM observándose aumento de la CMI en una a cuatro órdenes de dilución aproximadamente con respecto a sus análogos con Arg. Cabe resaltar que para el motivo mínimo RRWQWR, no se observó modificación de la actividad antibacteriana, lo anterior está de acuerdo con la hipótesis planteada.

Adicionalmente, se evidenció que como en los péptidos con Arg^{20,72}, la polivalencia del motivo mínimo de LfcinB también logró mejorar la actividad antibacteriana de los péptidos que contenían Lys, contra las tres cepas evaluadas. Estos resultados son de interés debido a que se confirma que el motivo mínimo por sí solo no presenta alta actividad antibacteriana y por el contrario las modificaciones en péptidos derivados de este, pueden mejorar la actividad, volviéndolos promisorios como agentes terapéuticos.

Estudios anteriores realizados con PAMs en donde se sustituyó la Arg por Lys, han obtenido resultados variados en cuanto a la actividad antibacteriana, algunos han logrado potenciarla, otros mantenerla e incluso para otros se ha reducido^{73,74}. En el caso de este trabajo, al realizar estas sustituciones, no se potenció la actividad antibacteriana, pero si se mantuvo dentro de los rangos de concentraciones evaluadas, esto posiblemente ocurrió, debido a que, aunque ambos son residuos básicos, y tienen una carga neta de +1 a condiciones fisiológicas, el residuo Arg tiene más carga positiva dispersa en su cadena lateral, debido a su grupo guanidino; en cambio el residuo Lys, en su cadena lateral presenta una amina primaria²⁴. “La amina primaria de Lys y el grupo guanidinio de Arg parecen interactuar de manera diferente con fosfolípidos, este mecanismo de interacción aun no está claro, pero lo anterior podría explicar las diferencias en la actividad antibacteriana entre péptidos que contienen Arg y Lys.²⁴

A continuación, en la tabla 11 se encuentran los péptidos análogos (Lys) que presentaron la mayor actividad antibacteriana, con respecto a las tres cepas evaluadas en este ensayo.

Tabla 11. Péptidos con Lys, que presentaron la mayor actividad antibacteriana, según la cepa ATCC estudiada.

Código	Cepa ATCC	CMI/CMB μM
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	<i>E.coli</i> 25922	24/24
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	<i>P. aeruginosa</i> 27853	48/95
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	<i>S. aureus</i> 25923	47/47

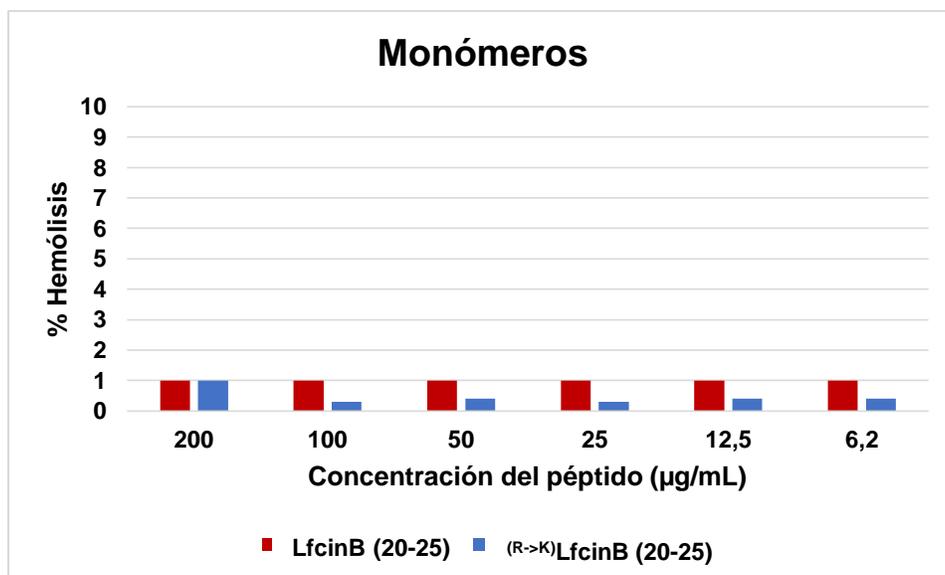
Etapa II

Objetivo: Calcular la actividad hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de LfcinB.

6.2. Actividad Hemolítica

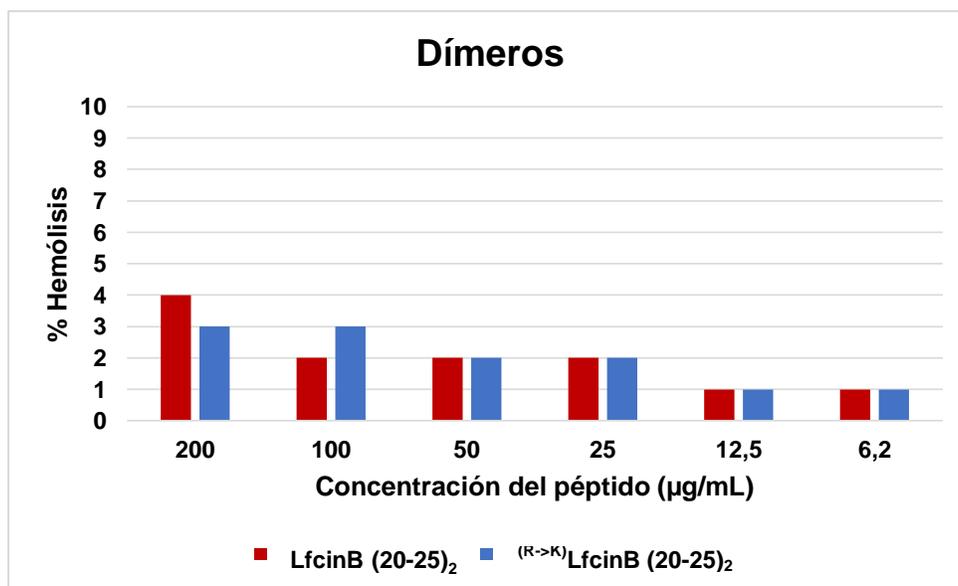
La actividad hemolítica se realizó a los cuatro péptidos con sustituciones de aminoácidos de Arginina por Lisina. Los valores obtenidos de los péptidos con Lys se compararon con los resultados obtenidos de los péptidos con Arg, reportados en el estudio de Vargas et al⁷⁵. En el anexo 2, se encuentran las tablas correspondientes a los porcentajes de hemólisis que se obtuvieron para cada uno de los péptidos.

La gráfica 1 muestra que, a todas las concentraciones evaluadas, no se observa diferencia entre los porcentajes de hemólisis de ambos péptidos (LfcinB (20-25) y ^(R->K)LfcinB (20-25)). A una concentración de 200 µg/mL, se evidencia que los dos péptidos tuvieron la misma actividad hemolítica (1%); cabe resaltar que, a esta concentración estos péptidos obtuvieron actividad antibacteriana contra las cepas estudiadas.



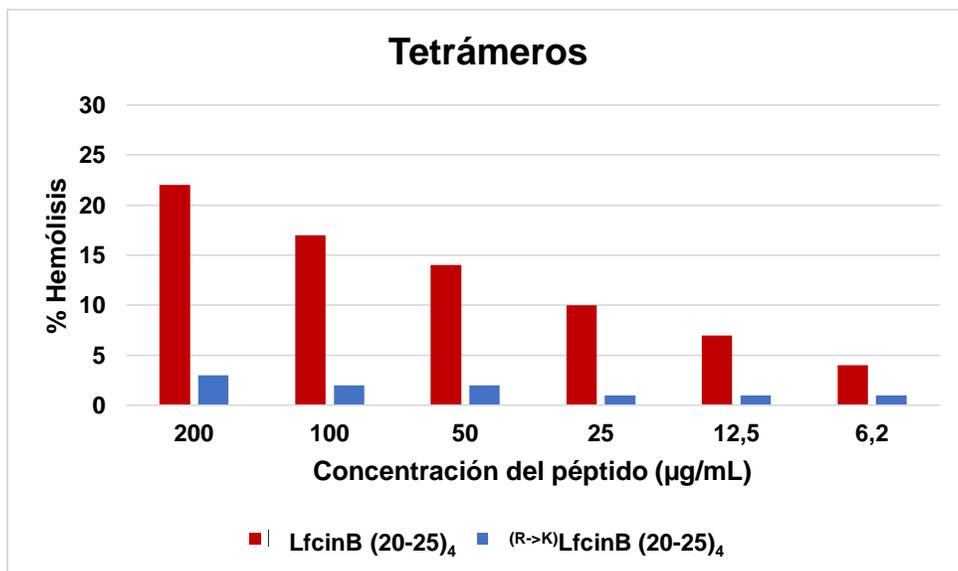
Gráfica 1. Comparación la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25) y ^(R->K)LfcinB (20-25)

En la gráfica 2 tampoco se observan grandes diferencias en la actividad hemolítica de los péptidos con Arg y Lys, a las concentraciones evaluadas. A concentraciones entre 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (2- 4% de hemólisis); los péptidos diméricos presentaron actividad antibacteriana contra las tres cepas estudiadas.



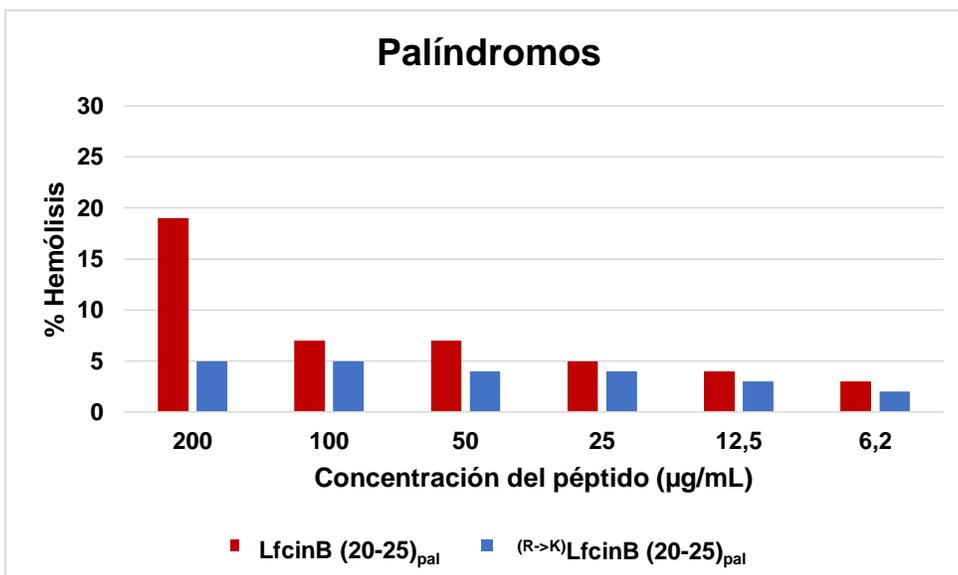
Gráfica 2. Comparación la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25)₂ y ^(R->K)LfcinB (20-25)₂

Para la gráfica 3, se pueden observar que el péptido con Lys, disminuyó la actividad hemolítica, a todas las concentraciones evaluadas, LfcinB (20-25)₄: 4-22 % y ^(R->K)LfcinB (20-25)₄: 1-3%. A una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, donde los péptidos presentaron actividad antibacteriana contra las tres cepas ATCC, se observa que ^(R->K)LfcinB (20-25)₄ disminuyó el porcentaje de hemólisis 7 veces aproximadamente con respecto a su análogo con Arg.



Gráfica 3. Comparación la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25)₄ y ^(R->K)LfcinB (20-25)₄

En la gráfica 4, no se observan grandes diferencias a las concentraciones evaluadas, excepto en 200 µg/mL donde se ve una disminución de la actividad hemolítica de 4 veces aproximadamente con ^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal}; a esta concentración los péptidos palindrómicos presentaron actividad antibacteriana especialmente contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Gráfica 4. Comparación la actividad hemolítica entre LfcinB (20-25)_{pal} y ^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal}

Los anteriores resultados son importantes debido a que en previos estudios del grupo SAMP, se había logrado potenciar la actividad antibacteriana del motivo mínimo de LfcinB con el uso de la polivalencia, pero así mismo se observó que al duplicar esta secuencia, también se potenciaba la actividad hemolítica²¹; por lo tanto se necesitaba una estrategia para superar esta desventaja, la cual logró ser resuelta con el presente trabajo, al disminuir la actividad hemolítica, específicamente para los péptidos LfcinB (20-25)_{pal} y LfcinB (20-25)₄.

Estudios previos como el de Sitaram⁷⁶ y Yang²⁴, han demostrado que, al sustituir aminoácidos, e introducir residuos de Lys como reemplazo en la secuencia, se genera disminución en la actividad hemolítica, ya que se ha visto, que los péptidos con sustituciones, tienden a presentar menores porcentajes de hemólisis, al compararlos con sus análogos. Sitaram et al⁷⁶ demostró que, es factible lograr disminuir la actividad hemolítica de un péptido, usando residuos de Lys, en su estudio observó que el péptido sustituido con Lys (SPFK) tuvo actividad hemolítica del 10%, a concentración de 9 μ M, su análogo, SPF, que contenía Glu, en las mismas condiciones, presentó una actividad hemolítica del 15% aproximadamente, a una concentración de 9 μ M. Por otro lado, Yang et al²⁴, evidenciaron que los péptidos sustituidos con Lys, presentaron una disminución significativa de la actividad hemolítica, al compararlos con sus análogos. Tritrpticin y SYM1, péptidos con Arg, presentaron valores de 37% y 24% de hemólisis, respectivamente, a una concentración de 100 μ g/mL; sus análogos, TRK y SYM11KK, péptidos con Lys, exhibieron 0% de hemólisis a todas las concentraciones estudiadas.

La reducción en la afinidad que tiene la Lys para interactuar con células de mamíferos respecto a las bacterianas se debe a que la membrana de los mamíferos, como los eritrocitos contiene más lípidos zwitteriónicos (Fosfatidilcolina, esfingomielina y otros como colesterol) que aniónicos, y adicional a ello, los lípidos que están cargados negativamente se encuentran ubicados hacia la cara interna de la membrana, por lo tanto están menos expuestos para

interactuar con los PAMs, por el contrario las membranas de las bacterias se componen principalmente de lípidos aniónicos como fosfatidilglicerol y cardiolipina⁷³; así entonces, se ha reportado que la Arg interactúa fuertemente con fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos y la Lys interactúa débilmente con fosfolípidos zwitteriónicos⁷⁷, por lo tanto los residuos de Lys tienen menor atracción por las membranas eritrocíticas que los residuos de Arg.

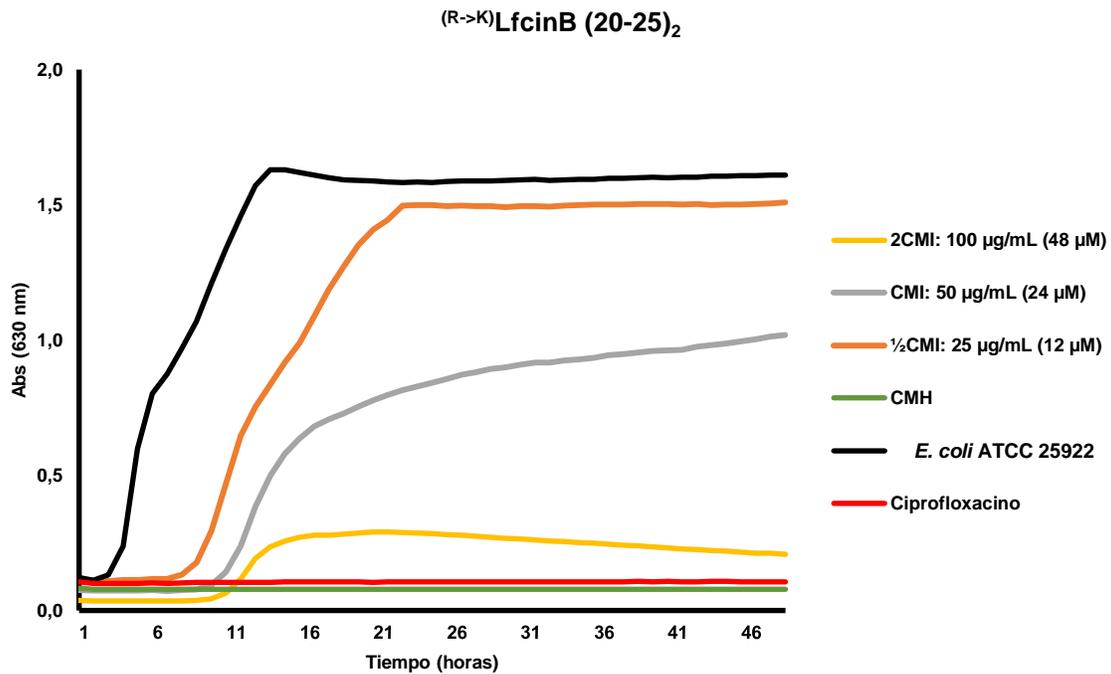
Etapa III

Objetivo: Realizar la curva de letalidad con el péptido análogo que presente la mayor actividad antibacteriana y la menor actividad hemolítica en las cepas ATCC mencionadas

6.3. Curvas de Letalidad

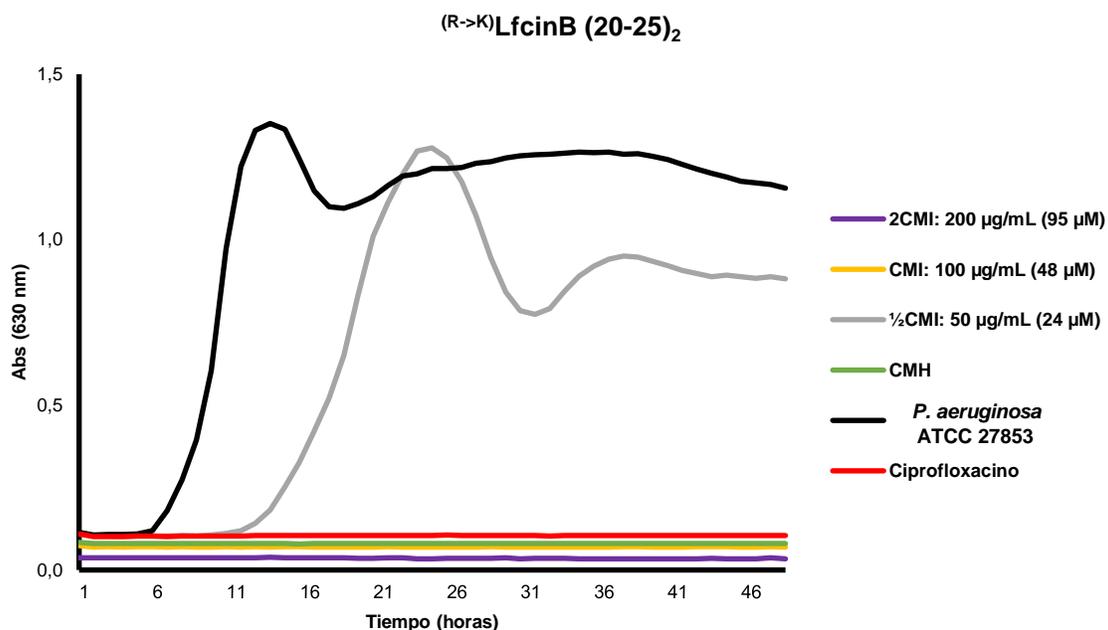
Este es un ensayo complementario de la CMB, en donde se determina el efecto y el potencial bactericida con respecto a la relación existente entre el tiempo y las concentraciones que se evalúan de los péptidos. Se escogieron los péptidos dimérico y tetramérico con sustituciones con Lys, ya que presentaron la mayor actividad por cada cepa, como se puede ver reflejado en la tabla 11.

En la gráfica 5, el péptido ^(R->K)LfcinB (20-25)₂ presentó un efecto bacteriostático en todas las concentraciones evaluadas (14, 24, 48 µM); durante las 48 horas, disminuyendo el crecimiento 20, 50 y 80%, respectivamente. Además, se observa que la etapa adaptativa del microorganismo se prolongo aproximadamente de 7 a 11 horas de incubación, en todas las concentraciones, esto se pudo evidenciar al compararse con el control de crecimiento del microorganismo (línea negra), en donde se establece que la etapa de adaptación de *E. coli* es de aproximadamente de 3 horas.



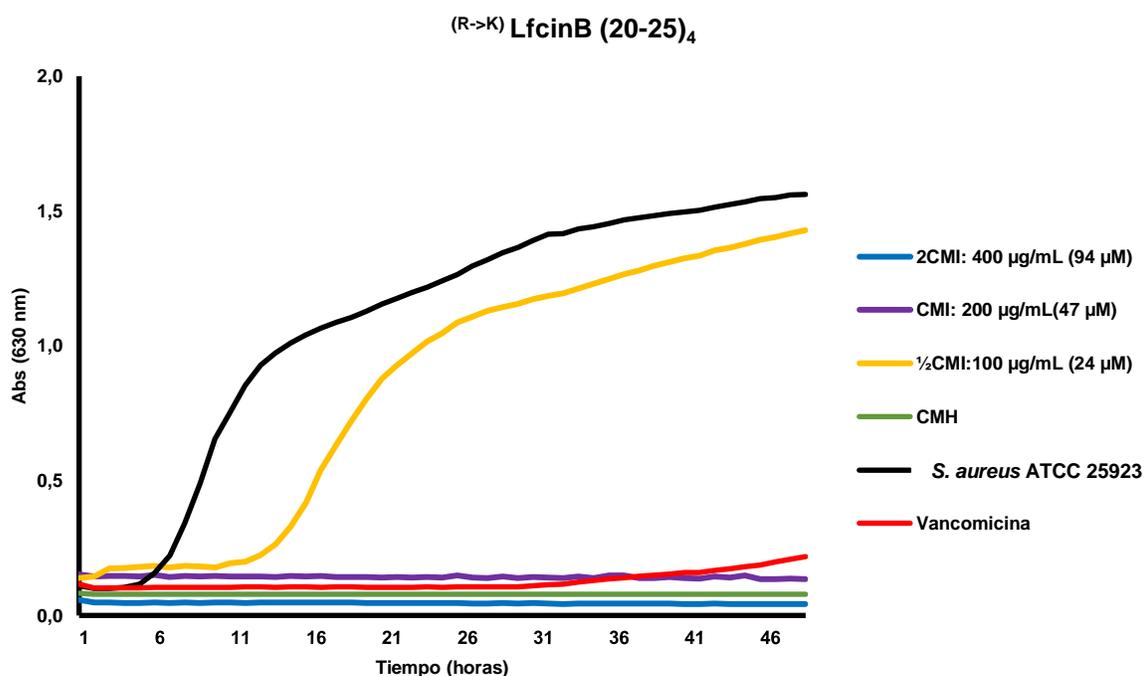
Gráfica 5. Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *E. coli* 25922.

En la gráfica 6 se observa que a 24 µM la etapa adaptativa de este péptido se prolongó hasta las 11 horas, con respecto al control de crecimiento de *P. aeruginosa* (línea negra), donde la etapa adaptativa fue de 6 horas aproximadamente. A esta misma concentración el péptido presentó un efecto bacteriostático; sin embargo, también se observa efecto bactericida durante las 48 horas de incubación a concentraciones de 48 y 95 µM, esto, con respecto al control del antibiótico (Ciprofloxacin), donde se observa un comportamiento similar.



Gráfica 6. Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *P.aeruginosa* 27853.

En la gráfica 7 se evidencia efecto bacteriostático a 24 µM, adicionalmente, la etapa de adaptación del microorganismo se prolongó hasta las 11 horas al compararse con el control de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 (línea negra), donde la adaptación del microorganismo se mantuvo hasta las 5 horas de incubación. No obstante, este péptido también exhibió efecto bactericida a 47 y 94 µM, comparandolo el antibiótico (Vancomicina), donde se ve el mismo comportamiento



Gráfica 7. Tetrámero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *S.aureus* 25923

Tabla 12. Resumen de la cinética de muerte de los péptidos evaluados contra las cepas ATCC

Péptido	Cepa ATCC	Efecto µM	
		Bacteriostático	Bactericida
^(R->K) LfcinB(20-25) ₂	<i>E. coli</i> 25922	24	-
^(R->K) LfcinB(20-25) ₂	<i>P. aeruginosa</i> 27853	24	48
^(R->K) LfcinB(20-25) ₄	<i>S. aureus</i> 25923	24	47

La información que se aprecia previamente en las gráficas (5 y 7) tiene concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de Vargas et al²¹, debido a que el dímero: LfcinB(20-25)₂ presentó un efecto bacteriostático contra *E. coli* ATCC 25922 a todas las concentraciones evaluadas (6-24 µM), al igual que ^(R->K)LfcinB(20-25)₂ (24-94 µM), para esta misma cepa. Por otro lado, el tetrámero

LfcinB(20-25)₄ exhibió un efecto bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923 (44 µM), lo mismo sucedió para ^(R->K)LfcinB (20-25)₄, contra esa misma cepa a 44 µM. Además de lo anterior, como otro avance obtenido en este trabajo de investigación, se logró ver que el ^(R->K)LfcinB(20-25)₂ presentó efecto bactericida contra *P. aeruginosa* 27853, situación que no sucedió en el estudio de Vargas et al²¹. Esto dirige a que los péptidos con Lys, además de mantener la actividad antibacteriana, también la pueden potenciar dependiendo de la concentración y la cepa evaluada.

En resumen, con este trabajo se evidenció que los cambios de aminoácidos en las cadenas peptídicas, en este caso la sustitución de Arg por Lys, permiten conservar la actividad antibacteriana de los péptidos o algunas veces potenciarla, dentro de los rangos de las concentraciones evaluadas. Como se observa en la tabla 12, mediante la cinética de muerte, en donde se obtuvieron péptidos con actividad antibacteriana frente a cepas tanto Gram Positivas como Gram Negativas.

Además de lo que ya se mencionó, también se logró disminuir la actividad hemolítica de los péptidos sustituidos, porque como ya se vio anteriormente, el tipo de aminoácidos en la secuencia, le pueden conferir mayor o menor afinidad al péptido hacia ciertos fosfolípidos que se encuentran en la membrana de los glóbulos rojos. Como se ha reportado, la Arg tiene mayor afinidad hacia los fosfolípidos Zwitteriónicos, mientras que la Lys no; la membrana del glóbulo rojo al ser rica en fosfolípidos Zwitteriónicos, tiene una menor interacción electrostática con el péptido que contiene Lys; es por ello, que se lograron obtener bajos porcentajes de hemólisis en los péptidos sustituidos con Lys, con respecto a los que contienen Arg^{24,77}.

De este modo, se concluye que es factible realizar este tipo de sustituciones, puesto que además de mantenerse la actividad antibacteriana de los péptidos derivados de LfcinB sustituidos con Lys, también se disminuye la actividad hemolítica de los mismos; por otro lado, también se debe resaltar que, al realizar

la sustitución de Arg por Lys se reducen los costos de producción, y la dificultad de síntesis que esta conlleva.

7. CONCLUSIONES

- Los péptidos que contienen Lys que presentaron la mayor actividad antibacteriana para cada cepa fueron: $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_2$ contra *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 24 y 48 μM , respectivamente), y $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_4$ contra *S. aureus* ATCC 25923 (MIC 47 μM).
- El dímero $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_2$ presentó efecto bacteriostático contra a *E. coli* ATCC 25922 y bactericida contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 y el tetrámero, y $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_4$ efecto bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923 hasta las 48 h de incubación.
- Se obtuvieron menores porcentajes de hemólisis (0-5%) en los péptidos con Lys en el caso del dímero $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_2$ y el tetrámero $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_4$, comparado con los péptidos con Arg (0-22%), esto potencia su aplicación como futuros agentes terapéuticos.
- Se identificaron tres péptidos promisorios para cepas Gram negativas: $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_2$, $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_4$, $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (21-25)}_{\text{pal}}$ y un péptido de amplio espectro : $^{(R \rightarrow K)}\text{LfcinB (20-25)}_4$, para los cuales se obtuvo un bajo porcentaje de hemólisis; estos péptidos podrían ser considerados como posibles candidatos para ser usados como agentes terapéuticos antibacterianos con el fin de darle solución a la problemática de la resistencia antibacteriana; teniendo en cuenta que se obtuvieron moléculas con gran actividad antibacteriana, bajo porcentaje de hemólisis, mediante procesos de síntesis de bajo costo.

8. RECOMENDACIÓN

Llevar a cabo ensayos en aislados clínicos tanto susceptibles, como resistentes a antibióticos convencionales, adicionalmente evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos promisorios en modelos *in vivo*, con el objetivo de avanzar a la siguiente fase de estudio, y a futuro llegar a ser distribuidos comercialmente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS | ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? WHO [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 21]; Available from: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
2. OMS. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2019 Aug 21]. Available from: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/
3. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [cited 2019 Apr 3]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. WHO | High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. WHO [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 26]; Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>
5. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [cited 2019 Apr 3]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
6. Luján DA. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. Acta Bioquim Clin Lat. 2014;48(1). Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n4/v48n4a09.pdf>
7. J J Álvarez CA, Leal AL, Pérez MDJ, Navarrete ML. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* : 2005;53(1):27–34.
8. Oñate JF, Manrique M, Patiño E. Actividad Antimicrobiana De Péptidos Catiónicos Diseñados A Partir De Un Péptido Neutro. Acta Biológica Colomb [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Feb 27];22(2):157–64. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/59665/html>

9. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* [Internet]. 1992 Dec [cited 2019 Feb 26];73(6):472–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1490908>
10. Téllez G, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos Antimicrobial. *Rev NCBI*. [Internet]. Vol. 14. 2010 [cited 2019 Feb 27]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
11. van Nispen JW. Synthesis and analysis of (poly)peptides. *Pure Appl Chem* [Internet]. 1987 Jan 1 [cited 2019 Feb 26];59(3):331–44. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue-3/pac198759030331/pac198759030331.xml>
12. Correa Gómez E, Orduz S. Evaluación De Péptidos Sintéticos Sobre Bacterias, Levaduras Y Mohos. 2012
13. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun*. 1993;61(2):719–28.
14. Arnold RR, Brewer M GJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* [Internet]. 1980 [cited 2019 Aug 22];28(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6772569>
15. Coveñas C, Dextre G, Fernandez D, Mosquito S, Ochoa T. Efecto De Lactoferrina Bovina En La Formación de Biofilms En Cepas Clínicas De *E. coli* Enteroagrativa. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):454–60.
16. Aguilera O, Ostolaza H, Quirós LM, Fierro JF. Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett*. 1999;462(3):273–7.
17. Pires J, Siriwardena TN, Stach M, Tinguely R, Kasraian S, Luzzaro F, et al.

- In Vitro* Activity of the Novel Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Feb 26];59(12):7915–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459893>
18. Mishra A, Choi J, Moon E, Baek K-H. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules* [Internet]. 2018 Apr 2 [cited 2019 Feb 26];23(4):815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614844>
 19. León MA, Leal AL, Almanzar GA, Rosas JE, García JE, Rivera ZJ. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 27];2015:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/453826/>
 20. Huertas NDJ, Vargas Y, Gómez AK, Hernández E, Leal AL, Melo JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*. 2017;22(3):1–10.
 21. Vargas Y, Rodríguez AV, Cardenas KJ, Leal AL, Muñoz LC, Fierro R, et al. Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Adv* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2019 Mar 17];9(13):7239–45. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA00708C>
 22. Arias M, Piga K, Hyndman M, Vogel H. Improving the Activity of Trp-Rich Antimicrobial Peptides by Arg/Lys Substitutions and Changing the Length of Cationic Residues. *Biomolecules* [Internet]. 2018 Apr 19 [cited 2019 Feb 26];8(2):19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29671805>
 23. Pastroián MB. Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos con

actividad antitumoral y antimicrobiana aumentada: ¿Futuros péptidos terapéuticos? Universidad Nacional de Quilmes; 2017.

24. Yang ST, Shin SY, Lee CW, Kim YC, Hahm KS, Kim J II. Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrypticin adopting a unique amphipathic turn structure. *FEBS Lett.* 2003;540(1–3):229–33.
25. Chen PW, Shyu CL, Mao FC. Antibacterial activity of short hydrophobic and basic-rich peptides. *Am J Vet Res.* 2003;64(9):1088–92.
26. González M, Galán J, Morales F, Otero A. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Rev Cubana Med Trop [Internet].* 2017 Jul 17 [cited 2019 Feb 27];69(2). Available from: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/197/155>
27. Zhang LJ, Gallo R. Antimicrobial peptides. *Current Biology Magazine [Internet].* 2016 [cited 2019 Feb 27]; Available from: https://ac.els-cdn.com/S0960982215014098/1-s2.0-S0960982215014098-main.pdf?_tid=93aa3674-3b8b-4cf6-bde7-f7ddd8acad96&acdnat=1551309799_1523cd05fc1100712afa6840d0912fb4
28. Michea M, Briceño C, Alcota M, Gonzalez F. Péptidos antimicrobianos y mediadores lipídicos: rol en las enfermedades periodontales. *Rev Clin Periodoncia Implant Rehabil Oral [Internet].* 2016 [cited 2019 Feb 27]; Available from: https://ac.els-cdn.com/S0718539116000227/1-s2.0-S0718539116000227-main.pdf?_tid=6db8537c-8988-4b6b-b13e-b5fab32d9e30&acdnat=1551310505_2619ca567787ec40b5354afa27523f88
29. Castañeda J, Ortega JA, Marcela A, Aquino A, Serafín J, Estrada S, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Rev Artemisa.* 2009;18:16–29.
30. Drago ME. Lactoferrina: Producción Industrial Y Aplicaciones. *Rev Mex Ciencias Farm [Internet].* 2007 [cited 2019 Apr 2];38:34–5. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/242304368_Lactoferrina_produccion_industrial_y_aplicaciones_Lactoferrin_industrial_production_and_applications

31. BioGanmor. ¿POR QUÉ LACTOFERRIN GOLD 1.8®? - bioganmor [Internet]. [cited 2019 Apr 2]. Available from: <https://bioganmor.eu/es/content/11-Lactoferrin-Gold-1-8-Natural-Prebiotic-Supplement-Health-Benefits>
32. LifeExtension. Lactoferrin (apolactoferrin) [Internet]. [cited 2019 Aug 21]. Available from: <https://www.lifeextension.com/vitamins-supplements/item01681/lactoferrin-apolactoferrin-caps>
33. Vernot JP, García JE, Rivera ZJ, Rosas JE, Conget P, Solarte VA, et al. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174707.
34. Solarte VA, Rosas JE, Rivera ZJ, Arango ML, García JE, Vernot JP. A Tetrameric Peptide Derived from Bovine Lactoferricin Exhibits Specific Cytotoxic Effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma Cell Lines. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 Nov 2 [cited 2019 Feb 26];2015:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/630179/>
35. Huertas NDJ. Síntesis de péptidos derivados de la lactoferricina bovina y evaluación de su actividad antibacteriana. 2016.
36. Solarte VA. Péptidos derivados de lactoferricina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. 2016;127.
37. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli*

- serotype O111. *Infect Immun* [Internet]. 1998 Jun [cited 2019 Mar 17];66(6):2434–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596699>
38. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Nov 2 [cited 2019 Mar 17];62(22):2588–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261252>
 39. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein [Internet]. Vol. 2013, *International Journal of Peptides*. Hindawi; 2013 [cited 2019 Mar 17]. p. 390230. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554820>
 40. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties [Internet]. Vol. 40, *Molecular Immunology*. 2003 [cited 2019 Mar 17]. p. 395–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568385>
 41. Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol* [Internet]. 2002 [cited 2019 Mar 17];80(1):109–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908633>
 42. Flórez JM, Perullini M, Jobbágy M, Cano H. Enhancing antibacterial activity against *Escherichia coli* K-12 of peptide Ib-AMP4 with synthetic analogues. *Int J Pept Res Ther*. 2014;20(3):365–9.
 43. Thevissen K, François IEJA, Sijtsma L, Van Amerongen A, Schaaper WMM, Meloen R, et al. Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*. 2005 Jul;26(7):1113–9.
 44. Hurtado VL, Gutiérrez L, Torres DM Digestible lysine levels for japanese

- quail in laying phase. *Investig Rev Med Vet Zoot* [Internet]. 2015 [cited 2019 Nov 7];62(3):50–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v62n3.54941>
45. Moreno R. *Escherichia coli*: Generalidades de la *E. coli* [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <http://e-coli-ntic-unison.blogspot.com/2015/03/generalidades-de-la-ecoli.html>
 46. Fernández R, Rodríguez C, Rodríguez DA, Gómez F. *Escherichia coli* como causa de diarrea. *Revista cubana de pediatría* [Internet]. Vol. 75, *Revista Cubana de Pediatría*. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 1946 [cited 2019 Feb 26]. 0-0 p. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312003000300010&lng=es.
 47. Mexico. Secretaría de Salubridad y Asistencia. *Salud pública de México*. [Internet]. Vol. 44, *Salud Pública de México*. [Secretaría de Salubridad y Asistencia]; 2002 [cited 2019 Feb 26]. 464-475 p. Available from: <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6416>
 48. Bush LM. Infecciones por *Escherichia coli* - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-escherichia-coli>
 49. Betrán A, Cortés AM, López C. Evaluation of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in urinary tract infections in Primary Care Barbastro Sector (Huesca) [Internet]. Vol. 28, *Rev Esp Quimioter*. 2015 [cited 2019 Feb 26]. Available from: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/28/5/betran.pdf>
 50. Echevarría J, Osos F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico [Internet]. 2006 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <http://www.umm.edu/patiented/articles/>

51. *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers ATCC ® 25922 [Internet]. [cited 2019 Apr 3]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/25922.aspx>
52. *P. aeruginosa*. Fichas de agentes biológicos [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Pseudomonas aeruginosa 2017.pdf>
53. Guzmán AB. Identificación De *Pseudomonas aeruginosa* en el Equipo de Anestesia Inhalatoria En 20 Clínicas y Hospitales Veterinarios de la Ciudad de Quito Mediante Estudios Microbiológicos [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 26]. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5247/5/UDLA-EC-TMVZ-2016-02.pdf>
54. Bundy JG, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*; Morfología, medios de cultivo, enfermedades y más. [Internet]. Vol. 9, PLoS ONE. 2015 [cited 2019 Feb 27]. p. e81604. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081604>
55. Infecciones por *Pseudomonas* - Infecciones - Manual MSD versión para público general [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-pseudomonas>
56. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. 2004 [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/PSEUDOMONAS-AERUGINOSA.pdf>
57. Villa LM, Cortés JA, Leal AL, Meneses A, Meléndez MP. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. Rev Chil infectología [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Feb 26];30(6):605–10. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000600005&lng=en&nrm=iso&tlng=en

58. Pardo F, Dolores M, García E, Granados J, Campos A, Moreno R. *Pseudomonas aeruginosa*, Resistencia Antimicrobiana, Seguimiento de Resistencias [Internet]. 2010 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/23/1/pardo.pdf>
59. *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC ® 27853 TM [Internet]. [cited 2019 Apr 3]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/27853.aspx#history>
60. Gil M. *Staphylococcus aureus*: características, morfología, patogenia [Internet]. Vol. 28, lifeder.com. [cited 2019 Feb 26]. p. 603–61. Available from: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00134-14>
61. Cervantes E, García R, Salazar M, Schettino P. Características generales del *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 61, Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2014 [cited 2019 Feb 26]. Available from: www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
62. Infecciones por *Staphylococcus aureus*- Infecciones - Manual Merck versión para el público general [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://www.merckmanuals.com/es-pr/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-staphylococcus-aureus>
63. Bush LM. Infecciones por estafilococos - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>
64. Sánchez A. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 5, www.medigraphic.org.mx. 2012 [cited 2019 Feb 26]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2012/eo123b.pdf>
65. Foodsafety.gov. *Staphylococcus*. [cited 2019 Feb 27]; Available from: <https://espanol.foodsafety.gov/intoxicación/causas/bacteriasvirus/staphyloco>

ccus/xmd/indice.html

66. Manejo antibiótico de infecciones por *S. aureus* - Artículos - IntraMed [Internet]. 2010 [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=66609>
67. Camarena JJ, Sánchez R. Infección Por *Staphylococcus aureus* Resistente A Meticilina [Internet]. [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
68. Llor C, Boada A, Pons M, Grenzner E, Juvé R, Almeda J. Sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* en personas portadoras nasales sanas en atención primaria en el área de Barcelona.. Atención Primaria [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Feb 26];50(1):44–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656716303675>
69. *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Rosenbach ATCC ® 25923™ [Internet]. [cited 2019 Apr 3]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/25923.aspx#history>
70. Weinstein Mp. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically [Internet]. CLINICAL AND LABORATORY; 2018 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
71. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This document provides procedures for determining the lethal activity of antimicrobial agents [Internet]. 1999 [cited 2019 Feb 27]. Available from: www.clsi.org.
72. Vargas Y, Rodríguez JA, Umaña YA, Leal AL, Almanzar G, García JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell

- Lines. *Molecules*. 2017;22(10):1–11.
73. Tokunaga Y, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H. Antibacterial activity of bactenecin 5 fragments and their interaction with phospholipid membranes. *J Pept Sci*. 2001;7(6):297–304
 74. Chen J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA, Fujii CA, Mosca DA, et al. Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: Structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolym - Pept Sci Sect*. 2000;55(1):88–98
 75. Vargas Y. Evaluación De La Actividad Antibacteriana De Péptidos Diméricos Y Tetraméricos Derivados De Lactoferricina Bovina Contra Bacterias Gram Positivas Y Gram Negativas. 2018;100.
 76. Sitaram N, Chandy M, Pillai V Nr. Change of Glutamic Acid to Lysine in a 13-Residue Antibacterial and Hemolytic Peptide Results in Enhanced Antibacterial Activity without Increase in Hemolytic Activity. 1992;2468–72.
 77. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*. 2018;8(1).

10. ANEXOS

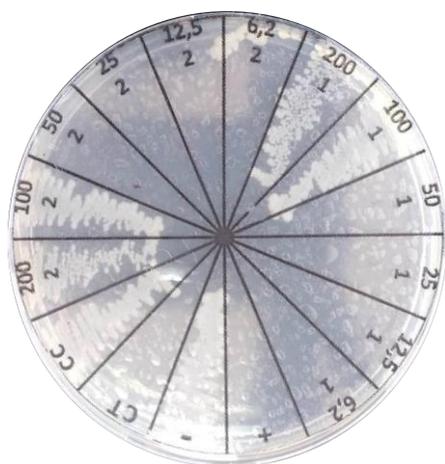
10.1. Anexo 1

Absorbancias de las CMI y CMB

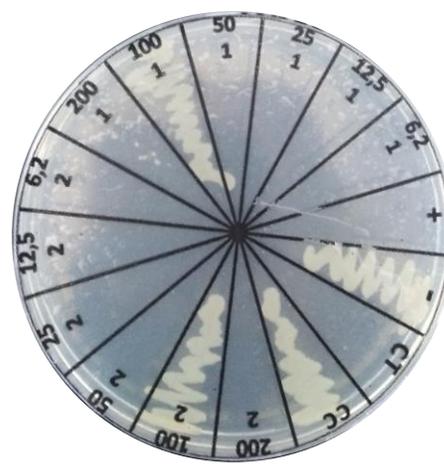
Valores de las absorbancias leídas a una longitud de onda de 630 nm. Se encuentra resaltado en rojo la absorbancia correspondiente a la CMI.

Escherichia coli ATCC 25922

Monómeros Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25)										
Rep 1	0,162	0,640	0,772	0,817	0,807	0,849	0,137	0,674	0,141	0,909
Rep 2	0,149	0,330	0,733	0,789	0,800	0,857	0,132	0,732	0,145	0,910
^(R->K) LfcinB(20-25)										
Rep 1	0,118	0,224	0,455	0,414	0,575	0,601	0,166	0,322	0,112	0,675
Rep 2	0,327	0,332	0,445	0,494	0,482	0,602	0,210	0,286	0,112	0,644

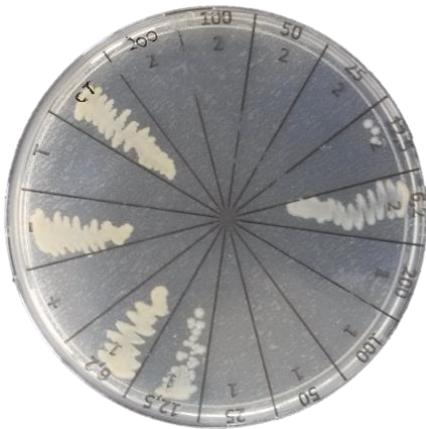


LfcinB (20-25)
> 200 µg /mL



^(R->K)LfcinB(20-25)
200 µg /mL

Dímeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₂										
Rep 1	0,200	0,147	0,149	0,144	0,124	0,262	0,133	0,321	0,425	0,144
Rep 2	0,187	0,139	0,138	0,129	0,129	0,294	0,133	0,302	0,429	0,147
^(R->K) LfcinB(20-25) ₂										
Rep 1	0,116	0,116	0,131	0,453	0,561	0,503	0,166	0,322	0,112	0,675
Rep 2	0,112	0,129	0,107	0,379	0,578	0,589	0,210	0,286	0,112	0,644

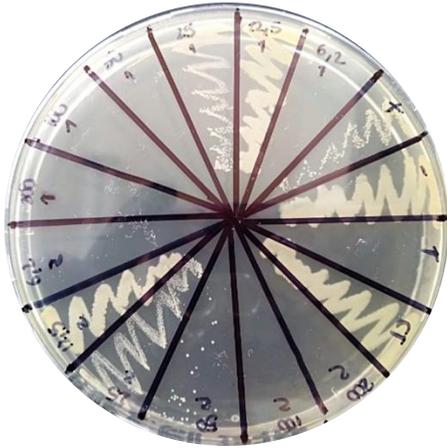


LfcinB (20-25)₂
25 µg /mL

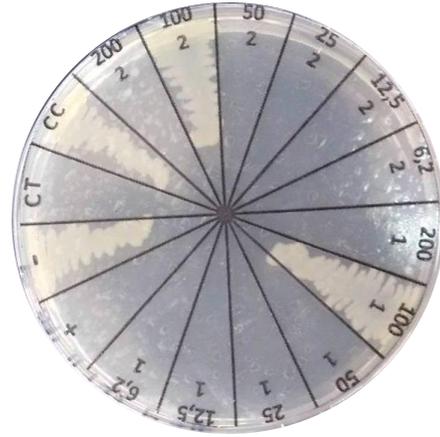


^(R->K)LfcinB(20-25)₂
50 µg /mL

Tetrámeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₄										
Rep 1	0,109	0,188	0,183	0,239	0,721	0,786	0,137	0,674	0,141	0,909
Rep 2	0,156	0,179	0,158	0,753	0,749	0,821	0,132	0,732	0,145	0,910
^(R->K) LfcinB(20-25) ₄										
Rep 1	0,150	0,497	0,576	0,606	0,664	0,645	0,139	0,484	0,145	0,783
Rep 2	0,147	0,499	0,581	0,591	0,636	0,701	0,152	0,503	0,135	0,649

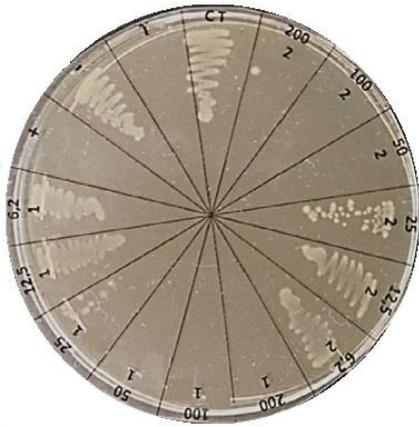


LfcinB (20-25)₄
50 µg/mL

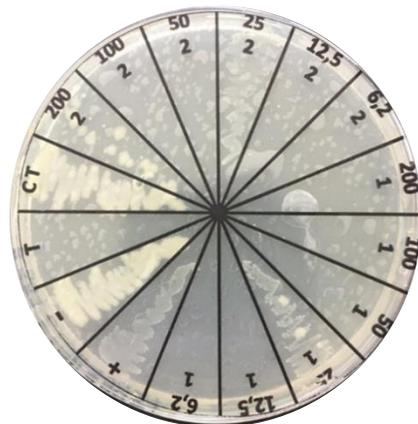


(R->K)LfcinB(20-25)₄
200 µg/mL

Palíndromos										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg/mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (21-25) _{pal}										
Rep 1	0,180	0,174	0,150	0,170	0,223	0,407	0,137	0,674	0,141	0,909
Rep 2	0,163	0,190	0,160	0,137	0,143	0,132	0,132	0,732	0,145	0,910
(R->K)LfcinB(21-25) _{pal}										
Rep 1	0,131	0,117	0,129	0,822	0,912	0,928	0,129	0,792	0,115	0,941
Rep 2	0,123	0,114	0,162	0,676	0,890	0,909	0,140	0,792	0,119	0,951



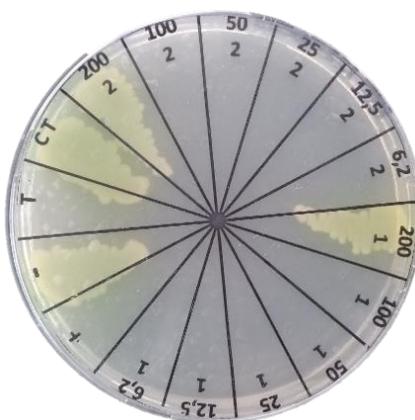
LfcinB (21-25)_{pal}
50 µg/mL



(R->K)LfcinB(21-25)_{pal}
50 µg/mL

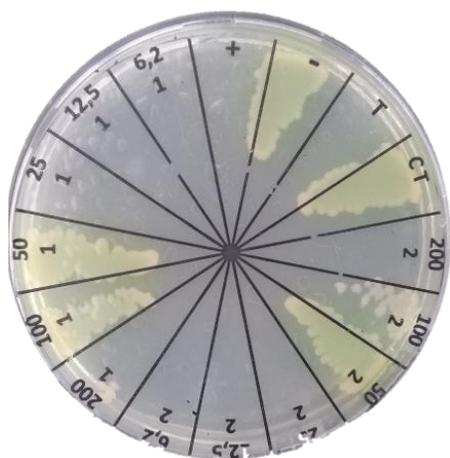
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Monómeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25)										
Rep 1	0,133	0,561	0,854	0,888	0,947	1,020	0,110	0,685	0,107	0,893
Rep 2	0,114	0,655	0,878	0,917	0,971	1,013	0,106	0,671	0,103	0,900
^(R->K) LfcinB (20-25)										
Rep	0,453	0,532	0,676	0,654	0,576	0,686	0,145	0,436	0,723	0,138
Rep 2	0,445	0,564	0,685	0,690	0,683	0,661	0,149	0,428	0,713	0,140

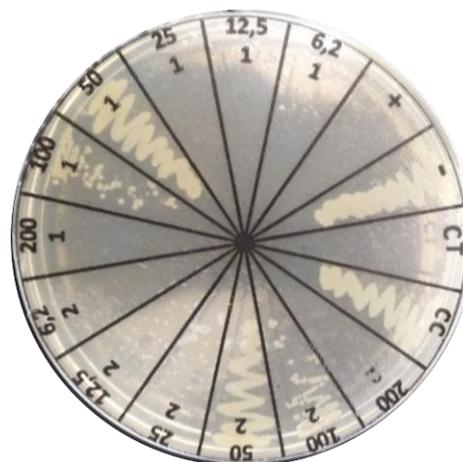


LfcinB (20-25)
>200 µg /mL

Dímeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₂										
Rep 1	0,155	0,129	0,181	0,702	0,868	0,958	0,110	0,685	0,107	0,893
Rep 2	0,153	0,120	0,190	0,692	0,855	0,950	0,106	0,671	0,103	0,900
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂										
Rep 1	0,133	0,140	0,485	0,522	0,578	0,561	0,121	0,562	0,137	0,728
Rep 2	0,130	0,137	0,393	0,517	0,485	0,502	0,128	0,554	0,138	0,692

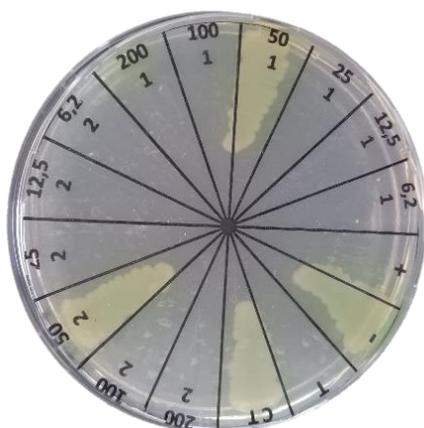


LfcinB (20-25)₂
200 µg /mL

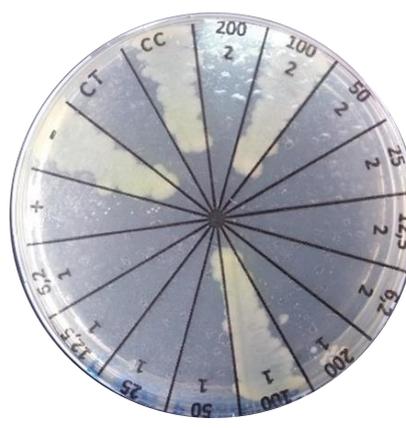


^(R->K)LfcinB (20-25)₂
200 µg /mL

Tetrámeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₄										
Rep 1	0,216	0,133	0,326	0,818	0,937	0,961	0,110	0,685	0,107	0,893
Rep 2	0,236	0,137	0,236	0,790	0,925	0,982	0,106	0,671	0,103	0,900
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄										
Rep 1	0,115	0,558	0,618	0,699	0,715	0,707	0,145	0,436	0,723	0,138
Rep 2	0,141	0,600	0,601	0,610	0,678	0,721	0,149	0,428	0,713	0,140



LfcinB (20-25)₄
100 µg /mL

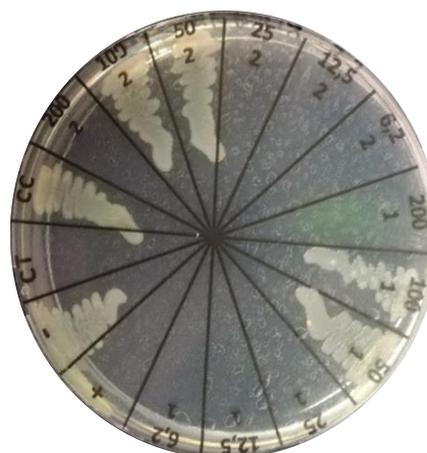


^(R->K)LfcinB (20-25)₄
200 µg /mL

Palíndromos										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (21-25) _{pal}										
Rep 1	0,130	0,132	0,401	0,452	0,608	0,671	0,117	0,501	0,119	0,801
Rep 2	0,142	0,125	0,378	0,584	0,475	0,599	0,119	0,504	0,120	0,800
^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}										
Rep 1	0,122	0,133	0,521	0,641	0,670	0,676	0,117	0,501	0,119	0,801
Rep 2	0,124	0,402	0,531	0,655	0,708	0,745	0,119	0,504	0,120	0,800



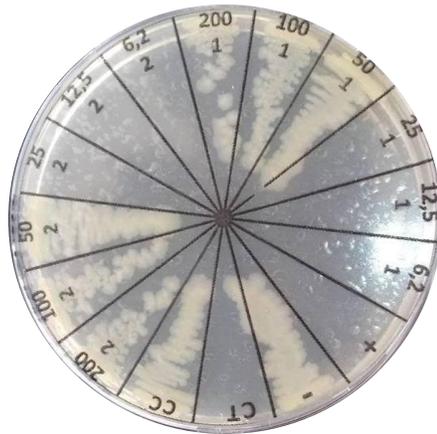
LfcinB (21-25)_{pal}
200 µg /mL



^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal}
200 µg /mL

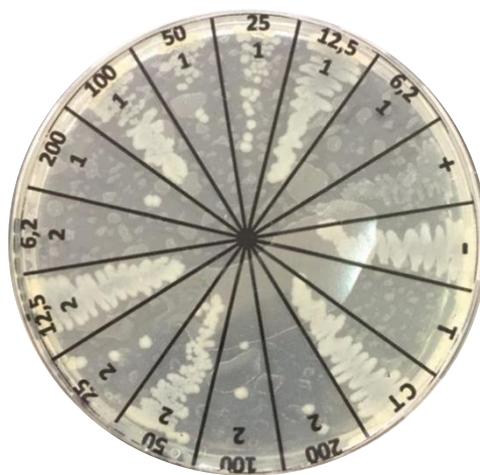
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Monómeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25)										
Rep 1	0,186	0,531	0,568	0,579	0,733	0,658	0,149	0,588	0,162	0,766
Rep 2	0,191	0,462	0,620	0,503	0,726	0,700	0,181	0,540	0,135	0,649
^(R->K) LfcinB (20-25)										
Rep 1	0,491	0,519	0,609	0,476	0,568	0,523	0,107	0,523	0,111	0,607
Rep 2	0,554	0,601	0,599	0,568	0,578	0,550	0,110	0,509	0,115	0,601



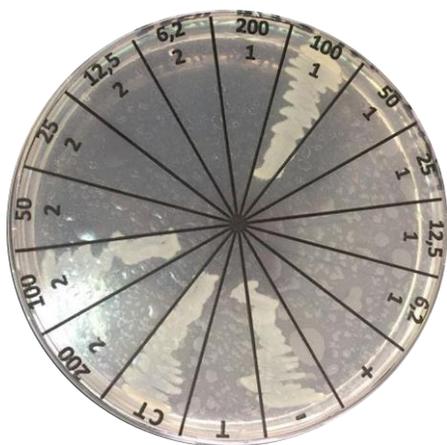
LfcinB (20-25)
>200 µg /mL

Dímeros										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg /mL)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₂										
Rep 1	0,146	0,480	0,393	0,562	0,601	0,569	0,156	0,447	0,127	0,502
Rep 2	0,133	0,302	0,456	0,540	0,598	0,612	0,122	0,438	0,135	0,591
(R→K) LfcinB (20-25) ₂										
Rep 1	0,402	0,434	0,476	0,475	0,547	0,534	0,107	0,523	0,111	0,607
Rep 2	0,308	0,423	0,459	0,477	0,508	0,596	0,110	0,509	0,115	0,601

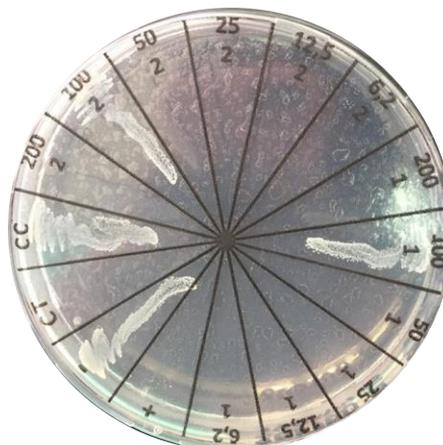


LfcinB (20-25)₂
200 µg /mL

Tetrámeros Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (20-25) ₄										
Rep 1	0,138	0,119	0,437	0,455	0,590	0,601	0,119	0,490	0,112	0,504
Rep 2	0,112	0,115	0,491	0,416	0,588	0,652	0,110	0,503	0,126	0,678
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄										
Rep 1	0,154	0,349	0,463	0,478	0,227	0,490	0,199	0,405	0,135	0,466
Rep 2	0,142	0,324	0,452	0,490	0,460	0,409	0,134	0,396	0,144	0,438

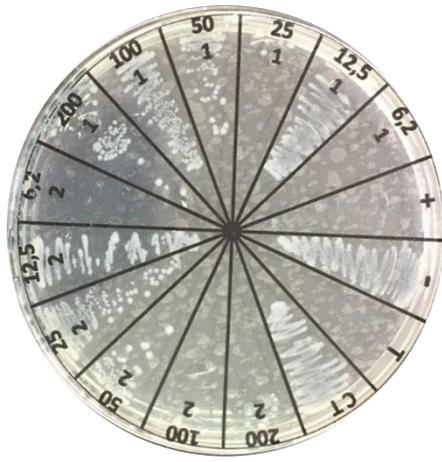


LfcinB (20-25)₄
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

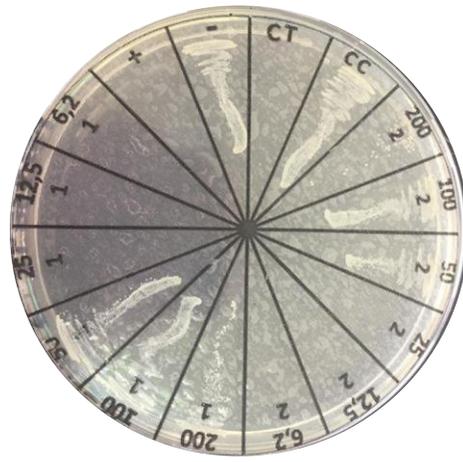


^(R->K)LfcinB (20-25)₄
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Palíndromos Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	100	50	25	12,5	6,2	Control (+)	Control (-)	CT	CC
LfcinB (21-25) _{pal}										
Rep 1	0,117	0,499	0,600	0,638	0,706	0,741	0,128	0,686	0,102	0,723
Rep 2	0,114	0,534	0,577	0,649	0,657	0,645	0,110	0,502	0,117	0,625
^(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}										
Rep 1	0,121	0,556	0,649	0,589	0,613	0,555	0,107	0,523	0,111	0,607
Rep 2	0,116	0,506	0,565	0,566	0,517	0,514	0,110	0,509	0,115	0,601



LfcinB (21-25)_{pal}
200 µg /mL



^(R->K)LfcinB (21-25)_{pal}
>200 µg /mL

10.2. Anexo 2

Porcentaje de Hemólisis

Valores de hemólisis de los péptidos evaluados

Péptido	% de Hemólisis					
	200 µg /mL	100 µg /mL	50 µg /mL	25 µg /mL	12,5 µg /mL	6,2 µg /mL
LfcinB (20-25)	1	1	1	1	1	1
^(R->K) LfcinB (20-25)	1	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4

Péptido	% de Hemólisis					
	200 µg /mL	100 µg /mL	50 µg /mL	25 µg /mL	12,5 µg /mL	6,2 µg /mL
LfcinB (20-25) ₂	4	2	2	2	1	1
^(R->K) LfcinB (20-25) ₂	3	3	2	2	1	1

Péptido	% de Hemólisis					
	200 µg /mL	100 µg /mL	50 µg /mL	25 µg /mL	12,5 µg /mL	6,2 µg /mL
LfcinB (20-25) ₄	22	17	14	10	7	4
^(R->K) LfcinB (20-25) ₄	3	2	2	1	1	1

Péptido	% de Hemólisis					
	200 µg /mL	100 µg /mL	50 µg /mL	25 µg /mL	12,5 µg /mL	6,2 µg /mL
LfcinB (20-25) _{pal}	19	7	7	5	4	3
^(R->K) LfcinB (20-25) _{pal}	5	5	4	4	3	2