



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

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C, 2019



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

Jennifer Pasachova Garzón
Sara Ramírez Martínez

Asesora interna
MsC. Liliana Constanza Muñoz Molina

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C, 2019

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por brindarme el apoyo, amor y comprensión necesarios a lo largo de mi carrera y en esta etapa principalmente por ser tan pacientes y darme toda la ayuda que necesité, al grupo REMA el cual nos brindó todas las ayudas posibles para desarrollar nuestro proyecto investigativo, a sus integrantes y a la profesora Liliana Muñoz quien nos guió en todo este proceso y sobre todo nos impulsó a desarrollar un trabajo de calidad. A las jóvenes investigadoras Laura Viuche, Claudia Cruz y Tatiana Duran, por toda su ayuda y conocimientos que permitieron culminar este trabajo de grado satisfactoriamente y sobre todo por brindarme su amistad y experiencias, las cuales seguramente me servirán en mi proyecto de vida. A los compañeros y amigos por sus palabras de apoyo y buenos deseos para culminar esta etapa con éxito.

Jennifer P.

Agradezco al grupo de investigación REMA y a sus integrantes, en especial a la profesora Liliana Constanza Muñoz Molina por su acompañamiento, dedicación y orientación en todo este tiempo para poder culminar con éxito este proyecto, a las jóvenes investigadoras Claudia Cruz, Laura Viuche y Tatiana Duran por su apoyo incondicional, por compartir su conocimiento tanto científico como de vida y siempre brindarme su ayuda en los momentos que más los necesite, a la profesora Ligia Consuelo Sánchez por representar una figura de sabiduría, responsabilidad y entrega y a su vez ser el adulto consiente y empático que todo joven merece tener al lado, a mi madre María Luz Martínez por ser ese claro ejemplo de amor, comprensión y apoyo lo cual me ha brindado a lo largo de mi vida y sobre todo en esta etapa tan importante y a mi padre Norberto Ramírez porque siempre creyó en mí, me brindó su amor y me impulsó a alcanzar mis metas.

Sara R.

Tabla de contenido

Resumen	10
Introducción	11
Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Justificación	13
1. Antecedentes	14
2. Marco Referencial	18
2.1 Generalidades	18
2.1.1 <i>E. coli</i>	19
2.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
2.1.3 <i>Citrobacter freundii</i>	21
2.1.4 <i>Proteus</i>	22
2.1.5 <i>Salmonella</i>	22
2.1.6 <i>Yersinia</i>	23
2.1.7 <i>Pseudomonas</i>	23
2.1.8 <i>Acinetobacter</i>	24
2.1.9 <i>Burkholderia</i>	24
2.2. Biopelícula	25
2.2.1 Etapas de formación de la biopelícula	25
2.2.2 Resistencia bacteriana mediada por biopelícula	26
2.3 Curvas de crecimiento bacteriano	27
2.4 Péptidos antimicrobianos	28
2.4.1 Péptido LL-37	28
3. Materiales y métodos	30
3.1 Cultivo de las bacterias	31
3.2 Escalas McFarland	31

3.3 Reconstitución de los péptidos	31
3.4 Curvas de crecimiento	32
3.5 Cristal violeta	33
3.6 Análisis estadístico	34
4. Resultados	34
4.1 Curvas de crecimiento	34
4.1.1 Comparación por genero bacteriano de las horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones	35
4.1.3 Alargamiento de la fase lag	48
4.1.4 Inhibición del crecimiento	49
4.1.5 Comparación de las curvas de crecimiento por péptido	50
4.2 Cristal violeta	67
5. Discusión	69
6. Conclusiones	74
7. Referencias	76

Índice de figuras

Figura 1. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas <i>E. coli</i> ATCC 18239 y <i>E. coli</i> nativa	35
Figura 2. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705 y 1706	36
Figura 3. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa <i>Citrobacter freundii</i> nativa	36
Figura 4. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	37
Figura 5. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. typhi</i>	38
Figura 6. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37)	

a todas las concentraciones en las cepas <i>Y. enterocolitica</i> ATCC 23715 y <i>Y. kristensenii</i> ATCC 33639	39
Figura 7. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>P. aeruginosa</i> nativa, <i>P. putida</i> ATCC 31483, <i>P. aeruginosa</i> PA01	40
Figura 8. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas <i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 49137 y <i>Acinetobacter baumannii</i> nativo	41
Figura 9. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25608	41
Figura 10. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas clínicas <i>P. aeruginosa</i> hemocultivo, <i>E. coli</i> hemocultivo, <i>K. pneumoniae</i> hemocultivo	43
Figura 11. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa <i>E. coli</i> nativa	44
Figura 12. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	44
Figura 13. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa <i>Acinetobacter baumannii</i> nativo	45
Figura 14. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705	45
Figura 15. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	46
Figura 16. Porcentaje de cepas que presentaron un alargamiento de la fase lag con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37 a todas las concentraciones utilizadas	47
Figura 17. Porcentaje de cepas que presentaron un alargamiento de la fase lag con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 a todas las concentraciones utilizadas.	48
Figura 18. Porcentajes de inhibición completa del crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37.	49
Figura 19. curva de crecimiento de <i>P. putida</i> ATCC 31483 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37 organizado por concentración	50

Figura 20. curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	50
Figura 21. curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	51
Figura 22. curva de crecimiento de <i>PA01</i> con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	52
Figura 23. curva de crecimiento de <i>B. cepacia</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	52
Figura 24. curva de crecimiento de <i>A. baumannii</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	53
Figura 25. curva de crecimiento de <i>Acinetobacter</i> ATCC 49137 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	54
Figura 26. curva de crecimiento de <i>E. coli</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	54
Figura 27. curva de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 18239 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	55
Figura 28. curva de crecimiento de <i>Y. kristensenii</i> ATCC 33639 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	56
Figura 29. curva de crecimiento de <i>Y. enterocolitica</i> ATCC 23715 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	56
Figura 30. curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	57
Figura 31. curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	58
Figura 32. curva de crecimiento de <i>S. typhi</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	58
Figura 33. curva de crecimiento de <i>S. entérica</i> ATCC 14028 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	59

Figura 34. curva de crecimiento de <i>P. vulgaris</i> ATCC 6380 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	60
Figura 35. curva de crecimiento de <i>C. freundii</i> nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	60
Figura 36. curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> hemocultivo con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	61
Figura 37. curva de crecimiento de <i>E. coli</i> hemocultivo con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	62
Figura 38. curva de crecimiento de <i>Klebsiella</i> hemocultivo con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración	63
Figura 39. curva de crecimiento de con <i>E. coli</i> nativa los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración	63
Figura 40. curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración	64
Figura 41. curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración	64
Figura 42. curva de crecimiento de <i>A. baumannii</i> nativa con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración	65
Figura 43. curva de crecimiento de <i>P. vulgaris</i> ATCC 6380 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 organizado por concentración	66
Figura 44. Placa de cristal violeta para las cepas ATCC estudiadas	67
Figura 45. Porcentajes de la formación de biopelícula por el método de Cristal violeta.	68

Índice de tablas

Tabla 1: cepas usadas en el estudio	30
Tabla 2. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas ATCC en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37	42
Tabla 3. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas clínicas en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37	43
Tabla 3. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas clínicas en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.	46

Tabla 4: rangos para determinar la formación de biopelícula	66
Tabla 5: resultados de la producción de biopelícula a las 24 horas de incubación.	67

Anexos

Anexo 1: Horas de significancia entre las cepas sin tratamiento y tratadas con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 a 5µM, 2.5µM, 1,5µM y 0.62µM	83
Anexo 2: Horas de significancia entre las cepas sin tratamiento y tratadas con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 5µM, 2.5µM, 1,5µM y 0.62µM	85
Anexo 3: Información de las cepas del estudio	88

Resumen

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido con el paso de los años en un problema de salud pública, esto por el uso indiscriminado de antibióticos; asimismo factores como la transferencia horizontal de genes de resistencia o la producción de biopelícula contribuyen al aumento de esta problemática, generando que cada vez sea más complicado dar un tratamiento para infecciones bacterianas y reduciendo el número de antibióticos efectivos para la resolución de una enfermedad y aumentando la morbimortalidad.

Debido a esto se han propuesto distintos tratamientos alternativos al uso tradicional de antibióticos, uno de estos es el uso de péptidos antimicrobianos los cuales han mostrado la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Uno de los péptidos antimicrobianos más importante es el péptido LL-37 que es miembro de la familia de las catelicidinas y en el cual se ha evaluado su acción sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus* mostrando resultados positivos en la inhibición de este microorganismo, es por esto que se evaluó la actividad de este péptido y sus derivados en el crecimiento y formación de biopelícula de cepas clínicas y ATCC de bacilos Gram negativos, los cuales son causantes de numerosas enfermedades a nivel mundial.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, bacilos Gram negativos, biopelícula, péptidos antimicrobianos, LL-37.

Summary

Bacterial resistance to antibiotics has become a public health problem over the years, due to the indiscriminate use of antibiotics; Likewise, factors such as horizontal transfer of resistance genes or biofilm production contribute to the increase of this problem, making it increasingly difficult to treat bacterial infections and reducing the number of effective antibiotics for the resolution of a disease and increasing morbidity and mortality.

Due to this, different alternative treatments to the traditional use of antibiotics have been proposed, one of these is the use of antimicrobial peptides which have shown the ability to inhibit bacterial growth. One of the most important antimicrobial peptides is the LL-37

peptide that is a member of the cathelicidin family and in which its action on Gram positive bacteria such as *S. aureus* has been evaluated showing positive results in the inhibition of this microorganism, for this reason the activity of this peptide and its derivatives in the growth and biofilm formation of clinical and ATCC strains of Gram-negative bacilli were evaluated, which are the cause of numerous diseases worldwide.

Key words: bacterial resistance, Gram negative bacilli, biofilm, antimicrobial peptides, LL-37.

Introducción

Las bacterias Gram negativas son responsables de generar diferentes patologías, que van desde infecciones urinarias y gastrointestinales leves hasta complicaciones más severas como enfermedades nosocomiales y bacteriemias. Se describe que algunos de estos microorganismos presentan distintos mecanismos de resistencia a antibióticos como la expresión de Betalactamasas (BLEE y AmpC), topoisomerasas, baja permeabilidad en la membrana y formación de biopelículas, lo cual dificulta su tratamiento provocando importantes problemas de salud pública.(1)

En el año 2018 en Colombia, el Ministerio de salud y protección social reportaron una gran incidencia y prevalencia de infecciones nosocomiales relacionadas con la colonización de distintos dispositivos médicos por diversos patógenos, siendo los más importantes *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, seguido de bacterias Gram positivas y otras Enterobacterias; con un perfil de resistencia del 26.9% en *E. coli* en cefalosporinas de tercera generación, del 10% en carbapenémicos en bacterias fermentadoras y del 30% en bacterias no fermentadoras, todo esto asociado a la facilidad que tienen estos patógenos para crear biopelículas.(2)

La habilidad de formar biopelícula por parte de bacterias Gram negativas está descrita en mayor medida en bacterias del género *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. y *Citrobacter* spp. donde se ven involucrados diferentes elementos y mecanismos entre ellas, como la expresión de genes, proteínas, la utilización de moléculas específicas para activar y percibir las señales celulares, la conformación de los exopolisacáridos entre otros, dado que no todos los géneros que hacen parte de este grupo llevan a cabo el mismo proceso para la formación de biopelícula, sin embargo se tiene en común las consecuencias y el impacto que esta genera, contribuyendo a las infecciones y persistencia bacteriana. Debido a que se conoce que las bacterias que se presentan de esta forma son mucho más resistentes que las

que se encuentran en estado planctónico, se buscan nuevas terapias alternativas al uso de antibióticos, lo que ha llevado a implementar el uso de péptidos antimicrobianos. (3)

Los péptidos antimicrobianos son moléculas sintetizadas por diferentes organismos, haciendo parte de su sistema inmune innato. Se conoce que los PAM presentan diversos mecanismos por los cuales atacan a los patógenos, entre los cuales están la intervención en la síntesis de proteínas y ADN, la inactivación de LPS, entre otras, como también se les atribuye actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, por estos motivos se les han realizado modificaciones con el fin de mejorar estas acciones, generando una mayor eficiencia en su aplicabilidad como tratamiento alternativo contra infecciones bacterianas.(4)

Pregunta problema

¿Qué efecto tienen los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC-2, D-LL37 y LL-37 en el crecimiento de bacterias Gram negativas como *E. coli spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.* y *Yersinia spp.*?

Objetivos

Objetivo general

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

Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento que tienen los bacilos Gram negativos *E. coli spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.* y *Yersinia spp.*, en presencia de los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC-2, D-LL37 y LL-37.
2. Evaluar la formación y maduración de la biopelícula producida por las cepas clínicas y ATCC de bacilos Gram negativos *E. coli spp.*, *Klebsiella pneumoniae*

spp., *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.* y *Yersinia spp.*

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

Justificación

En Colombia la importancia clínica de las bacterias Gram negativas está dada por ser las responsables de múltiples patologías, donde se destacan las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), lo que indica que están altamente relacionadas con enfermedades intrahospitalarias, generando grandes problemas principalmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), debido a que estos pacientes están sometidos a diversos procesos invasivos, a la utilización de distintos dispositivos médicos y su sistema inmune se encuentra comprometido.

Según el reporte del INS del mes de Junio del presente año, se tienen porcentajes donde se estima que aproximadamente el 30% de los pacientes hospitalizados en las UCI adultos seguido de la UCI pediátrica y neonatal, desarrollan enfermedades nosocomiales, cuyas enfermedades se ven relacionadas a infecciones del torrente sanguíneo asociadas a catéteres, seguido de neumonías asociadas a ventilador e infecciones sintomáticas del tracto urinario, donde los principales agentes causales son bacterias Gram negativas, las cuales en los últimos años han venido aumentando su resistencia a los antibióticos. En el año 2011 se reportaron porcentajes de resistencia superiores al 11,6% a carbapenémicos y superiores al 25,6% a cefalosporinas de tercera generación, para el año 2016 se tienen reportes en los cuales bacterias como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, y *E. coli* presentan porcentajes de resistencia del 39%, 31% y de 14,4% respectivamente frente a carbapenémicos (2) (5)

En consecuencia a lo anterior es importante encontrar nuevas rutas o alternativas para dar solución al problema de la resistencia microbiana a antibióticos, por lo cual surge el presente trabajo de investigación que tiene como propósito conocer el efecto de los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL-37 sobre distintas bacterias Gram negativas, donde se evaluará cómo se ve afectado el crecimiento bacteriano y la formación de biopelícula, la cual está asociada a la colonización de dispositivos médicos y resistencia bacteriana, en cada una de las cepas a tratar; debido a que se conoce que estos péptidos han generado inhibición o disminución del crecimiento y la formación de biopelícula en bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, por lo cual se determinará si causan un efecto similar en las bacterias seleccionadas para este trabajo de investigación.

De los resultados que se obtengan del presente trabajo se pondrán brindar nuevas alternativas para el sector clínico frente al tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias Gram negativas, asimismo este trabajo de investigación aporta un beneficio para la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca debido a que se proporcionará conocimiento que podrá ser utilizado en futuras investigaciones afines con el tema tratado.

1. Antecedentes

La resistencia bacteriana es una problemática a nivel mundial que en los últimos años ha cobrado importancia debido a que el tratamiento de elección para las diversas infecciones causadas por los diferentes géneros bacterianos es el uso de antimicrobianos y dado a la variedad de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos que poseen estos microorganismos han perdido la susceptibilidad a la gran mayoría de antibióticos como lo reporta Ovalle M.V en Colombia mostrando que bacterias como *E. coli* presentan un aumento en la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, y un promedio de resistencia de 1,8 % a carbapenémicos. *K. pneumoniae* presentó un porcentaje de 37.5% de resistencia cefalosporinas de tercera generación y la resistencia a carbapenémicos aumentó significativamente del 2012 al 2014; en *P. aeruginosa* se presentó un porcentaje de 32.4% de resistencia a carbapenémicos. Estos resultados muestran el problema de resistencia antimicrobiana que hay en el país y la necesidad de implementar nuevas formas de tratamiento que reemplacen a las tradicionales. (6)

Por esta razón, se han realizado estudios para determinar la funcionalidad y viabilidad del uso de terapias alternativas donde encontramos los péptidos antimicrobianos a los cuales se les ha atribuido diferentes actividades destacándose sus funciones bacteriostáticas, bactericidas y la inhibición en la formación de biopelícula entre los cuales se encuentra el péptido LL37 y algunos de sus derivados.

En consecuencia, a esto es importante tener la mayor información de cómo están constituidos cuál es su estructuración, los mecanismos de acción que puedan tener y sus efectos. Sochackia K, y col (2011), usaron el método de microscopía de fluorescencia para identificar cómo es el proceso de ataque del péptido LL37 contra *E. coli* y cómo logra detener el crecimiento bacteriano. En el estudio se demostró que el ataque del péptido a la bacteria se puede dividir por fases, en la primera el péptido se une a la membrana externa, esto se da debido a la carga positiva del péptido y la carga negativa del LPS en el exterior de la membrana; en la segunda fase el péptido penetra la membrana externa lo que ocurre por la formación de poros, es importante mencionar que en esta fase el crecimiento celular empieza a detenerse; posteriormente en la fase 3 el péptido LL37 ingresa al espacio periplásmico de la bacteria, lo que genera que el crecimiento celular se detenga

completamente. Esta investigación se realizó con el fin de que los péptidos que se realicen en un futuro tengan un mecanismo de acción similar al de este péptido para que sean igual de útiles en la inhibición del crecimiento bacteriano. (7)

Moffatt J, (2013) quisieron demostrar el efecto del péptido LL37 sobre *Acinetobacter baumannii*, se probó su eficiencia en un cepa salvaje y en una cepa que tenía una deficiencia en el lipopolisacárido y por tanto no podía sintetizarlo; los resultados mostraron que a bajas concentraciones del péptido no había efecto sobre las cepas tratadas, sin embargo cuando se aumentaron las concentraciones del péptido a 1.25, 2.5, y 5µM se observó una disminución en la viabilidad celular, esta disminución se vio más marcada en la cepa con la deficiencia en el LPS, lo cual es inusual debido que el péptido LL37 tiene afinidad por el LPS, lo que demuestra que su presencia no es estrictamente necesaria para que este péptido pueda generar un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria. (8)

Feng X , (2013) realizaron pruebas para evaluar el péptido LL-37 y tres de sus fragmentos en aislamientos clínicos de *A. baumannii* donde se observó una mayor eficiencia a concentraciones más bajas del péptido LL-37 y del fragmento KS-30 en actividades bactericidas (100%), respecto a los fragmentos KR-20 y KR-12, también se determinó actividades de inhibición y dispersión de biopelículas siendo positivas para el péptido y sus tres fragmentos, donde el péptido LL-37 actuó en concentraciones más bajas que los fragmentos KS-30, KR-20 y KR-12. (9)

La formación de biopelícula es uno de los mecanismos más utilizados por estos patógenos para la persistencia y colonización de diferentes superficies debido a que le confiere a la bacteria una mayor resistencia a los antibióticos en comparación a su estado planctónico y se fomenta la expresión de diferentes proteínas de adhesión y moléculas de señalización, lo cual en el ámbito clínico es de gran importancia dado que la invasión a dispositivos médicos y las fallas terapéuticas son las principales consecuencias de este factor de virulencia y patogenicidad, por lo tanto el efecto antibiopelícula de estos péptidos es una de sus actividades más importantes por lo cual es necesario conocer sus efectos y capacidad de inhibición. Verhage, J y col (2008), determinó el efecto inhibitorio del péptido LL37 sobre la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que a concentraciones bajas del péptido (0.5 mg) se reducía hasta el 40% de la masa de la biopelícula y en concentraciones mayores la masa se reducía hasta en un 80%. También se determinó que este péptido afecta dos sistemas principales del Quorum Sensing de *P. aeruginosa*: los sistemas Las y Rhl, ocasionando que se genere una regulación baja de ciertos genes esenciales para este proceso de comunicación de la bacteria (10)

Hell E, y col (2010) se determinó el efecto inhibitorio del péptido LL37 sobre *Staphylococcus epidermidis*, se evidenció que a todas las concentraciones a las que se probó el péptido había una inhibición en la formación de biopelícula. Se demostró que a una concentración de 1 mg l⁻¹ del péptido la masa de la biopelícula fue menor al 60%, mientras que a una concentración de 16 mg l⁻¹ el efecto de inhibición de la biopelícula alcanzaba un 85%. En este estudio también se investigó si el péptido LL37 inhibía el crecimiento planctónico de la bacteria, sin embargo, no se observaron cambios significativos comparando el control con los cultivos tratados. (11)

Scott N Dean y col (2011). se realizaron ensayos en los cuales se evaluó las funciones anti-biopelícula en *S. aureus* de los péptidos LL-37 ATRA-1, -2, -1A, NA-CATH, , junto con el efecto de quiralidad del péptido LL-37 (D-L) por separado y en conjunto frente a las actividades antimicrobianas y anti-biopelícula, donde se concluye que a concentraciones menores respecto a los otros péptidos y en presencia de sal el péptido NA-CATH: ATRA1-ATRA1 inhibe la producción de biopelícula y presenta baja citotoxicidad, y frente a la evaluación de los isómeros del péptido LL-37 se determinó que por separado el isómero D presenta una menor actividad con respecto al L y, que en conjunto no inhiben la formación de biopelícula, sin embargo los dos se ven asociados en intervenir con el crecimiento y se presume que están relacionados en la interacción con las proteínas de adhesión de *S. aureus*.(12)

Dean S, y col (2011), realizaron experimentos para determinar la capacidad del péptido LL37 en su forma normal y de enantiómero (D-LL37) de inhibir el crecimiento y formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*; asimismo se evaluó el efecto del péptido NA-CATH y de sus variaciones (ATRA-1, ATRA-2, NA-CATH: ATRA1-ATRA1). Los resultados mostraron que el péptido LL37 en sus dos formas es efectivo tanto en la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* como en la disminución de biopelícula preformada, asimismo disminuyen la expresión de los genes rhlA y rhlB, relacionados con la formación de biopelícula. En esta investigación también se realizó un ensayo in vivo, utilizando larvas de la polilla *Galleria mellonella* e infectándolas con *P. aeruginosa* para observar el efecto protector de estos péptidos, de los cuales LL37 y D-LL37 demostraron ser efectivos. El péptido NA-CATH y sus variantes no mostraron efecto en la inhibición del crecimiento y formación de biopelícula, por otro lado, tampoco fueron eficientes para controlar la infección del ensayo in vivo. (13)

Dosler, S, y Karaaslan, E. (2014), usaron péptidos antimicrobianos y antibióticos para observar si estos podían inhibir o destruir la biopelícula producida por *Pseudomonas aeruginosa*, se usaron los péptidos LL37, CAMA, melittin, defensin y magainin II; los antibióticos usados fueron ceftazidima, tobramicina, ciprofloxacina, doripenem,

piperacilina y colistina. Los resultados mostraron que 3 de los 6 antibióticos (tobramicina, ciprofloxacina y colistina) fueron activos frente a la biopelícula de *P. aeruginosa*, mientras que 2 de los de los 5 péptidos (LL 37 y CAMA) tuvieron actividad anti biopelícula. Sin embargo, en el estudio aclaran que, aunque no todos los antibióticos y péptidos actuaron contra la biopelícula formada, todos si tuvieron acción inhibitoria contra la biopelícula preformada, lo que significa que todos los antibióticos y péptidos son aplicables ya sea en la fase temprana de formación de la biopelícula o cuando esta esté en su fase madura (14)

Shi P, Gao Y, Lu Z y Yang L (2014), demostrado el efecto anti-biopelícula del péptido, en biopelículas creadas de forma in vitro de *A. baumannii*, donde se estableció una CMI de 2.5 µg / ml para causar daños estructurales en la biopelícula y un daño gradual a medida que se aumentaba la concentración del péptido (15)

Spencer JJ y col (2018) evalúan el efecto del péptido LL-37 y WAM-1 en 7 aislamientos clínicos de *A. baumannii* donde se determinó acción inhibitoria en el crecimiento de algunas cepas e inhibición de la formación de biopelícula en la totalidad de los aislamientos por parte del péptido LL-37, sin embargo este no tuvo ningún efecto en biopelículas ya maduras en ninguna de las 7 muestras y las CMI para efecto antimicrobiano y anti-biopelícula fueron considerablemente más altos en comparación con el péptido WAM-1(16)

2. Marco Referencial

2.1 Generalidades

Los bacilos Gram negativos causan infecciones en los seres humanos, muchos de ellos pueden encontrarse en aguas, suelos, flora intestinal de animales y humanos, entre otros. (17) Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran las Enterobacterias, en las cuales se ha observado que su capacidad de diseminación es mayor que la de los cocos Gram positivos con una alta resistencia a los antibióticos, la cual está dada principalmente por: (18)

A. **Betalactamasas:** tienen la capacidad de hidrolizar el antibiótico, específicamente degradan el anillo betalactámico y en bacterias Gram negativas está determinada por la producción de enzimas codificadas por genes propios o adquiridos. Las betalactamasas más importantes en la actualidad son las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), clasificadas de acuerdo al tipo de antibiótico sobre el cual actúan, por ejemplo las penicilinas tienen efecto sobre las penicilinas y son betalactamasas clase A, las betalactamasas tipo AmpC y las carbapenemasas. (19,20)

B. **Alteración de los transportadores de membrana de tipo porina:**, se encuentra muy asociado con los cambios de permeabilidad en la membrana bacteriana.(21), en la familia *Enterobacteriaceae* las porinas son de gran tamaño, participan en el transporte de carbapenémicos, por lo cual un mecanismo de resistencia es su cierre o disminución de la permeabilidad de la membrana externa, por consiguiente los antibióticos no pueden ingresar al espacio periplasmático y al citoplasma para cumplir su función, lo que puede aumentar la resistencia bacteriana.(22,23)

C. **Expresión de las bombas de expulsión:** el uso de bombas de expulsión permite que la bacteria transporte el antibiótico al exterior, por lo tanto funciona como un sistema de eliminación de los antibióticos, el cual puede expresarse de forma permanente o intermitente. (20) (23)

Asimismo, cada *Enterobacteria* cuenta con mecanismos de virulencia y patogenicidad propios, que les confieren resistencia a los antibióticos y generan signos y síntomas particulares. A continuación, se detallan los factores de virulencia más importantes de los bacilos Gram negativos de mayor importancia clínica:

2.1.1 *E. coli*

Se caracteriza por ser el microorganismo más abundante del intestino grueso de los humanos, actualmente, se ha convertido en un patógeno debido a que es uno de los principales causantes de muerte por diarrea en el mundo. (24) La enfermedad diarreica aguda (EDA) afecta principalmente a niños menores de 5 años, aunque también puede afectar a adultos.

De acuerdo a los factores de virulencia y patogenicidad que presente *E. coli*, se pueden clasificar en 7 distintos patotipos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente difusa (ECAD)5 y *E. coli* adherente invasora (ECAI). (25)

- *E. coli* enteropatógena se encuentra clasificada en cepas típicas debido a la presencia del plásmido factor de adherencia (EAF), el cual genera una adhesión localizada de manera tridimensional en la célula, involucrando las fimbrias o pili formador de haces (BFP), lo que conlleva a una lesión denominada adherencia y eliminación (A/E), la cual ocasiona alteraciones en la región apical del enterocito, las microvellosidades y citoesqueleto del intestino; paralelo a esto se da otro tipo de adherencia mediado por la isla de patogenicidad LEE encargada de codificar el receptor de intimina translocado (Tir) que será colocado en los enterocitos para posteriormente reconocer la proteína intimina producida por el patógeno todo esto a partir del sistema de secreción tipo III. (25,28)
- *E. coli* enterotoxigénica es la principal causa de la diarrea del viajero debido a que se encuentra en aguas que no cumplen con las condiciones óptimas para la ingesta por el ser humano. Este microorganismo presenta como mecanismos de patogenicidad los factores de colonización o también denominados antígenos del factor de colonización los cuales son fimbrias o pilis, y la producción de dos toxinas la termolábil y la termoestable responsables de la unión con el receptor del enterocito y la interacción con los monofosfatos cíclico de la célula blanco, los cuales están involucrados en la regulación de canales iónicos, señalización en los enterocitos y secreción de fluidos, lo que genera en el individuo diarrea acompañada de una deshidratación severa (29,31)
- *E. coli* enteroinvasiva responsable de ocasionar inflamación, ulceraciones y alteraciones en la mucosa del colon, debido a sus factores de patogenicidad los cuales se

asemejan mucho a los del género bacteriano *Shigella* y se caracterizan por permitir la invasión de las células epiteliales, inducir apoptosis en los macrófagos y la colonización de células adyacentes sanas. Estos factores están codificados por el plásmido pINV donde se encuentran los genes que codifican a proteínas encargadas de la motilidad bacteriana, degradación de proteínas del huésped y modulación de la respuesta inmune, entre otras. (12) (32,33)

- *E. coli* shigatoxigenica o también conocida como enterohemorrágica es un patógeno zoonótico que afecta a los humanos, aves, equinos, porcinos, entre otros; la importancia clínica de este microorganismo está dada por provocar el síndrome hemolítico urémico y citotoxicidad en las células del riñón (vero). Esta bacteria es capaz de producir toxinas shiga (Stx) dividida en dos formas antigénicas donde la forma Stx2 y sus subtipos son las responsables de causar SHU y la sintomatología característica de la infecciones que van desde fiebre hasta diarrea sanguinolenta (12) (25),(34)

- *E. coli* enteroagregativa se caracteriza por generar una adherencia agregativa que se asemeja a una agrupación de ladrillos y expresar factores de virulencia que están dados por los genes aggR (factores de adherencia), EAST y ShET2, encargados de codificar toxinas termoestables y Shiga respectivamente y el plásmido Pet que favorece la formación abundante de moco y abscesos en el intestino (35,36)

- *E. coli* adherente difusa puede presentarse como el agente etiológico de la diarrea acuosa principalmente en niños menores de 5 años, esta bacteria causa lesiones y alterar las microvellosidades del intestino, generar una acumulación de actina y estimula la producción de IL8, debido a la presentación de un patrón de adhesión difusa y la expresión de diferentes factores de virulencia como las adhesinas codificadas por el operón alfa. (37,38)

- *E. coli* adherente invasora es un microorganismo asociado con diferentes patologías inflamatorias intestinales destacándose su participación en la enfermedad de Crohn alterando la mucosa del íleon, este patógeno es capaz de sobrevivir a la fagocitosis por parte de los macrófagos y replicarse dentro de estos (39,40).

En general los principales mecanismos de resistencia de este patógeno están dados por la codificación de betalactamasas, esta bacteria presenta de forma intrínseca en su cromosoma el gen encargado de codificar enzimas betalactamasas de clase C (Amp C), pero debido a la ausencia del gen promotor (ampR), la expresión de esta se da en cantidades muy bajas generando así sensibilidad a algunos betalactámicos, sin embargo con el pasar del tiempo se ha descrito la presencia de Amp C obtenidas a través de la transferencia de genes o plásmidos por parte de otros géneros bacterianos confiriéndole resistencia a cefamicinas, oximinocefalosporinas entre otros antibióticos (18) (41)

2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Es un microorganismo no móvil que puede desarrollar cápsula, la cual le da la capacidad de resistir la fagocitosis y además puede inhibir la activación del complemento, en especial del C3b y de acuerdo a sus determinantes antigénicos pueden encontrarse 77 serotipos diferentes. Se encuentra principalmente en la zona nasofaríngea, gastrointestinal y la piel causando diferentes patologías como neumonía necrotizante y endoftalmitis endógena entre otras. (42). La mayoría de cepas de *K. pneumoniae* son resistentes a la ampicilina, cefalosporinas y monobactámicos debido a la producción de betalactamasas (BLEE), cabe resaltar que las cepas productoras de BLEE también son resistentes a otros tipos de antibióticos, aunque por diferentes mecanismos de bloqueo de actividad del antibiótico. (43)

Entre las betalactamasas más importantes de este patógeno son las KPCs que presentan 12 variantes (KPC-2 a KPC-13), diferenciándose entre ellas por el cambio de 1 a 3 aminoácidos en su estructura, estas enzimas están codificadas por el gen bla KPC el cual puede ser movilizado entre distintos géneros y especies bacterianas por medio del transposón Tn 4401, la acción de esta carbapenemasas se da a partir de su unión con el grupo hidroxilo de la serina generando un complejo acil-enzima el cual será hidrolizado por un OH⁻, sin embargo este proceso puede ser inhibido por el ácido borónico. Las cepas KPC positivas aparte de generar multirresistencia, se les asocia la capacidad de cambiar la permeabilidad de su membrana externa dificultando la entrada del antibiótico. (44,48).

2.1.3 *Citrobacter freundii*

Se puede encontrar en aguas, suelos e intestino de animales y humanos; este patógeno puede causar infecciones del tracto urinario, infección en hígado, pulmones, meninges, intestino, tejidos blandos, entre otros, además pueden presentarse casos de mal pronóstico de bacteriemias donde se presenta alteración del estado mental, hipotermia, shock séptico, hiperbilirrubinemia, trombocitopenia, etc.; por otro lado *C. freundii* se encuentra muy asociado a las infecciones transmitidas por alimentos donde los principales factores de virulencia involucrados son las toxinas termoestables y toxinas tipo Shiga (49).

Debido a la transferencia horizontal de genes *C. freundii* es capaz de sintetizar enzimas betalactamasas de tipo BLEE, AmpC y KPC, lo que le confiere resistencia a diferentes betalactámicos como a las cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos, también se ha descrito la presencia de genes codificantes para los mecanismos de resistencia a quinolonas (PMQR), destacándose la presencia de los genes qnr los cuales protegen la ADN girasa y la topoisomerasa IV de la inhibición de las quinolona y aac (6')-Ib-cr un

aminoglucósido acetiltransferasa lo que lo hace menos susceptible a las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos (50,53).

2.1.4 *Proteus*

Presenta factores de virulencia como invasión a la célula del huésped y citotoxicidad, además posee ureasas que generan una sobreproducción de amoníaco ocasionando su precipitación y formando cálculos en vejiga y riñón; también secreta una proteasa que promueve la digestión de las inmunoglobulinas (54). Una característica singular de este patógeno es la producción de Swarming, fenómeno que puede observarse a simple vista en las placas donde se cultive este microorganismo, y es debido a que las diferentes células se organizan y se diferencian en células filamentosas, multinucleadas y altamente flageladas.

Asimismo *Proteus spp.*, presenta resistencia a ciertos antibióticos como las polimixina, tetraciclinas, cefuroxina, ampicilina entre otros, dado que naturalmente expresa betalactamasas cromosómicas de clase A, y debido a la transferencia horizontal de genes se han descrito algunas cepas principalmente de *P. vulgaris* de origen humano y animal que poseen genes de multiresistencia como el *pqrA* y el *cfr* este último siendo de origen estafilocócica, lo que ha generado una alza en las concentraciones mínimas inhibitorias en algunas quinolonas, cefalosporinas y otra clase de betalactámicos (55,58).

2.1.5 *Salmonella*

Es de amplia distribución mundial, principalmente aislados de alimentos (59) y causante de enfermedades gastrointestinales. La transmisión de esta bacteria puede darse de persona a persona, sin embargo, la más frecuente es de consumo de alimentos contaminados. Esta bacteria es un patógeno intracelular el cual utiliza las células hospederas para poder ser movilizadas a diferentes órganos y evadir la fagocitosis, tiene más de 2500 serotipos, siendo agrupados y clasificados por la presencia o ausencia y las variaciones de los antígenos O y H. (60)

Sus principales factores de virulencia están dados por los factores Sigma ss (RpoS), la respuesta adaptativa de tolerancia al ácido (ATR), lo que la ayuda a tolerar ambientes hostiles y 12 islas de patogenicidad destacándose la SPI-1, SPI-2 y SPI-3 que codifican para mecanismos de invasión, el sistema secreción tipo III, factores de transcripción y median la supervivencia intracelular en los macrófagos(61-63). La resistencia antimicrobiana de *Salmonella spp.* se ha generado en gran parte por los antibióticos usados en los animales como promotores del crecimiento, los cuales permanecen aún después de convertidos a alimentos (63).

2.1.6 *Yersinia*

Es un género de bacterias Gram negativas conformado por 17 especies, dentro de las cuales *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* pueden llegar a causar enfermedad en humanos, poseen un plásmido que recibe un nombre diferente dependiendo de la especie de *Yersinia*, el cual les permite evadir la fagocitosis y tomar control de los sistemas de señalización de las células hospederas. Especies como *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* generan cuadros gastrointestinales, mientras que *Y. pestis* es la más conocida por haber causado tres pandemias a lo largo de la historia, al ser transmitida de las pulgas al torrente sanguíneo de los mamíferos pudiendo generar infección pulmonar o peste bubónica. (64)

La resistencia a antibióticos de este género está relacionada con la ubicación geográfica y el serotipo que se analice, sin embargo, en términos generales se ha observado una alta resistencia a la ampicilina y a la cefalotina (del 85% al 95% de aislamientos clínicos y no clínicos), asimismo se presenta resistencia a la amoxicilina con porcentajes mayores del 75%. A pesar de que la mayoría de cepas estudiadas muestran susceptibilidad a las cefalosporinas de segunda y tercera generación y a los aminoglucósidos, han sido reportadas pocas excepciones que muestran resistencia a estos antibióticos. (65)

2.1.7 *Pseudomonas*

Este patógeno puede tolerar bajas concentraciones de oxígeno y crecer a temperatura de 37°C, sin embargo puede tolerar temperatura de 45-50°C. Causa infecciones nosocomiales como bacteriemia, infecciones del tracto urinario y se aísla en pacientes quemados; cuando la piel está quemada se destruye la primera barrera de defensa que se tiene (piel y microbiota normal), siendo esto utilizado para la colonización en primera instancia por bacterias Gram positivas seguidas de las Gram negativas, las cuales encontrarán un ambiente favorable para su desarrollo debido a la disminución de proteínas e inmunoglobulinas y a la falta de vascularización la cual es necesaria para el transporte de antibióticos (66), también tiene la capacidad de crecer en dispositivos médicos y diferentes superficies hospitalarias; debido a que afecta principalmente de individuos inmunocomprometidos, la infección por este microorganismo es muy difícil de erradicar, debido a que es altamente resistente a los antibióticos (67).

Las terapias convencionales para el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria se basan en el uso único o combinado de antibióticos, sin embargo, a lo largo de los años el tratamiento para esta bacteria se ha convertido en un reto debido a la multiresistencia que ha alcanzado. *P. aeruginosa* es resistente a los aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos, la resistencia mediada por este microorganismo puede

clasificarse en tres tipos: intrínseca, adquirida y adaptativa; la intrínseca usa bombas de expulsión y enzimas inactivadoras de antibióticos, la resistencia adquirida se basa en la transferencia horizontal de genes de resistencia y la adaptativa se relaciona con la producción de biopelícula como barrera para evitar el paso de los antibióticos. (68)

2.1.8 *Acinetobacter*

Es un microorganismo oportunista que puede permanecer por largos periodos de tiempo en hospitales, afectando principalmente pacientes que se encuentran en estado crítico, en este género bacteriano se pueden encontrar más de 32 genoespecies de las cuales *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosomialis* y *A. calcoaceticus* son indistinguibles fenotípicamente y genéticamente se encuentran muy relacionadas, por esta razón a este grupo se les ha denominado el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC), cuya importancia radica en que las especies involucradas son la principal causa de enfermedades nosocomiales y expresan múltiples mecanismos de resistencia, como lo es la producción de betalactamasas, las PMQR y las bombas de expulsión (69,71).

Su virulencia está dada por su capacidad de adhesión que le permite colonizar e invadir células epiteliales; la adhesión se logra gracias a la utilización de pilis y a la proteína de membrana externa OmpA interacciona con la fibronectina, permitiendo que la bacteria se adhiera a la célula y colonizarla, el polisacárido capsular K1 que retrasa la fagocitosis e impide la activación del complemento; un factor importante que favorece la resistencia de este microorganismo son las vesículas de membrana, que participan en la transmisión horizontal de genes de resistencia, además de servir como vehículo para que otros factores de virulencia ingresen a la células del huésped sin que haya un contacto estrecho entre la bacteria y la célula. (72)

2.1.9 *Burkholderia*

Los microorganismos que hacen parte del complejo *B. cepacia* (conformado por 20 especies aproximadamente) (73), se puede encontrar en tierra o en zonas húmedas como regaderas, aguas dulces (charcas, lagos e incluso ríos), lo que le confiere la capacidad de desarrollarse en fuentes de agua y sobrevivir por largos periodos de tiempo. Esta bacteria es oportunista y puede generar infecciones nosocomiales, afecta principalmente a pacientes con enfermedades de base como fibrosis quística y enfermedad granulomatosa crónica, causando cuadros de neumonía, peritonitis, infección de las vías urinarias, entre otros (74). Este patógeno cuenta con diferentes factores de virulencia como lo es la producción de sideróforos lo que le confiere una capacidad de unión y adquisición del hierro, aumentando la severidad de las infección; también es capaz de codificar el sistema de secreción tipo IV el cual le ayudan a transferir distintos factores de resistencia y patogenicidad; y

autoinductores para la formación de biopelícula como la hemoserina lactona la cual está involucrada en el quorum sensing. (75, 76)

La resistencia antimicrobiana de este género está dada por la presencia de betalactamasas principalmente de clase AmpC, un lipopolisacárido que genera resistencia natural a la polimixina y la expresión de bombas de flujo pertenecientes a la familia de división celular de nodulación de resistencia (RND) las cuales causa resistencia intrínseca a los aminoglucósidos y macrólidos, debido a esto, el tratamiento de elección para este patógeno son las cefalosporinas de tercera y cuarta generación(77).

Sin embargo, este microorganismo se utiliza en la industria agrícola donde actúa como agente biorremediador, ya que tiene la capacidad de degradar sustancias como herbicidas y pesticidas; también se ha observado que favorece el rendimiento de los cultivos y los protege de daños causados por hongos fitopatógenos. (73)

A pesar de que cada una de las bacterias tratadas cuenta con factores de virulencia y patogenicidad propios de su especie, también presentan factores comunes que contribuyen a la resistencia a los antibióticos; uno de los factores más importantes en la actualidad es la formación de biopelícula, de la cual se hablará a continuación.

2.2. Biopelícula

La producción de biopelícula contribuye a la resistencia bacteriana y está relacionada con los procesos de Quorum Sensing. El término biopelícula hace referencia a un conglomerado de bacterias adheridas a una superficie inerte o viva (78), formando una matriz extracelular (MEC) conformada por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos principalmente, los componentes de la matriz extracelular juegan un papel importante porque generan los espacios intersticiales donde circulan los nutrientes, oxígeno y desechos que son necesarios y secretados por las bacterias (79). De los componentes de la matriz extracelular el 97% es agua, las proteínas representan más del 2% del contenido y los polisacáridos, moléculas de ADN y ARN representan menos del 2% y 1% respectivamente (80). Las biopelículas pueden estar adheridas a superficies bióticas o abióticas y estar conformadas por una sola especie bacteriana o varias (81).

Aunque la formación de biopelícula contribuye al aumento de la resistencia bacteriana, también se ha reportado que pueden utilizarse en la degradación de materia orgánica e incluso se ha descrito que tienen la capacidad de purificar aguas residuales o agua contaminada con petróleo. (81)

2.2.1 Etapas de formación de la biopelícula

La formación de biopelículas comprende tres fases principales que son la adhesión, el

crecimiento y la separación:

Adhesión

La fase de adhesión a su vez puede dividirse en adhesión reversible e irreversible; en la primera las bacterias pueden desarrollar estructuras como fimbrias y fimbrillas que permiten la unión a una superficie, asimismo pueden expresar proteínas denominadas adhesinas que contribuyen a este proceso de adhesión (78), factores como la temperatura y la presión son importantes para que haya una buena adhesión, también en esta fase actúan fuerzas físicas como las fuerzas de Van der Waals, e interacciones estéricas y electrostáticas. En la etapa de adhesión irreversible están implicadas estructuras como las fimbrias, flagelos o pilis que superan las fuerzas de repulsión entre la capa eléctrica doble de la bacteria y la superficie, lo que permite que la bacteria se adhiera firmemente a la superficie a colonizar (81).

Crecimiento y maduración

En la fase de crecimiento las bacterias se unen irreversiblemente a la superficie, y se multiplican generando un aumento de sustancias poliméricas extracelulares que tienen la función de reforzar la adhesión celular (82), en esta fase la biopelícula comienza a crecer desde una capa delgada hasta formar una estructura en forma de seta o torre, donde las bacterias se organizan de acuerdo a su metabolismo y a su tolerancia aérea, por tanto las bacterias anaerobias estarán en la parte más profunda de la biopelícula evitando la exposición al oxígeno. Durante esta fase también se generan señales químicas que permiten la comunicación entre bacterias, estas señales se conocen como autoinductores y facilitan el proceso de Quorum sensing. (83)

Separación o dispersión

La etapa de separación o dispersión pueden generarse por varios factores como la gran cantidad de población, la falta de nutrientes o la competencia entre las distintas especies que conforman la biopelícula, y las bacterias que se separan pueden comenzar nuevas biopelículas en otras superficies (84).

2.2.2 Resistencia bacteriana mediada por biopelícula

Se han propuesto cuatro posibles hipótesis donde se detallan los mecanismos por los cuales la producción de biopelícula está implicada en los mecanismos de resistencia bacteriana. La primera hipótesis sugiere que la resistencia se da debido a que el antibiótico no puede penetrar completamente a la biopelícula e incluso este puede ser degradado. La segunda hipótesis sugiere que las bacterias al estar en un espacio donde deben compartir oxígeno y nutrientes, entran en un estado de lentificación en el cual hay cese de división celular, lo que conlleva a que no sean susceptibles a la actividad antimicrobiana del antibiótico. Por otro lado, la tercera hipótesis sugiere cambios genéticos en las bacterias que conforman la biopelícula, como la aparición de genes específicos que potencien la resistencia bacteriana.

La cuarta hipótesis plantea la formación de esporas, que permite que una subpoblación de bacterias forme una biopelícula que sea resistente a antibióticos aun cuando este recién formada. (79)

Teniendo una visión más clara de los factores propios y comunes de las diferentes especies de bacilos Gram negativos estudiados, hay que tener en cuenta también el proceso de crecimiento bacteriano y las condiciones del medio que puedan afectar o favorecer este proceso. Asimismo, es importante hacer una revisión de la forma de medir el crecimiento exponencial de las bacterias, el cual se realiza a través de curvas de crecimiento.

2.3 Curvas de crecimiento bacteriano

Las fases del crecimiento bacteriano se pueden clasificar en 4 fases que se encuentran determinada por distintos factores como la temperatura, la composición del medio, la especie bacteriana, entre otros. Estas fases son: fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. (84)

Fase Lag: ocurre una adaptación donde el microorganismo reconocerá el nuevo ambiente al que será sometido y se preparará para comenzar un nuevo ciclo celular.

Fase exponencial: donde se inician los procesos metabólicos los cuales se dan a partir de la fermentación, la cual es una reacción de óxido-reducción donde ocurre una oxidación parcial del carbono y la transferencia de electrones no necesita de un aporte exógeno, el proceso de respiración ya sea anaerobia o aerobia donde se encuentran tres vías: la vía Embden Meyerhof (glucolítica), la vía de la pentosa fosfato y la vía de Entner-Doudoroff, en las cuales los sustratos son oxidados a CO_2 y el aceptor final de electrones son compuestos inorgánicos o moléculas de oxígeno, esto con el fin de obtener la energía y los nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción, lo que genera un aumentando de forma exponencial el número de células. En el caso de los géneros *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. y *Proteus* spp., su ruta metabólica es la de los ácidos mixtos en la cual se fermentan las hexosas produciendo CO_2 , ácido láctico, ácido acético y fórmico, los géneros y especies *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* y *Citrobacter* spp. utilizan la vía butanodiólica donde a partir del piruvato se produce acetona para posteriormente convertirse en 2,3-butanodiol, en el género *Pseudomonas* spp., debido a la ausencia de la enzima fosfofructoquinasa, no se puede sintetizar la fructosa 1,6-difosfato (compuesto de la vía glucolítica), lo que hace que esta bacteria tenga como ruta metabólica la vía de Entner-Doudoroff en la cual a partir de un piruvato y la oxidación del glicoraldehído-3-fosfato se genera otra molécula de piruvato (85,86).

Fase estacionaria: en esta fase el consumo de los nutrientes y su escasez causa una competencia entre células, generando una activación de mecanismos de supervivencia como es la formación de esporas, pero a su vez se detiene el crecimiento celular. (87,88)

Fase de muerte: en esta fase se genera la muerte de los microorganismos a causa del agotamiento de nutrientes y acumulación de desechos. (87,88).

2.4 Péptidos antimicrobianos

Debido a los factores de virulencia anteriormente mencionados y al problema que representan, ya que contribuyen a la resistencia bacteriana, se han ideado diferentes tratamientos alternos al uso tradicional de antibióticos para contribuir a la eliminación de las bacterias o de la biopelícula, uno de estos es el uso de péptidos antimicrobianos (11).

Los péptidos antimicrobianos (PAM), son moléculas evolutivamente conservadas que pueden encontrarse en diferentes tipos de organismos, desde procariotas hasta seres humanos, se clasifican de acuerdo a la composición de sus aminoácidos (péptidos lineales, ricos en cisteína o ricos en aminoácidos específicos) o de acuerdo a su estructura secundaria, pueden tener una estructura α -hélice, contener un par de láminas β , una mezcla de las dos estructuras (alfa y beta) o ninguno de estos dos tipos de estructuras (89). El primer péptido antimicrobiano reportado fue la lisozima, identificada en moco nasal en 1922 por Alexander Fleming sin embargo, en 1928 Fleming descubrió la penicilina y con el paso de los años se descubrieron sus aplicaciones, con lo cual desde 1940 comenzó la “edad de oro de los antibióticos” y por consiguiente el uso de péptidos antimicrobianos de origen natural perdió interés. (90)

Posteriormente en 1960 comenzó a observarse multirresistencia de las bacterias a los antibióticos, por lo cual los PAM empezaron a considerarse como una nueva alternativa para combatir las infecciones bacterianas (72). En 1980 comenzaron los primeros trabajos a los PAM y se descubrieron las cecropinas, derivados de la hemolinfa de la polilla *Hyalophora cecropia*; seguido a esto se logró el aislamiento y caracterización de las defensinas, obtenidas de las células granulocíticas de mamíferos. Desde entonces han sido numerosos los descubrimientos de distintos péptidos antimicrobianos, con aproximadamente 2000 péptidos informados hasta el 2016 y una base de datos donde pueden encontrarse. (91)

2.4.1 Péptido LL-37

El péptido LL-37 es el único miembro de la familia de las catelicidinas de péptidos antimicrobianos de defensa del huésped expresado en humanos derivado de la proteína precursora hCAP-18, su gen codificante se encuentra en el cromosoma 3 y su estructura es α helicoidal, teniendo 37 residuos de leu-leu en su N- terminal (92) con extremos hidrofóbicos e hidrofílicos, no hay presencia de cisteínas y está clasificado entre los PAM catiónicos, esto siendo dependiente de factores como el pH y la fuerza iónica (93) (94) Es producido por leucocitos, células del epitelio de la mucosa, entre otras, también es un componente importante de las granulaciones de los neutrófilos; está presente en las secreciones de las mucosas, el sudor y en el plasma humano a niveles bajos. El péptido LL37 actúa sobre la membrana eliminando lipolisacáridos y ácidos lipoteicoicos (93) generando la formación de poros que llevan a la lisis del microorganismo, y además puede actuar directamente sobre el DNA, al unirse a los grupos fosfato de éste por uniones electrostáticas para posteriormente insertarse en la cadena de nucleótidos del DNA. (11)

A parte de las funciones antimicrobianas se le describe actividades inmunomoduladoras como lo es la intervención en la señalización de los macrófagos involucrados en la quimiotaxis, la producción de quimiocinas (citocinas que promueven la movilidad celular), respuesta a los receptores TOLL, alargamiento la vida media de los neutrófilos ayudando a eliminar la apoptosis y a su migración a partir de la activación del receptor de péptido de formilo 1 los cuales reconocen péptidos de N- formilo producidos en los patógenos favoreciendo su movilidad a los sitios de infección y a la fagocitosis(95), además aumenta la producción de histamina o β -hexosaminidasa a partir de inducir la de granulación de los mastocitos (92), como también disminuye la producción del TNF- α cuando las células son estimuladas por los diferentes antígenos de las bacterias (96,97) ,

El péptido LL37 ha demostrado que con pequeños cambios en su estructuración sus efectos pueden ser potencializados, por esta razón se han derivado péptidos de su estructura original, observándose una mejora en sus actividades antimicrobianas en el enantiómero D-LL37, el cual evidencia una alta resistencia a las proteasas, disminución en la citotoxicidad en las células humanas, mayor actividad inmunomoduladora estimulando la producción de IL 8 y la movilización de fibroblastos, regulación negativa de genes y estimulación en la motilidad bacteriana, lo que inhibe su colonización en un espacio determinado evitando así la formación de biopelícula (98,99).

Asimismo, pueden encontrarse otras variaciones o modificaciones realizadas para potenciar el efecto del LL37, es el caso de dos de los péptidos tratados en este estudio (LL37-AC1 y LL37-AC2), en los cuales se realizó un proceso de acetilación, sin embargo estas no son las únicas modificaciones que pueden realizarse; para potenciar el efecto antimicrobiano de un péptido deben tenerse en cuenta factores como el aumento de carga neta, lo cual mejora su afinidad y actividad contra las células bacterianas, además la hidrofobicidad de un péptido es de suma importancia para que este pueda insertarse de forma adecuada en la membrana

celular de las bacterias, por lo cual debe encontrarse el rango de hidrofobicidad óptimo para modificar un péptido. Por otra parte, es importante que los péptidos cumplan dos condiciones: que sean activos contra el patógeno a tratar y que tenga una baja toxicidad a la dosis terapéutica a la que se administren. (107)

La síntesis de péptidos antimicrobianos se puede realizar en fase sólida, utilizando una resina que es un soporte polimérico insoluble, la síntesis inicia cuando un primer aminoácido se une a la resina por su extremo c-terminal y posteriormente comienza un proceso de elongación que permite que se vaya formando una cadena peptídica, a su vez se utilizan distintas estrategias para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos que se acoplan a la cadena en formación, una vez se haya completado la síntesis del péptido este se separa del soporte y se eliminan los grupos protectores de la cadena lateral. (107, 108)

3. Materiales y métodos

Este trabajo de investigación maneja variables de tipo cualitativo y cuantitativo, independientes y dependientes. Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron cepas tipo ATCC (American Type Culture Collection) de bacilos Gram negativos proporcionadas por el grupo CEPARIUM de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, se utilizaron un total de 17 bacterias distribuidas de la siguiente forma: 2 cepas de *E. coli* (*E. coli* 18239 y *E. coli* nativa), *Citrobacter freundii* nativa, *Proteus vulgaris* 6380, 2 cepas de *Yersinia* (*Y. enterocolitica* y *Y. kristensenii*), 3 cepas de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* 9027, *P. aeruginosa* nativa y *P. putida* 31483), *Burkholderia cepacia* 25608, 2 cepas de *Salmonella* (*S. enterica* serovar *Typhimurium* 14028 y *S. typhi*), 2 cepas de *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. 49137 y *Acinetobacter baumannii*), 2 cepas de *Klebsiella* (*K. pneumoniae* 1705 y *K. pneumoniae* 1706) y una cepa de control positivo para formación de biopelícula (*Pseudomonas aeruginosa* PA01). También se utilizaron 3 cepas aisladas de muestras a las cuales se les realizó hemocultivos, proporcionadas por la Clínica oncológica de San Diego (CIOSAD). Estas cepas fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*. Por lo tanto, en total se utilizaron 20 cepas para la realización de este trabajo de investigación. En la tabla 1 se encuentran todas las bacterias utilizadas para este estudio.

Bacteria	Cepas
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> 18239 <i>E. coli</i> nativa <i>E. coli</i> hemocultivo
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i> nativa
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i> 6380

<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> 23715 <i>Y. kristensenii</i> 33639
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> 9027 <i>P. aeruginosa</i> nativa <i>P. putida</i> 31483 <i>P. aeruginosa</i> hemocultivo <i>P. aeruginosa</i> PA01
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> 25608
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 14028 <i>S. typhi</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. 49137 <i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> 1705 <i>K. pneumoniae</i> 1706 <i>K. pneumoniae</i> hemocultivo

Tabla 1: cepas usadas en el estudio

3.1 Cultivo de las bacterias

Cada una de las cepas fue criopreservada por duplicado en caldo LB (Luria Bertani) con 10% de glicerol a una temperatura de -80°C, posteriormente para la realización de los experimentos se tomó cada uno de los crioviales y se realizó siembra por agotamiento en agar BHI (Brain heart infusion), y se incubó por 24 horas a 37°C.

3.2 Escalas McFarland

Luego de las 24 horas de incubación se realizaron escalas McFarland, realizando suspensiones bacterianas de las unidades formadoras de colonia en 5mL de caldo BHI en tubos Falcon de 15mL, se manejaron escalas MacFarland de 0.5 las cuales se confirmaron midiendo la absorbancia de cada una de las suspensiones en el espectrofotómetro Genesys 10S UV.VIS a una longitud de onda de 620 nm, donde debían obtenerse absorbancias en un rango entre 0.08 a 0.1.

3.3 Reconstitución de los péptidos

Para este trabajo de investigación se utilizaron los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37, LL-37, y otros péptidos de origen desconocido, denominados 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y

12, los cuales fueron diseñados por el grupo REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y por la Universidad Nacional de Colombia. Los péptidos se encontraban liofilizados, por lo cual se pesó 3 mg de cada uno para reconstruirlos en agua ultrapura, el volumen de agua utilizado varió dependiendo el peso molecular de cada péptido así:

Péptido LL37-AC1: 725 μ L de agua ultrapura.

Péptido LL37-AC2: 713 μ L de agua ultrapura.

Péptido D-LL37: 690 μ L de agua ultrapura.

Péptido LL37: 736 μ L de agua ultrapura.

Péptido 5: 1213 μ L de agua ultrapura.

Péptido 6: 1.207,4 μ L de agua ultrapura.

Péptido 7: 1.152,36 μ L de agua ultrapura.

Péptido 8: 1.152,36 μ L de agua ultrapura.

Péptido 9: 1.1349,96 μ L de agua ultrapura.

Péptido 10: 1.1349,96 μ L de agua ultrapura.

Péptido 11: 2.796 μ L de agua ultrapura.

Péptido 12: 2.706,53 μ L de agua ultrapura.

La concentración final de cada uno de los péptidos fue de 1000 μ M.

3.4 Curvas de crecimiento

Para la elaboración de las curvas de crecimiento se utilizaron placas de 99 pozos en cada uno de los cuales se agregó un volumen final de 300 μ L, donde 270 μ L correspondieron a péptido más medio BHI y los 30 μ L faltantes correspondieron a la suspensión bacteriana. Para cada uno de los péptidos se manejaron concentraciones finales de 5 μ M, 2.5 μ M, 1.5 μ M y 0.62 μ M, por lo tanto, la determinación del volumen utilizado para completar los 270 μ L para cada una de las concentraciones se realizó así:

Concentración de 5 μ M: 268.5 μ L de medio LB y 1.5 μ L de péptido

Concentración de 2.5 μ M: 269.25 μ L de medio LB y 0.75 μ L de péptido

Concentración de 1.5 μ M: 269.55 μ L de medio LB y 0.45 μ L de péptido

Concentración de 0.62 μ M: 269.81 μ L de medio LB y 0.19 μ L de péptido

Posteriormente se hizo el montaje de las placas, en el cual se realizó un ensayo por triplicado de cada bacteria con cada péptido a cada concentración, adicionalmente se realizó el montaje de cada bacteria por triplicado sin la presencia de ningún péptido como control del crecimiento bacteriano en el ensayo, igualmente se manejaron pozos donde solo se agregó medio de cultivo (300 μ L), como blanco de la prueba.

Una vez terminado el montaje de las placas, estas se colocaron en el equipo BioScreen, el cual mantuvo las placas en agitación y leyó las absorbancias de cada uno de los pozos cada hora por un periodo de 48 horas, pasado este tiempo se utilizaron los datos proporcionados por el equipo para la determinación del crecimiento bacteriano en presencia de cada péptido.

3.5 Cristal violeta

El cristal violeta se utiliza para determinar si una bacteria es productora de biopelícula y permite clasificarlas en no adherentes, débilmente adherentes o fuertemente adherentes. Para la realización de este procedimiento se debe hacer un repique de cada una de las cepas a estudiar y posteriormente una suspensión bacteriana en caldo BHI a una escala McFarland de 0.5.

Para este ensayo se utilizaron las cepas de las bacterias de mayor importancia clínica actual, las cuales fueron: *Escherichia coli* nativa, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Klebsiella pneumoniae* 1705, *Proteus vulgaris* 6380 y *Acinetobacter baumannii* nativa.

En la realización de este procedimiento se utilizaron placas de 96 pozos, donde en cada pozo se agregó una concentración final de 200 μ L, 180 μ L de caldo BHI (suplementado con glucosa al 1%) y 20 μ L de la suspensión bacteriana; posteriormente se incuban las placas por 24 horas, transcurrido este tiempo se descarta el contenido de las placas con un golpe rápido y seco de la placa, el sedimento que haya quedado adherido a cada pozo es fijado con 20 μ L de paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Pasado este tiempo se vuelve a descartar el contenido de la placa y se realizan tres lavados con agua destilada estéril; posteriormente se adiciona a cada pozo 200 μ L de cristal violeta al 0.4% y se deja en incubación por 10 minutos, luego se descarta el contenido y nuevamente se realizan tres lavados con agua destilada estéril para eliminar el exceso de colorante.

Luego de este procedimiento se deja secar la placa a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, posteriormente para la lectura de la placa se agrega 200 μ L de ácido acético glacial al 30%. La lectura se realiza en un lector de microelisa donde se utilizan dos longitudes de onda: una de 492 nm para obtener la absorbancia de referencia, correspondiente a la densidad óptica de cada pozo, y a 570 nm para obtener la absorbancia de la reacción. El equipo utiliza estas dos longitudes de onda y realiza la diferencia entre las absorbancias obtenidas, lo que dará el valor real de adherencia en cada pozo.

Para el control de calidad de los ensayos, se utilizó como control positivo (cepa formadora de biopelícula) la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus*, como control negativo (cepa no formadora de biopelícula) *Staphylococcus epidermidis* 1228 y como control del medio se utilizaron 3 pozos por placa donde se agregaron 200µL de caldo BHI.

3.6 Análisis estadístico

La base de datos de los resultados obtenidos se manejó en Excel. En el caso de las curvas de crecimiento los datos se agruparon por cepa tratada con un mismo péptido a diferentes concentraciones, esto para comparar la efectividad entre las concentraciones de cada péptido; por cada concentración se obtuvo un promedio de los tres pozos utilizados por reacción, posteriormente se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Para cada reacción el coeficiente de variación debía ser inferior de 0,1. Con los promedios se obtuvieron gráficas que muestran el comportamiento de cada cepa en presencia de un péptido a diferentes concentraciones, comparado con el crecimiento normal de la bacteria en caldo BHI sin presencia del péptido.

Además, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00. para comparar el efecto de cada uno de los péptidos sobre cada cepa tratada, se realizó un análisis de varianza unidireccional conocido en inglés como one-way analysis of variance (abreviado como One-way ANOVA), el cual permitió observar diferencias en el efecto generado entre péptidos, interpretado por valores de significancia los cuales pueden clasificarse así:

No hay significancia (ns)

Hay significancia (de *, ** y ***)

Adicionalmente se realizó un análisis por hora, en el cual se comparó el comportamiento de cada cepa tratada con un péptido a una concentración específica con el comportamiento de la cepa sin tratamiento; este análisis también se realizó en el programa GraphPad Prism con la herramienta Two way ANOVA, la cual permite comparar dos variables y determinar si hay alguna interacción o semejanza entre estas.

4. Resultados

4.1 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron con el fin de comparar el crecimiento de las cepas en estudio sin presencia de péptidos antimicrobianos, y en presencia de estos a diferentes concentraciones, se evaluó la capacidad de los péptidos para inhibir el crecimiento bacteriano y para alargar la fase logarítmica de las curvas de crecimiento. Las 20 cepas en estudio fueron tratadas con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37 y posteriormente se seleccionaron 5 cepas que fueron tratadas con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11 y 12. Los resultados de las curvas de crecimiento se pueden observar en las gráficas del anexo 1.

4.1.1 Comparación por genero bacteriano de las horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones

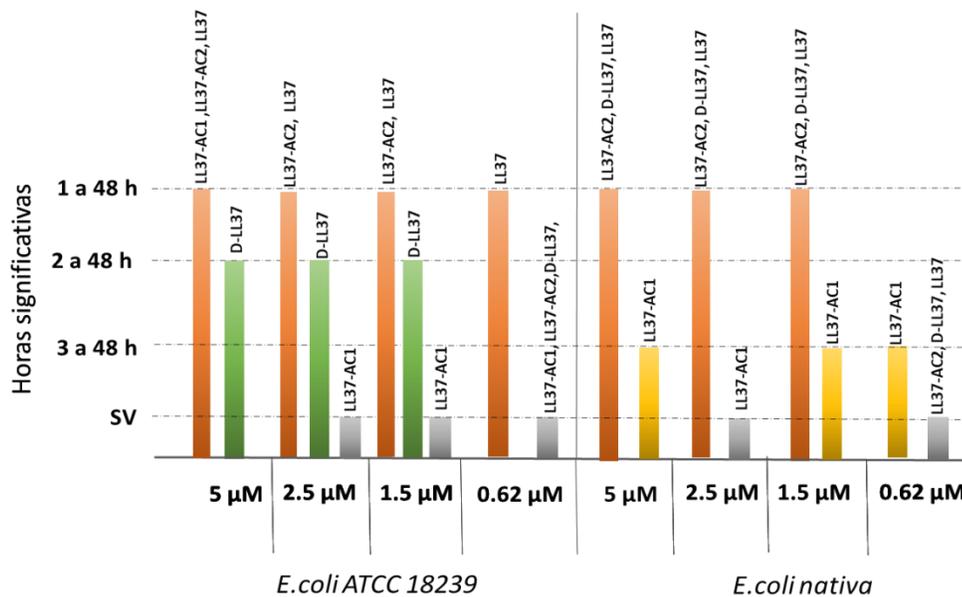
Con la herramienta estadística two- way ANOVA, se comparó el crecimiento por hora de cada cepa sin péptido y con todos los péptidos a las diferentes concentraciones utilizadas. Se tomaron en cuenta los resultados que mostraran un valor de probabilidad menor de 0,001 ($P < 0.001$), lo cual indica una significancia entre el crecimiento de la cepa sin tratamiento y tratada a una concentración específica. Los resultados se agruparon por concentración para comparar la efectividad entre péptidos dentro de las 48 horas de incubación. También se comparó el efecto de los péptidos entre cada una de los géneros y especies bacterianas en estudio, esto para determinar si hay una variabilidad en la actividad biológica dependiendo de la cepa a tratar. En el anexo 2 se encuentra la tabla que agrupa las significancias por hora entre las cepas tratadas con péptidos y las cepas sin tratamiento.

E. coli ATCC 18239 y E. coli nativa

En la cepa ATTC se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos con la mayoría de los péptidos a todas las concentraciones desde la hora 1 y 2 hasta las 48 ,sin embargo, el péptido LL37-AC1 tiene rangos de tiempo significativamente variados (SV), los cuales se pueden observar en la tabla del anexo 2.

En la cepa nativa los péptidos presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 1 y 3 hasta la 48, exceptuando los péptidos que tienen rangos de tiempo significativamente variados los cuales se pueden observar en la tabla del anexo 2.

En la figura 1 se muestra las horas donde hubo un crecimiento estadísticamente significativo entre las cepas con y sin tratamiento con péptidos antimicrobianos.

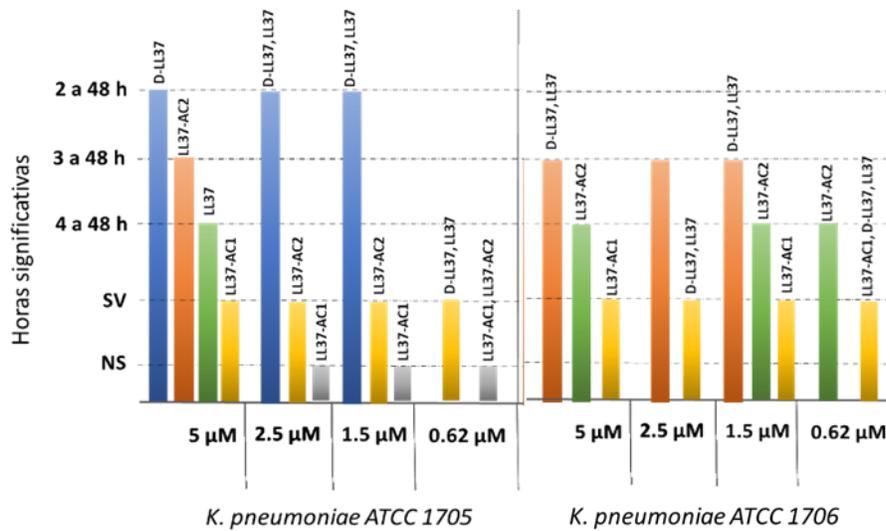


SV: significancia variada, NS: ninguna significancia
 Figura 1. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *E. coli* ATCC 18239 y *E. coli* nativa

***K. pneumoniae* ATCC 1705 y 1706**

En la cepa ATCC 1705 se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos con la mayoría de los péptidos a todas las concentraciones desde la hora 2, 3 y 4 hasta las 48, sin embargo, con algunas concentraciones se presentaron rangos de tiempo significativamente variados (SV) con los 4 péptidos utilizados, estas significancias variadas se encuentran detalladas en la tabla del anexo 2.

En la cepa ATCC 1706 los péptidos presentan rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 3 y 4 hasta la 48, exceptuando las concentraciones a las que los péptidos generaron significancias variadas, las cuales se describen en el anexo 2.

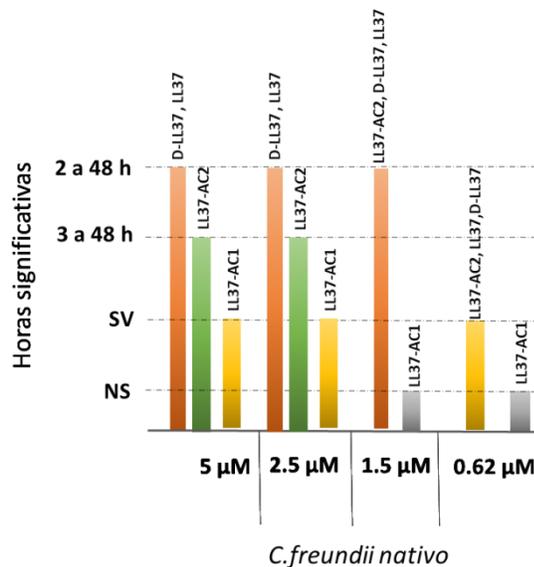


SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 2. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *K. pneumoniae* ATCC 1705 y 1706

C. freundii nativa

En esta cepa se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 2 y 3 hasta las 48, sin embargo, algunos péptidos tiene rangos de tiempo significativamente variados (SV) que son el péptido LL37-AC1 a la concentración de 5 y 2,5 μM y los péptidos LL37-AC2, D-LL37 y LL37 a la concentración de 0.62 μM. (Anexo 2)



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 3. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa *Citrobacter freundii nativa*

P. vulgaris ATCC 6380

En esta cepa se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 3 y 4 hasta las 48, sin embargo, los péptidos LL37-AC1 y LL37-AC2 tiene rangos de significancia variada a la concentración de 0.62 Mm, la cual se describe en el anexo 2.

SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

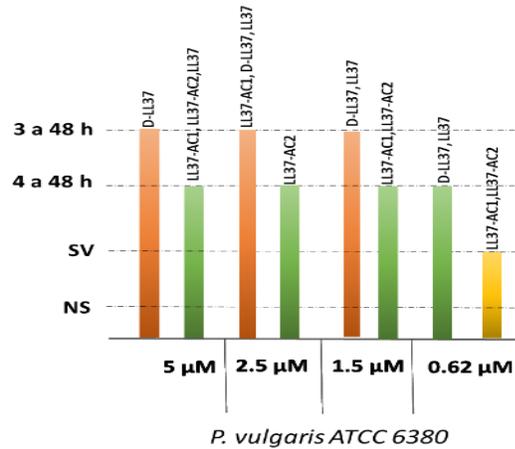
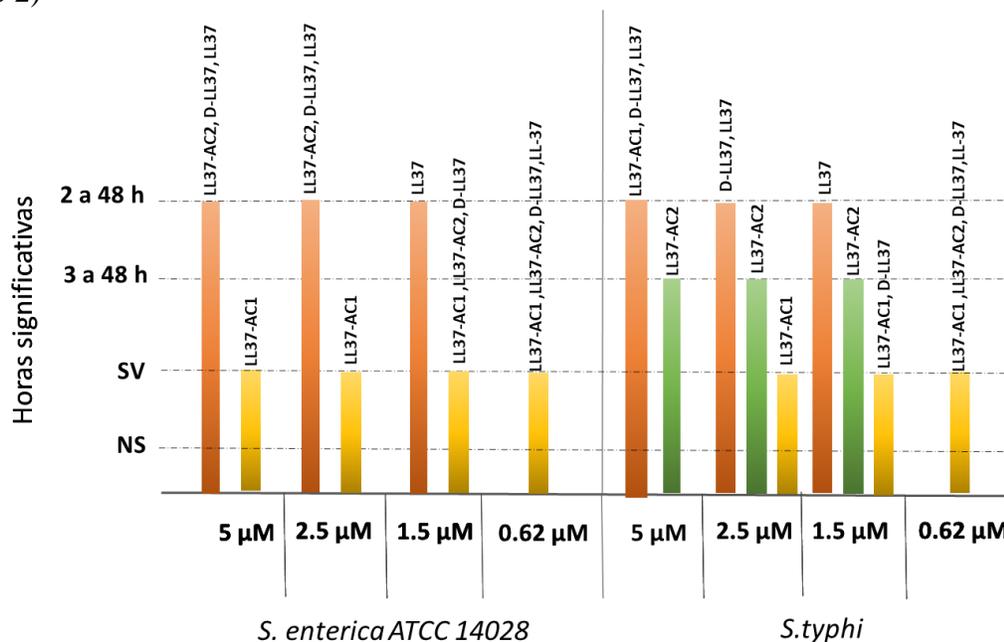


Figura 4. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa *Proteus vulgaris ATCC 6380*

S. entérica ATCC 14028 y S. typhi

En la cepa ATTC 14028 se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos con la mayoría de los péptidos a todas las concentraciones desde la hora 2 hasta las 48 ,sin embargo, algunos péptidos tiene rangos de tiempo significativamente variados (SV) como el péptido LL37-AC1 a todas las concentraciones; el péptido LL37-AC2 a la concentración de 1.5μM y 0.62μM; el péptido D-LL37 a la concentración de 1,5μM y 0,65μM y el péptido LL37 a la concentración de 0,62μM, los rangos de tiempo donde se generaron estas significancias se describen en el anexo 2.

En la cepa *S. typhi* los péptidos presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 3 y 4 hasta la 48, exceptuando los péptidos que tienen rangos de tiempo significativamente variados como el LL37-AC1 a concentraciones de 2,5 μM , 1.5 μM y 0.62 μM ; y los péptidos D-ll37, LL37-AC2 y LL37 a la concentración de 0.62 μM . (anexo 2)



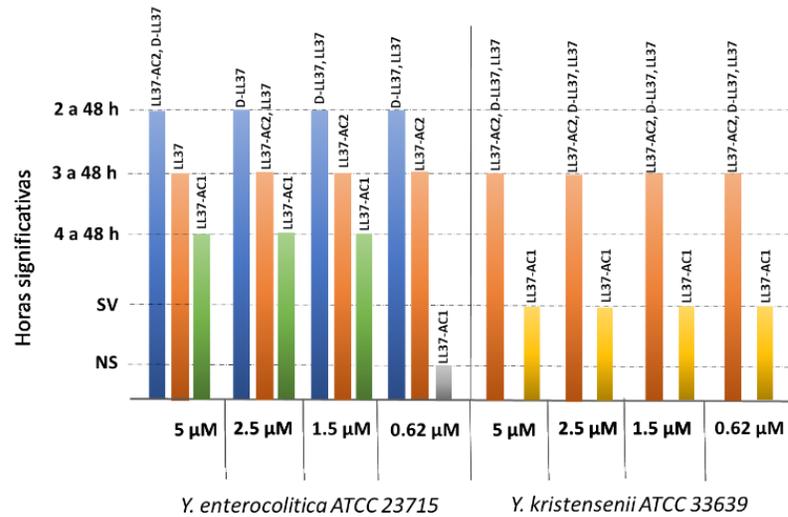
SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 5: horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *S. enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028 y *S. typhi*

Y. enterocolitica ATCC 23715 y *Y. kristensenii* ATCC 33639

En la cepa ATCC 23715 se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos con la mayoría de los péptidos a todas las concentraciones desde la hora 2, 3 y 4 hasta las 48, sin embargo, el péptidos LL37-AC1 a la concentración de 0,62 μM no presenta ningún rango de inhibición estadísticamente significativo (NS). (Anexo 2)

En la cepa ATCC 33639 los péptidos generaron rangos de inhibición estadísticamente significativos desde 3 hasta la 48, exceptuando el péptido LL37-AC1 que tienen rangos de tiempo significativamente variados (SV) a todas las concentraciones. (Anexo 2)



W

SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 6: horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *Y. enterocolitica* ATCC 23715 y *Y. kristensenii* ATCC 33639

***P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* nativa, PA01 y *P. putida* ATCC 31483**

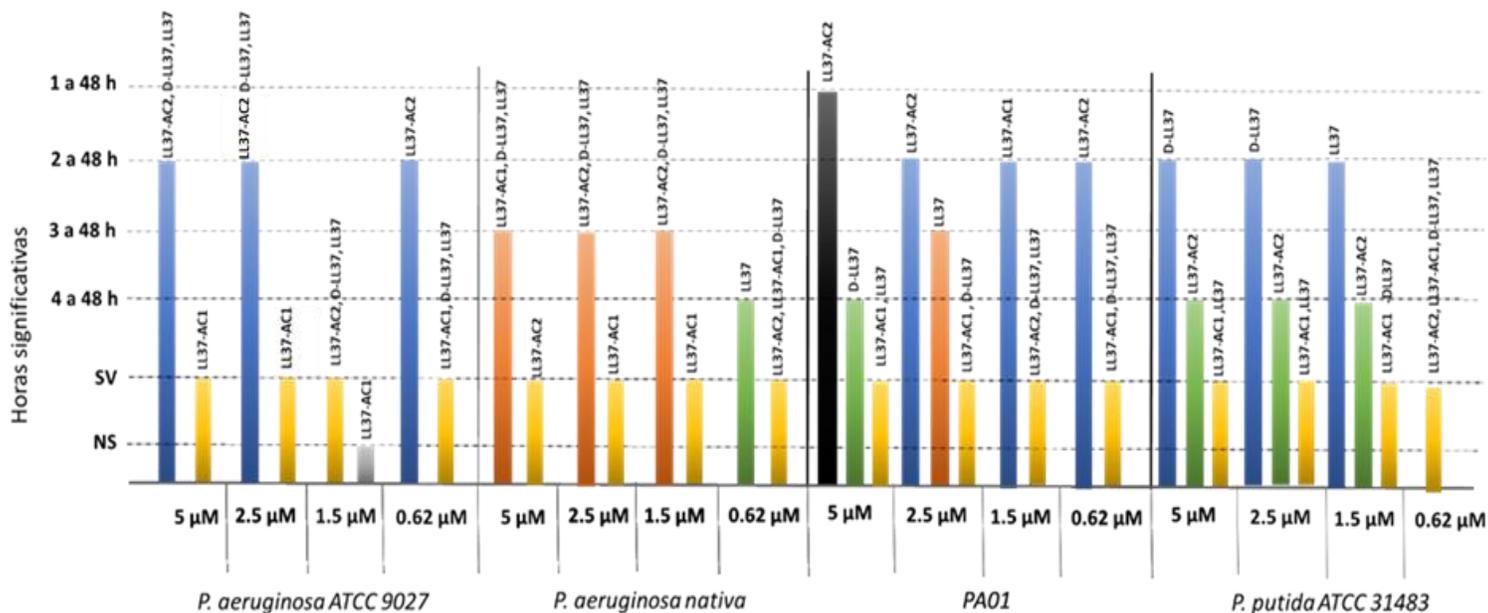
En la cepa ATCC 9027 se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos con la mayoría de los péptidos a todas las concentraciones desde la hora 2 hasta las 48, sin embargo, con algunas concentraciones se generaron rangos de tiempo significativamente variados (SV) como con el péptido LL37-AC1 a 5μM y a 0,62μM, el péptido LL37-AC2 a concentración de 1,5 μM y los péptidos D-LL37 y LL37 a las concentraciones de 1,5μM y 0,62μM. (Anexo 2)

En la cepa *P. aeruginosa* nativa los rangos de inhibición estadísticamente significativos van desde la hora 3 y 4 a la 48 exceptuando los péptidos que presentan SV que son el LL37-AC1 a las concentraciones de 2,5 μM y 1,5 μM, el péptido LL37-AC2 a 5μM y a 0,62 μM y el péptido D-LL37 a 0,62μM. (Anexo 2)

En la cepa PA01 los rangos de inhibición estadísticamente significativos van desde la hora 1,2, 3 y 4 a la 48 exceptuando los péptidos que presentan SV que son el LL37-AC1 a 5μM, 2,5μM y 0,62μM; el péptido LL37-AC2 a 1,5μM; el péptido D-LL37 a 2,5 μM, 1,5 μM y 0,62 μM y el péptido LL37 a concentraciones de 5μM, 1,5 μM y 0,62 μM. (Anexo 2)

En la cepa ATCC 31483 los péptidos presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 2 y 4 hasta la 48, exceptuando los péptidos que tienen rangos de

tiempo significativamente variados que son el LL37-AC1 a todas las concentraciones, el péptido LL37-AC2 a la concentración de 0,62µM, el péptido D-LL37 a la concentración de 1,5 µM y de 0,62 µM y el péptido LL37 a las concentraciones de 5µM, 2,5µM y



0,62µM. (anexo 2).

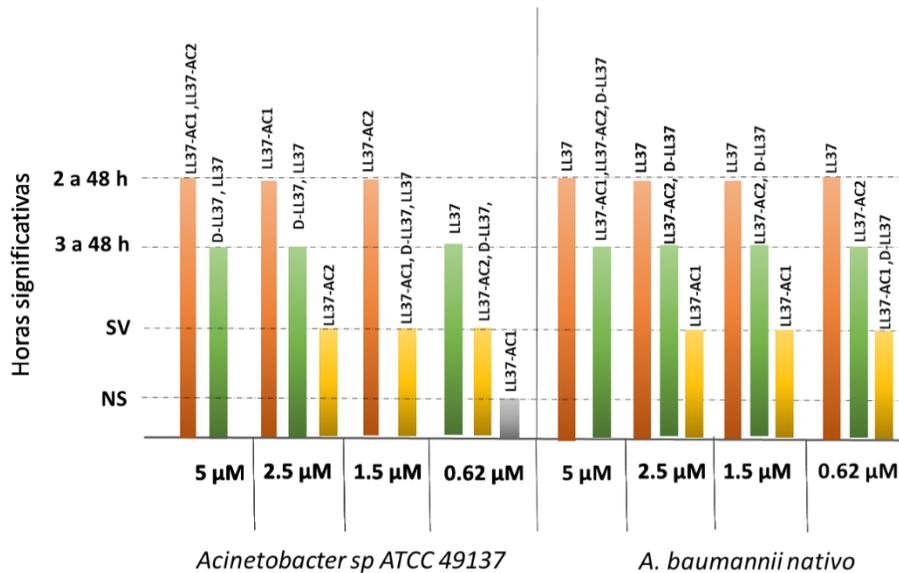
SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 7: horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* nativa, *P. putida* ATCC 31483, *P. aeruginosa* PA01

Acinetobacter ATCC 49137 y *A. baumannii* nativa

En la cepa ATCC 49137 los péptidos presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde 2 y 3 hasta la 48, exceptuando algunos péptidos que tienen rangos de tiempo significativamente variados (SV) como el péptido LL37-AC1 a la concentración de 1.5µM, el péptido LL37-AC2 a la concentraciones de 2.5µM y 0,62µM, el péptido D-ll37 a 1,5µM y 0.62µM y el péptido LL37 a 0,62µM. (Anexo 2)

En la cepa nativa los péptidos presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde 2 y 3 hasta la 48, exceptuando algunos péptidos que tienen rangos de tiempos significativamente variados (SV) que son el péptidos LL37-AC1 a 2,5 µM y 0,62 µM y el péptido D-LL37 a 0,62 µM. (Anexo 2)

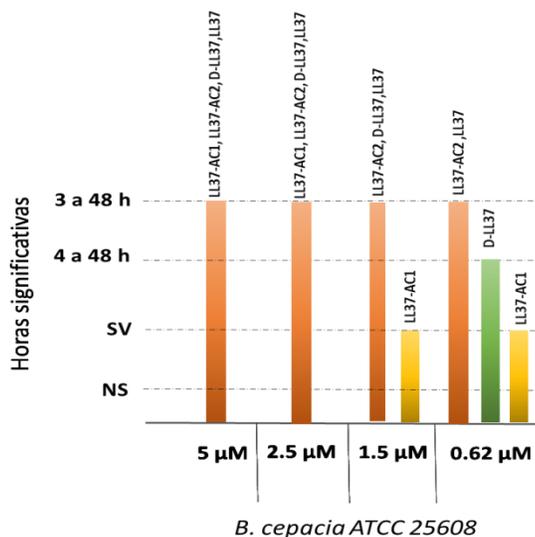


SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 8. horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas *Acinetobacter sp. ATCC 49137* y *Acinetobacter baumannii nativo*

B. cepacia ATCC 25608

En esta cepa se presenta rangos de inhibición estadísticamente significativos desde la hora 3 y 4 hasta las 48, sin embargo, El péptidos LL37-AC1 tiene rangos de tiempo significativamente variados a 1.5 μM y a 0.62 μM. (Anexo 2)



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 9: horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en la cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 25608

Teniendo en cuenta estos resultados, se pueden obtener los porcentajes de las cepas en las cuales se presentó una diferencia en el crecimiento estadísticamente significativa, en las fases lag y logarítmica. Estos porcentajes se muestran en la tabla 2.

Porcentajes de disminución en el crecimiento de cepas ATCC en fase lag y logarítmica				
	LL37-AC1	LL37-AC2	D-LL37	LL37
5µM	94%	100%	100%	100%
2.5µM	82,3%	100%	100%	100%
1.5µM	76,4%	100%	100%	100%
0.62µM	58,8%	88,2%	94%	100%

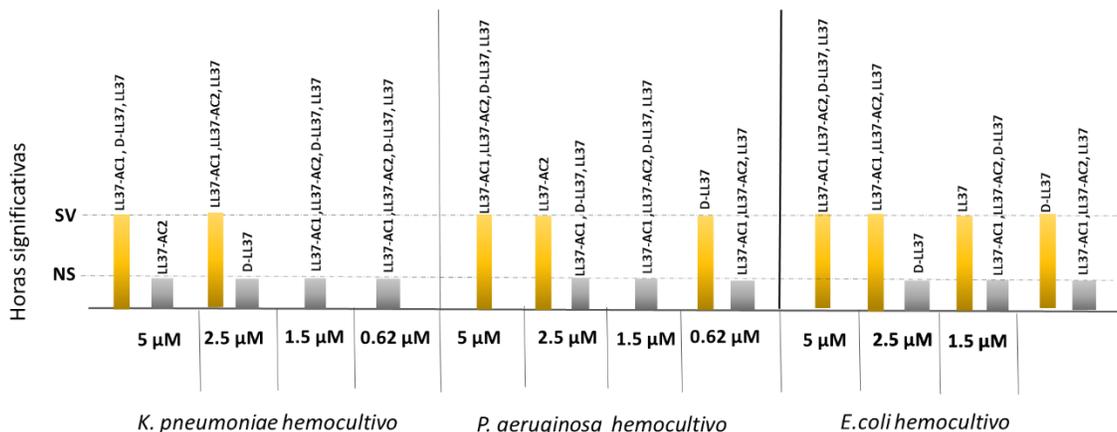
Tabla 2. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas ATCC en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37.

Según los resultados de la tabla 2, el péptido LL37-AC1 mostró un decrecimiento en el porcentaje de cepas en las cuales se presentó una disminución en el crecimiento en la fase lag y logarítmica a medida que las concentraciones del péptido eran más bajas, por otro lado los péptidos LL37-AC2 y DLL37 mostraron un efecto en el 100% de las cepas a todas las concentraciones, a excepción de la concentración de 0.62µM donde mostraron porcentajes de 88,2% y 94% respectivamente; por su parte el péptido LL37 mostró un efecto en el 100% de las cepas a todas las concentraciones utilizadas.

Cepas clínicas

K. pneumoniae hemocultivo, P. aeruginosa hemocultivo, E. coli hemocultivo

En la figura 10 se muestra el análisis por hora de las cepas clínicas tratadas en este estudio. Por otra parte en la tabla 3 se muestran los porcentajes de las cepas en las cuales se presentó una diferencia en el crecimiento estadísticamente significativa, en las fases lag y logarítmica.



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia

Figura 10: horas significativas de cada péptido (LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37) a todas las concentraciones en las cepas clínicas *P. aeruginosa hemocultivo*, *E. coli hemocultivo*, *K. pneumoniae hemocultivo*.

Los resultados de la tabla 3 muestran que los péptidos LL37-AC1 y LL37-AC2 no generaron efecto en ninguna de las cepas a 1.5μM y 0.62μM, por otro lado el péptido DLL37 tampoco causó una diferencia significativa en las fases lag y logarítmica de las cepas a concentraciones de 2.5μM y 1.5μM; mientras que el péptido LL37 no causó efecto a la concentración de 0.62μM.

Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas clínicas en las fases lag y logarítmica				
	LL37-AC1	LL37-AC2	D-LL37	LL37
5μM	100%	66,6%	100%	66,6%
2.5μM	66,6%	100%	0%	66,6%
1.5μM	0%	0%	0%	33,3%
0.62μM	0%	0%	33,3%	0%

Tabla 3. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas clínicas en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37

Péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

E. coli nativa

En esta cepa se presenta rangos de tiempo significativos variados con los péptidos 7 y 8, 9 y 10 a diferentes concentraciones, en el anexo 3 se detallan los rangos de significancia obtenidos con cada péptido.

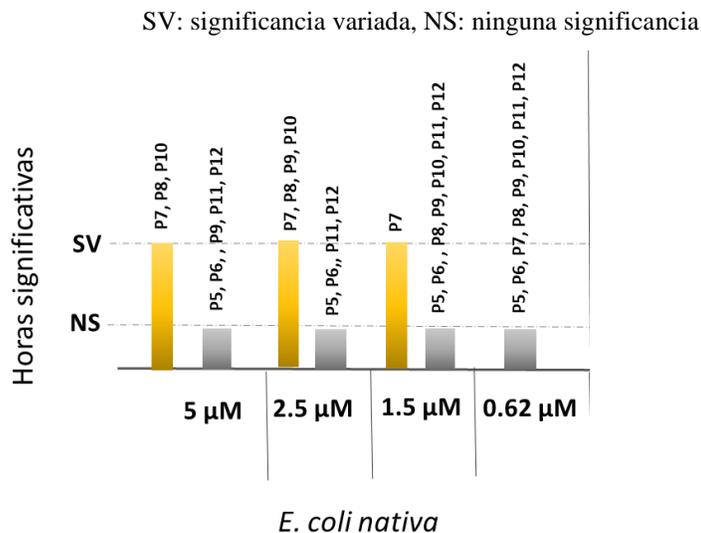
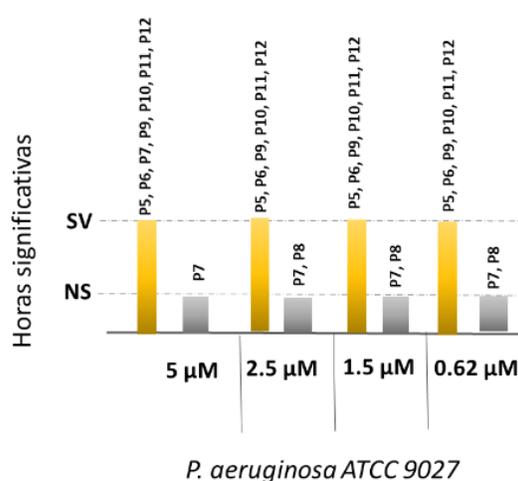


Figura 11. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa *E. coli nativa*

P. aeruginosa ATCC 9027

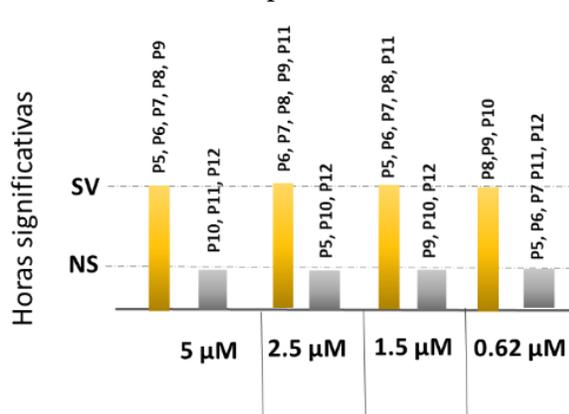
En esta cepa se presenta rangos de tiempo significativos variados con los péptidos 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12 a diferentes concentraciones, en el anexo 3 se detallan los rangos de significancia obtenidos con cada péptido.



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia
 Figura 12. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027

A. baumannii nativa

En esta cepa se presenta rangos de tiempo estadísticamente significativos variados con todos los péptidos a diferentes concentraciones, en el anexo 3 se pueden consultar los rangos de tiempo de obtenidos con cada cepa.

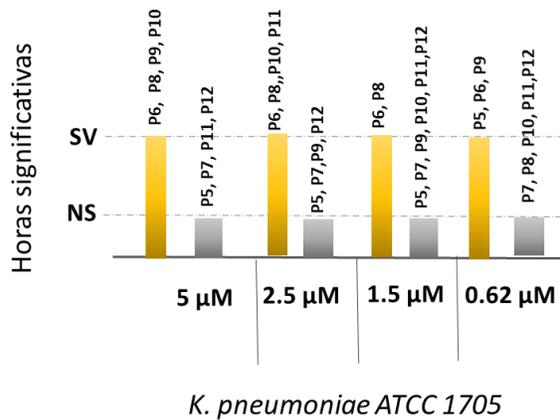


A. baumannii nativa

SV: significancia variada, NS: ninguna significancia
 Figura 13. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa *Acinetobacter baumannii nativa*

***K. pneumoniae* ATCC 1705**

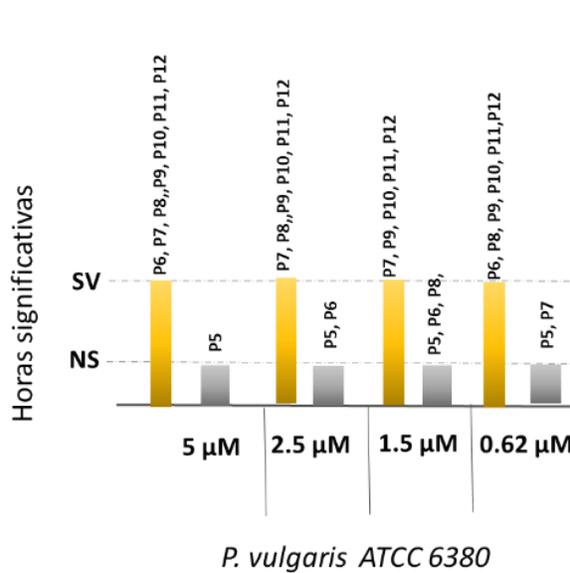
En esta cepa se presenta rangos de tiempo significativos variados con los péptidos 5, 6, 8, 9, 10 y 11 a diferentes concentraciones, en el anexo 3 se pueden consultar los rangos de tiempo de obtenidos con cada cepa.



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia
 Figura 14. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa *K. pneumoniae* ATCC 1705

***P. vulgaris* ATCC 6380**

En esta cepa se presenta rangos de tiempo significativos variados con los péptidos 6, 7, 8, 9, 10,11 y 12 a diferentes concentraciones, en el anexo 3 se pueden consultar los rangos de tiempo de obtenidos con cada cepa.



SV: significancia variada, NS: ninguna significancia
 Figura 15. horas significativas de cada péptido (5,6,7,8,9,10,11,12) a todas las concentraciones en la cepa *Proteus vulgaris* ATCC 6380

Los resultados de la tabla 4 muestran que los péptidos 5 y 6 no tuvieron ningún efecto en las fases lag y logarítmica de las cepas tratadas, mientras que el péptido 6 y el 12 solo

generaron una significancia en estas fases en una de las cepas (20%), por otro lado con los péptidos 8, 9 y 10 se observó que hasta en el 60% de las bacterias hubo un efecto sobre las fases analizadas; el péptido 7 por su parte genero una significancia hasta en el 40% de las cepas.

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

Tabla 3. Porcentajes de disminución en el crecimiento en cepas clínicas en las fases lag y logarítmica de crecimiento bacteriano con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y12.

4.1.3 Alargamiento de la fase lag

Péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37

El péptido LL37-AC1 mostró que a una concentración de 5µM en el 60% de las cepas tratadas hubo un alargamiento de la fase lag con respecto al control de cada cepa sembrado sin péptido, mientras que con el péptido LL37-AC2 el alargamiento de esta fase se dio en un mayor porcentaje (70%) a una concentración de 1.5µM. Por su parte el péptido D-LL37 mostró el mayor porcentaje de alargamiento de la fase lag (80%) a una concentración de 1.5µM, mientras que con el péptido LL37 a 0.62µM el 90% de las cepas mostraron un alargamiento en la fase lag de crecimiento. Los resultados de todos los péptidos a todas las concentraciones se muestran en la figura 16.

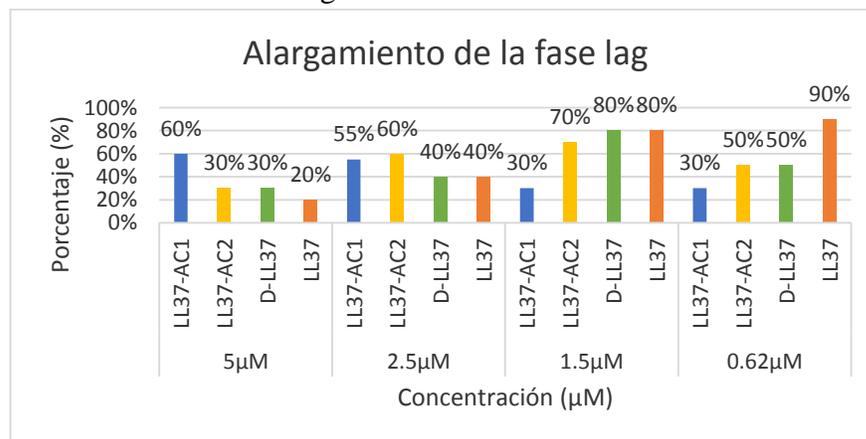


Figura 16 Porcentaje de cepas que presentaron un alargamiento de la fase lag con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 a todas las concentraciones utilizadas

Péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

Para determinar el efecto de estos péptidos se seleccionaron 5 cepas las cuales fueron: *A. baumannii*, *E. coli nativa*, *P. aeruginosa 9027*, *P. vulgaris 6380* y *K. pneumoniae 1705*. Con los péptidos 5 y 11 no se alargó la fase lag en ninguna de las cepas, mientras que con los péptidos 7 y 8 se presentó un comportamiento similar al presentar alargamiento de la fase a 5µM y 2.5µM en 3 de las 5 cepas tratadas (60%); por otra parte los péptidos 6 y 12 mostraron un alargamiento de la fase solo en 1 de las cepas (20%) a 5µM en el péptido 6 y en el péptido 12 a todas las concentraciones. El péptido 10 mostró alargamiento en el 40% de las cepas a 5µM y en el 20% en las demás concentraciones. Los resultados se muestran en la figura 17.

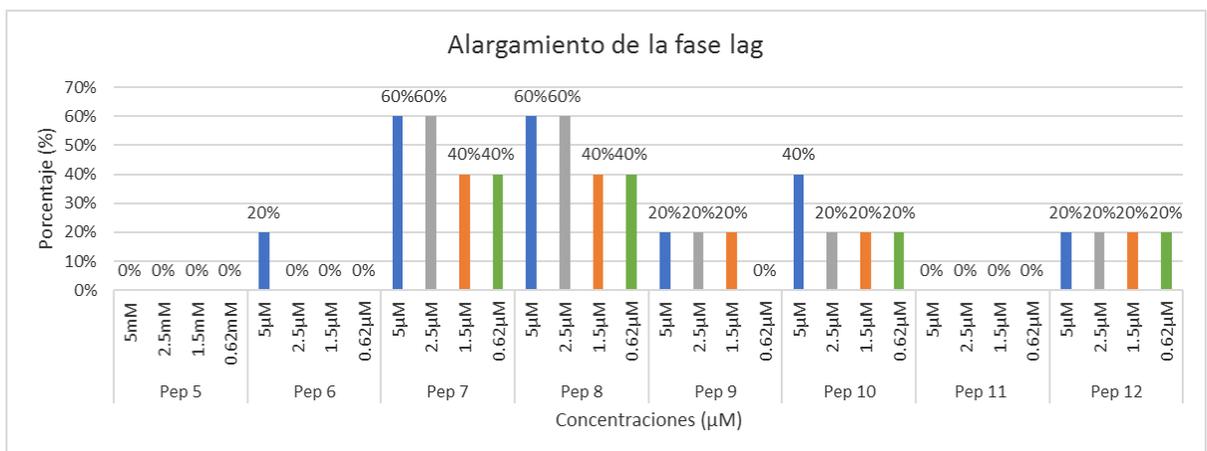


Figura 17 Porcentaje de cepas que presentaron un alargamiento de la fase lag con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 a todas las concentraciones utilizadas.

4.1.4 Inhibición del crecimiento

Con este estudio también se pudo evaluar el efecto inhibitorio de los péptidos antimicrobianos sobre las cepas seleccionadas, dependiendo de la concentración de los péptidos se pudo observar inhibición completa de las bacterias (sin crecimiento a lo largo de las 48 horas) e inhibición parcial (crecimiento disminuido comparado con el crecimiento sin péptido).

Inhibición completa del crecimiento con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37

De los 4 péptidos estudiados se obtuvieron curvas de crecimiento donde en algunas cepas hubo inhibición completa del crecimiento bacteriano. El péptido LL37-AC1 a la concentración de 5µM inhibió el crecimiento completo de 4 cepas (20%), el péptido LL37-AC2 generó inhibición completa en el 55% y 25% de las cepas a concentraciones de 5µM y 2.5µM respectivamente, mientras que con los péptidos D-LL37 y LL37 a concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.5µM hubo inhibición completa del crecimiento de varias cepas bacterianas. Por otra parte, se observó que a la concentración de 0.62µM ningún péptido causó la inhibición completa del crecimiento de las bacterias en estudio. En la figura 18 se encuentran los porcentajes de inhibición del crecimiento con cada uno de los péptidos utilizados.

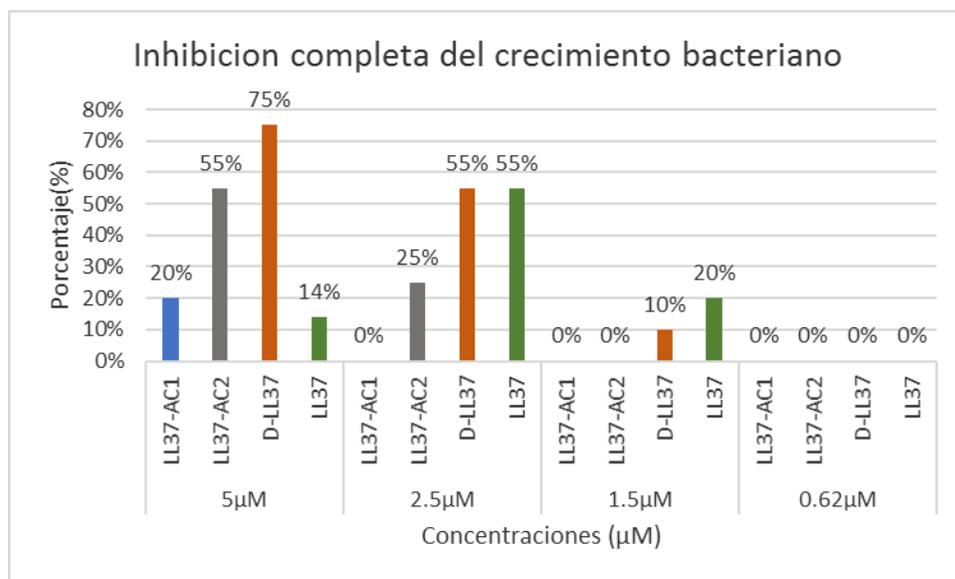


Figura18: Porcentajes de inhibición completa del crecimiento bacteriano con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, D-LL37 y LL37.

Inhibición completa del crecimiento con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

Con ninguno de estos péptidos no se observó inhibición completa del crecimiento de las cepas utilizadas

4.1.5 Comparación de las curvas de crecimiento por péptido

A continuación, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas en el estudio organizadas de acuerdo a la concentración del péptido utilizado, también se observa el crecimiento normal de cada una de las cepas sin tratamiento por 48 horas de incubación.

Péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37

P. putida ATCC 31483

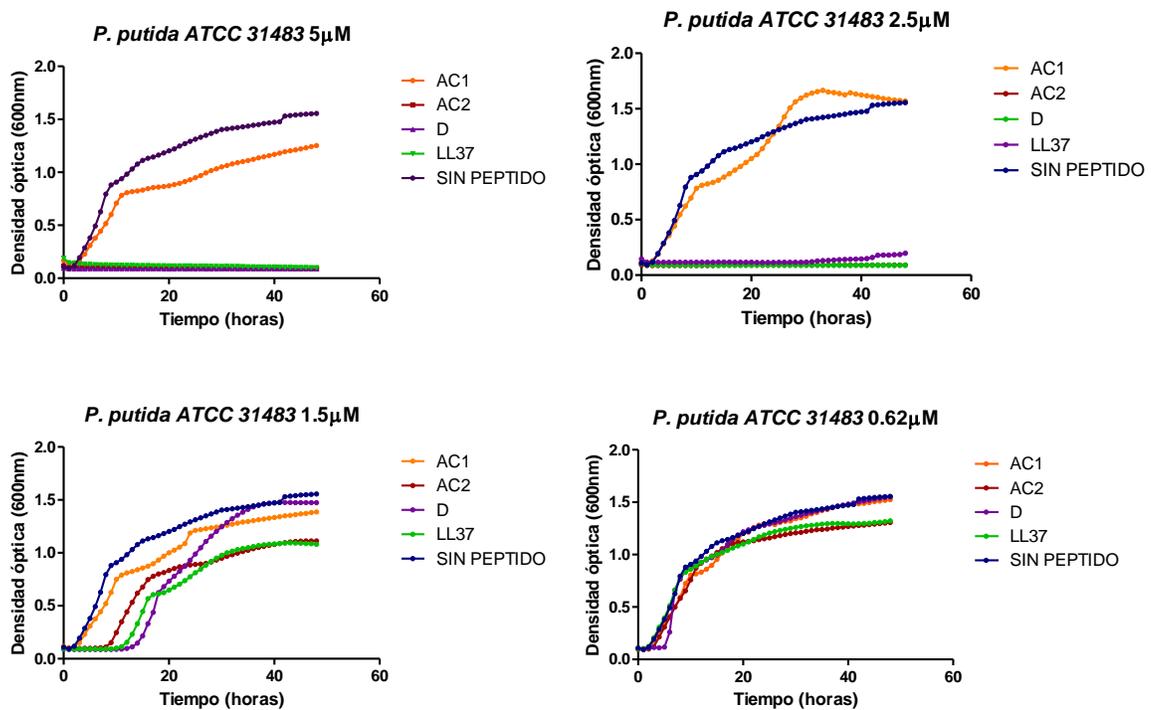


Figura 19. curva de crecimiento de *P. putida* ATCC 31483 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

P. aeruginosa ATCC 9027

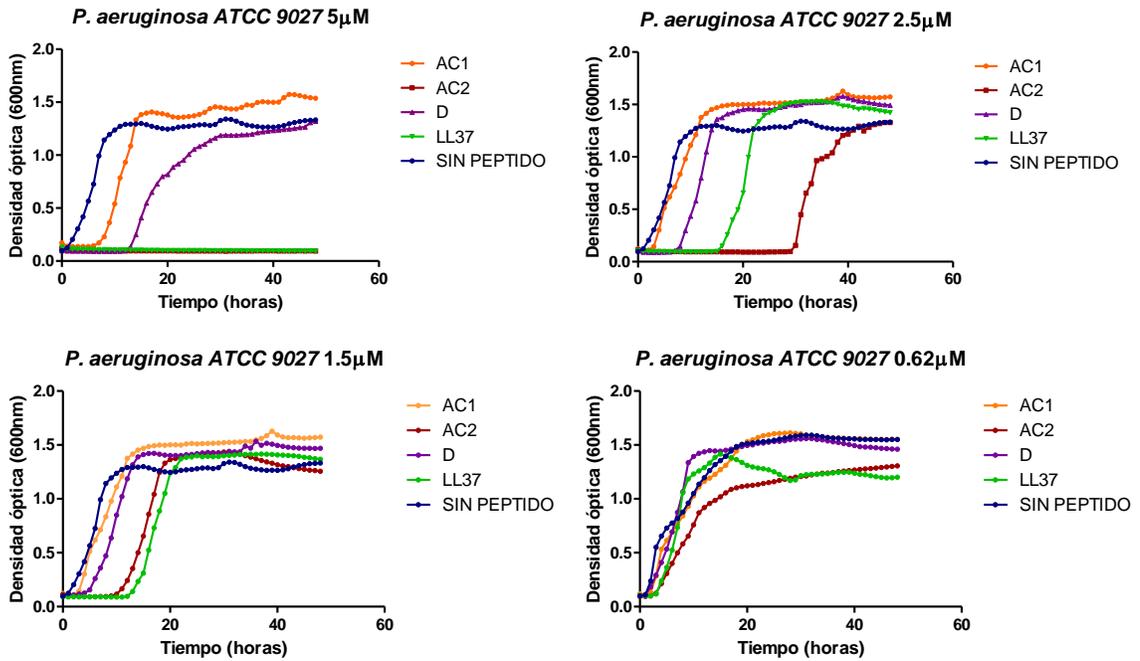


Figura 20 curva de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 9027 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

P. aeruginosa nativa

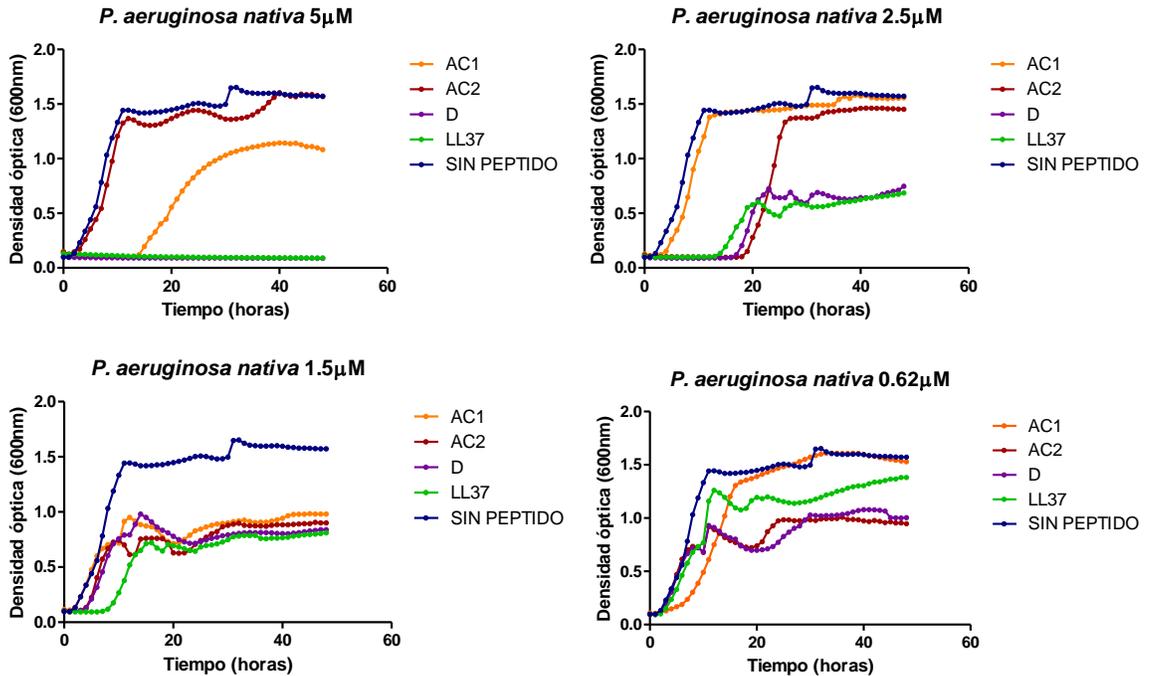


Figura 21 curva de crecimiento de *P. aeruginosa* nativa con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

PA01

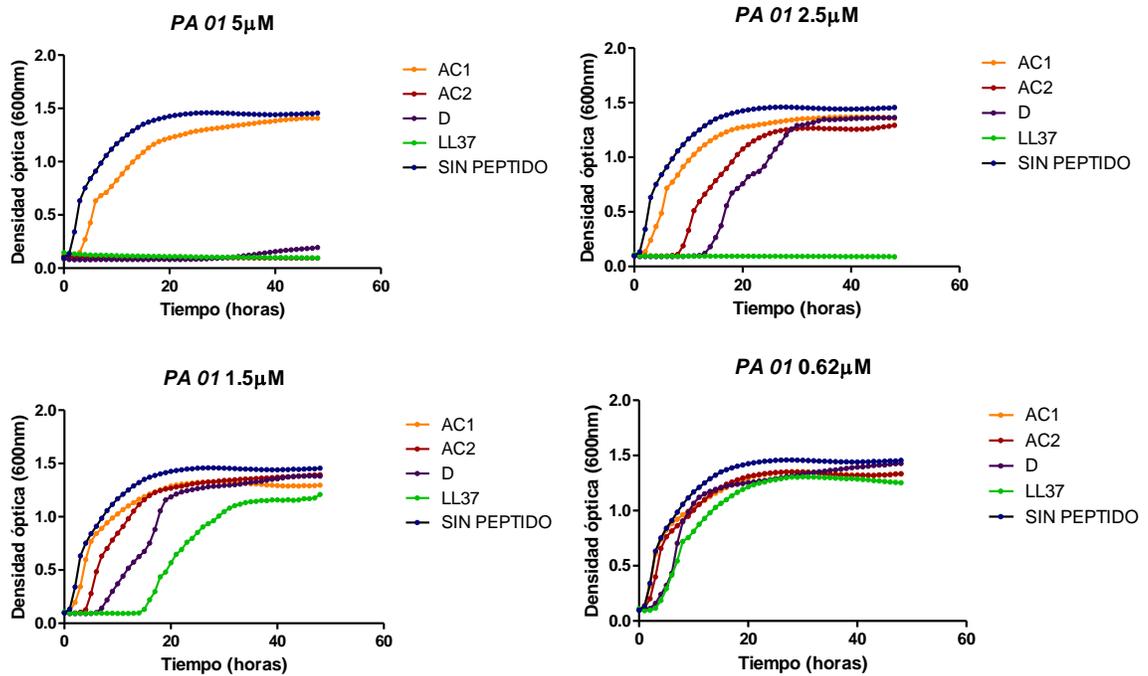


Figura 22. curva de crecimiento de *PA01* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

***B. cepacia* nativa**

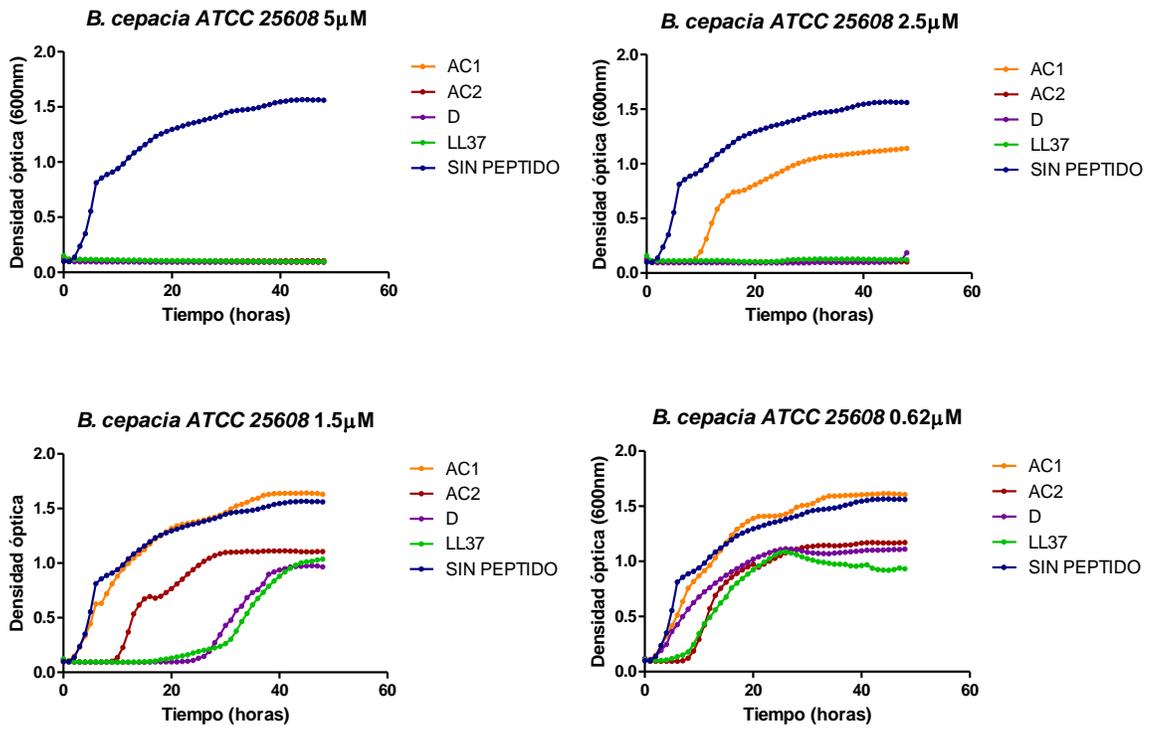
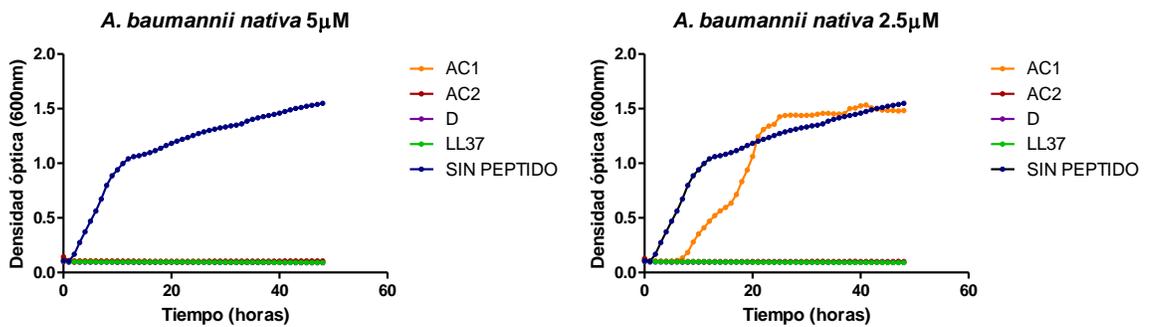


Figura 23. curva de crecimiento de *B. cepacia nativa* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

A. baumannii nativa



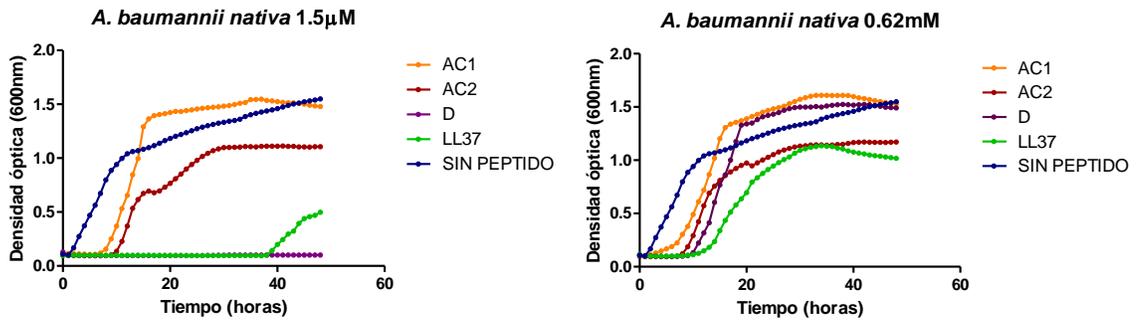


Figura 24. curva de crecimiento de *A. baumannii nativa* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

Acinetobacter ATCC 49137

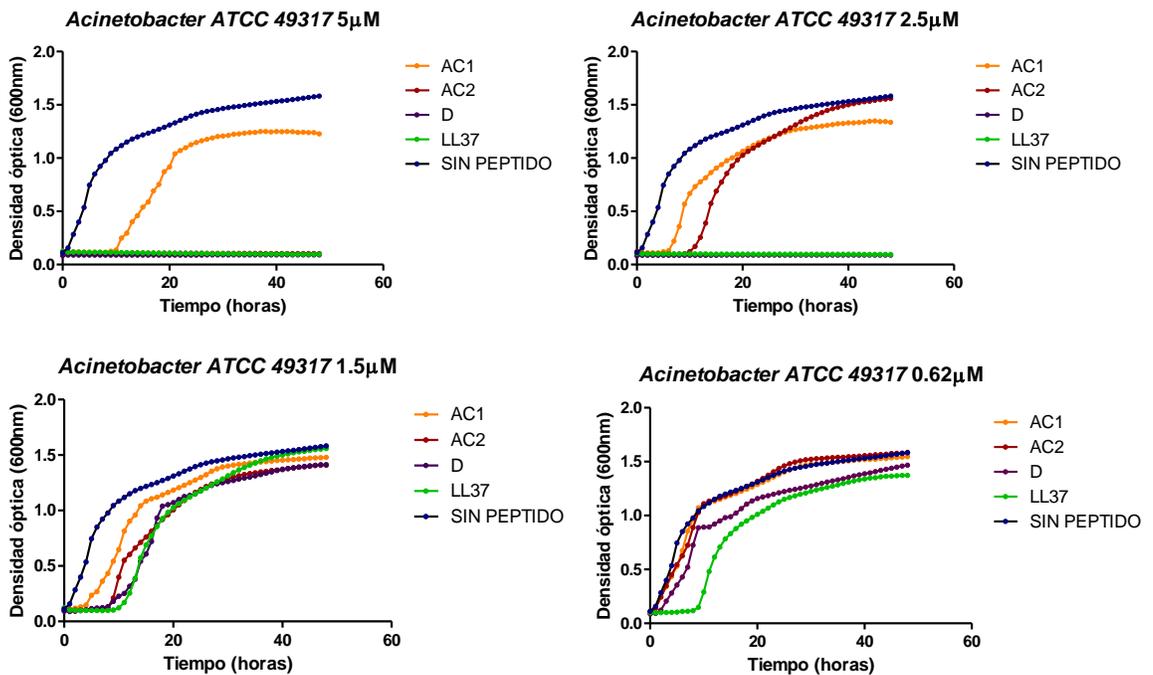


Figura 25. curva de crecimiento de *Acinetobacter ATCC 49137* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

E. coli nativa

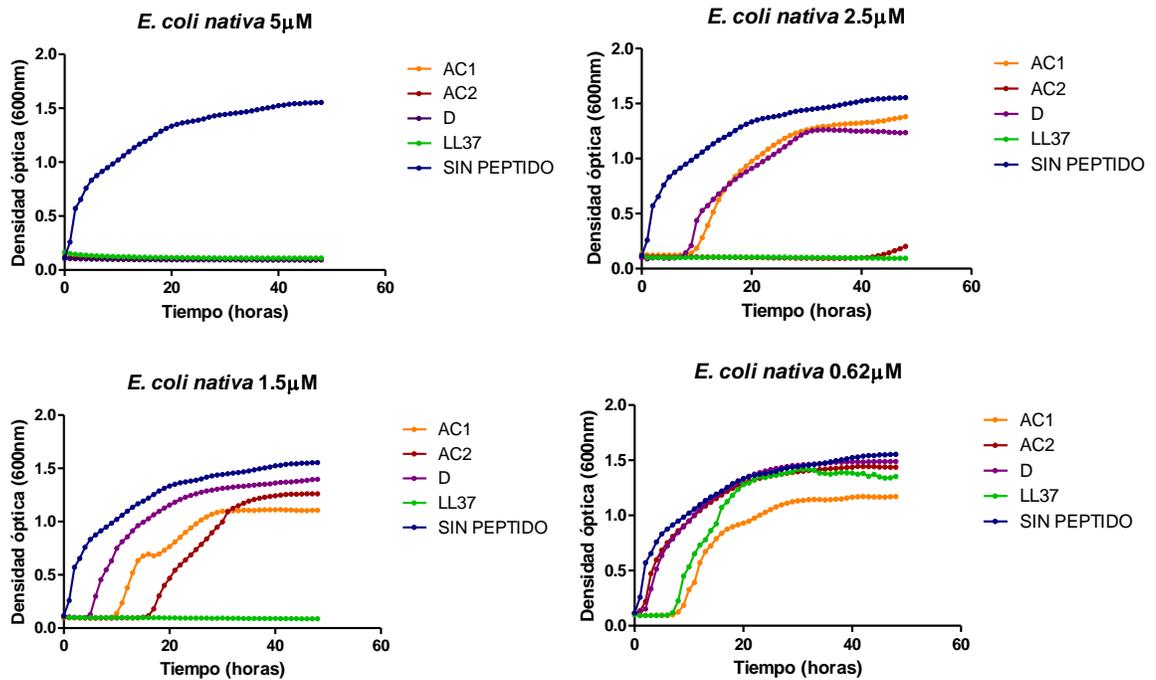
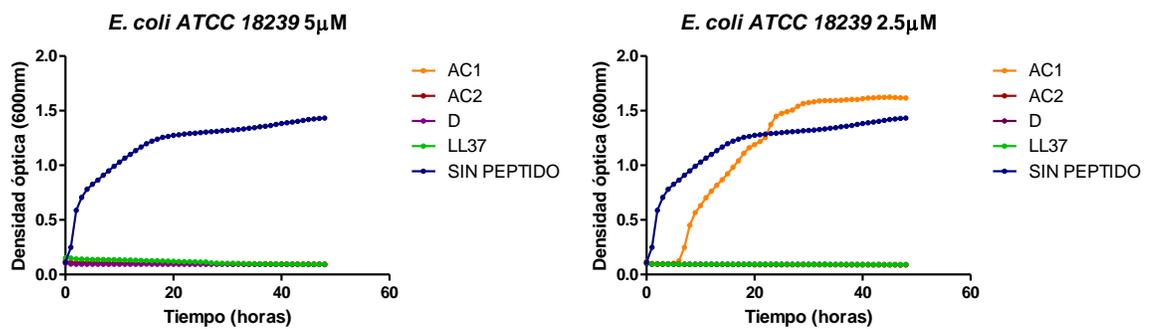


Figura 26. curva de crecimiento de *E. coli nativa* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

E. coli ATCC 18239



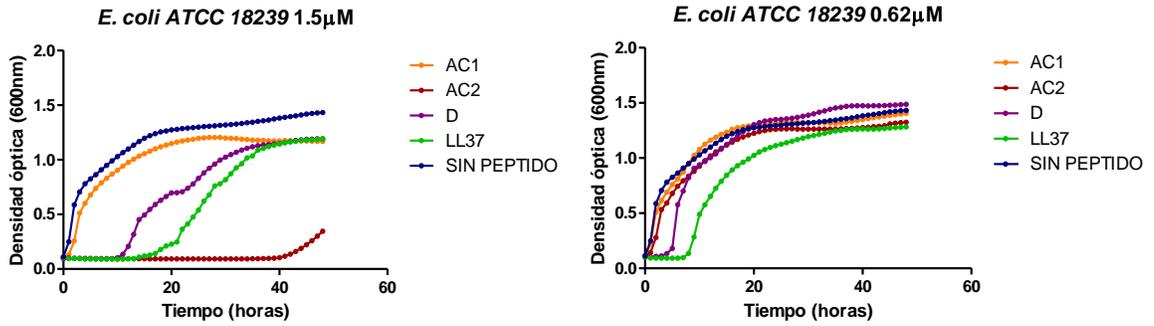


Figura 27. curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 18239 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

Y. kristensenii ATCC 33639

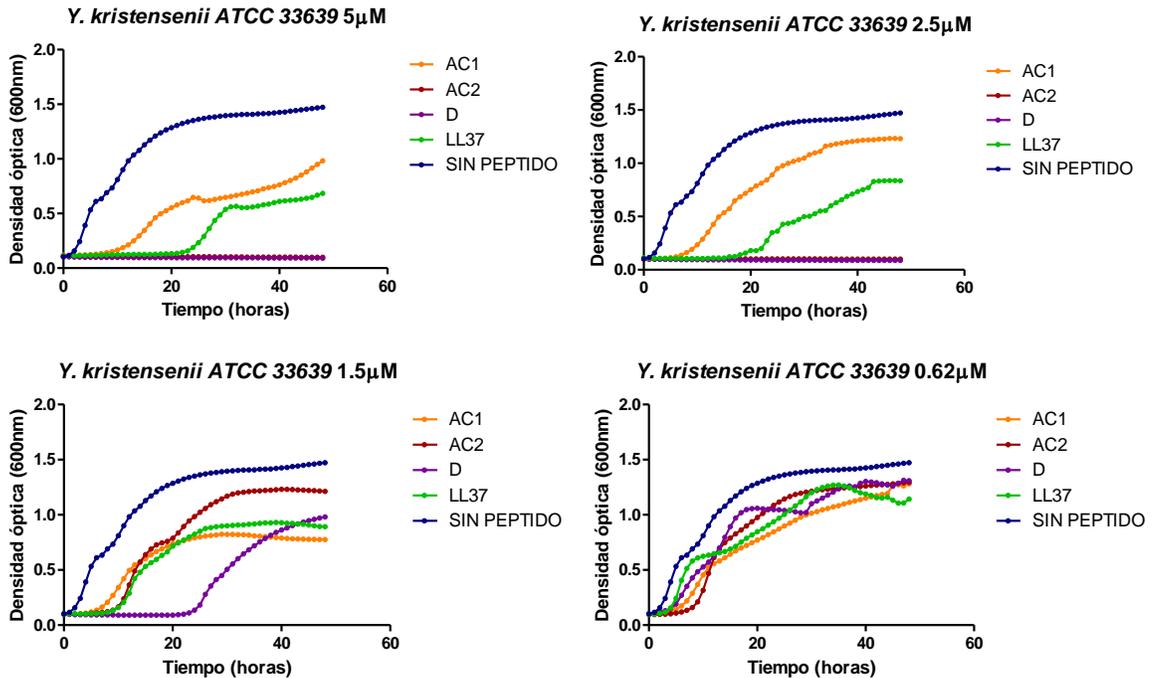


Figura 28. Curva de crecimiento de *Y. kristensenii* ATCC 33639 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

Y. enterocolitica ATCC 23715

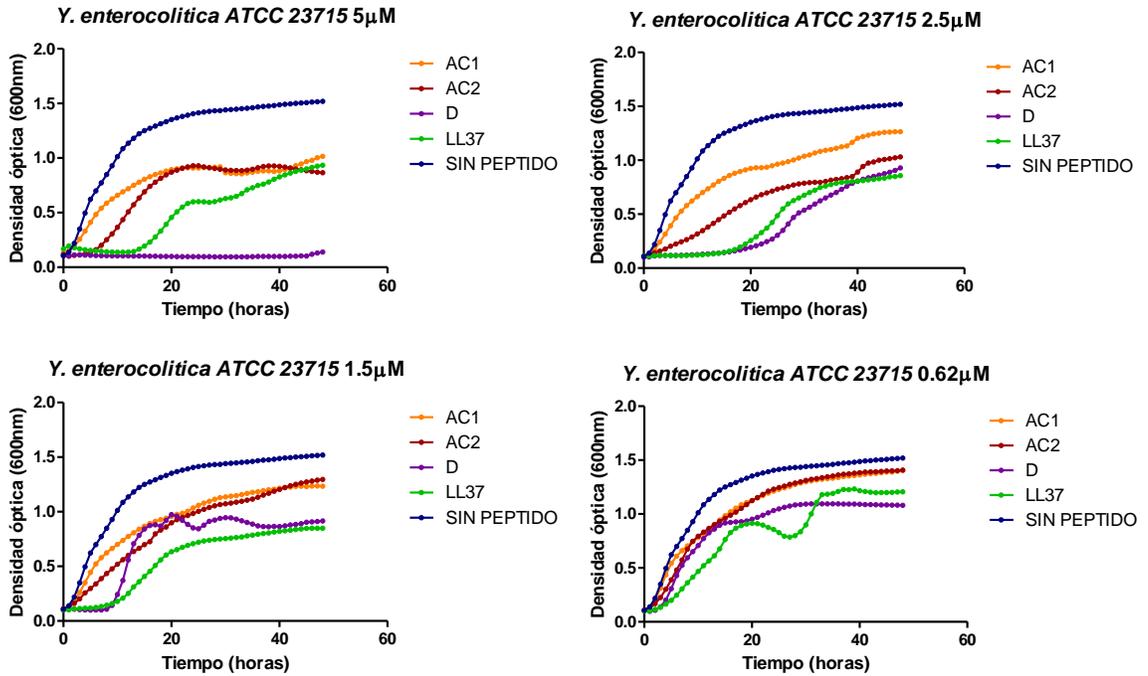
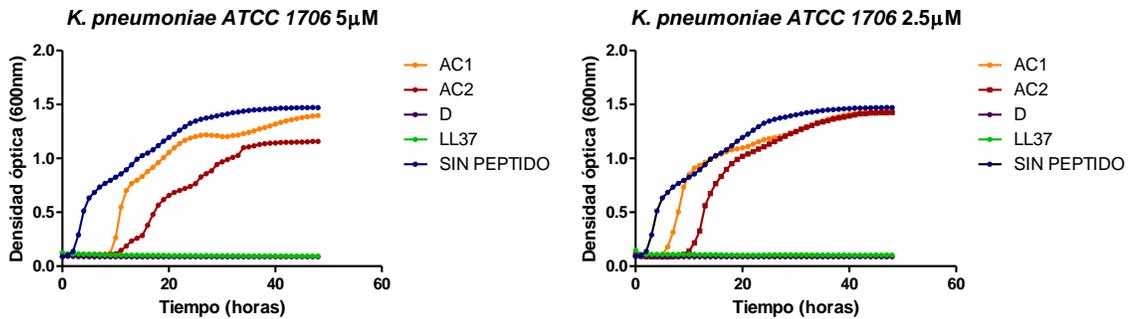


Figura 29. Curva de crecimiento de *Y. enterocolitica* ATCC 23715 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

K. pneumoniae ATCC 1706



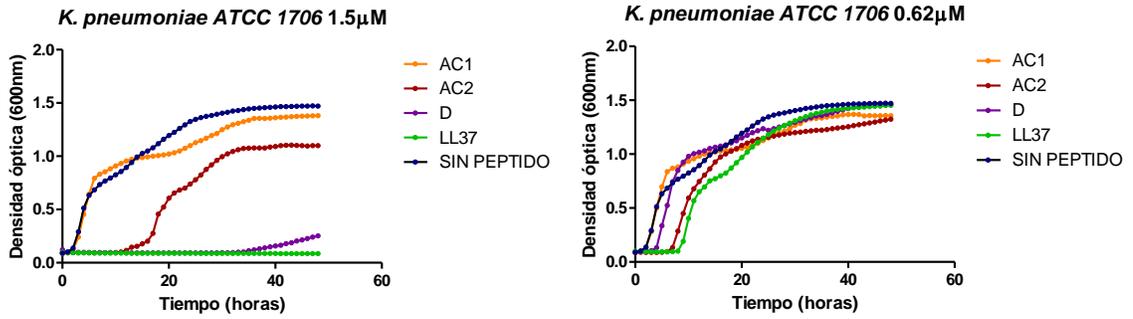


Figura 30. curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 1706 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

K. pneumoniae ATCC 1705

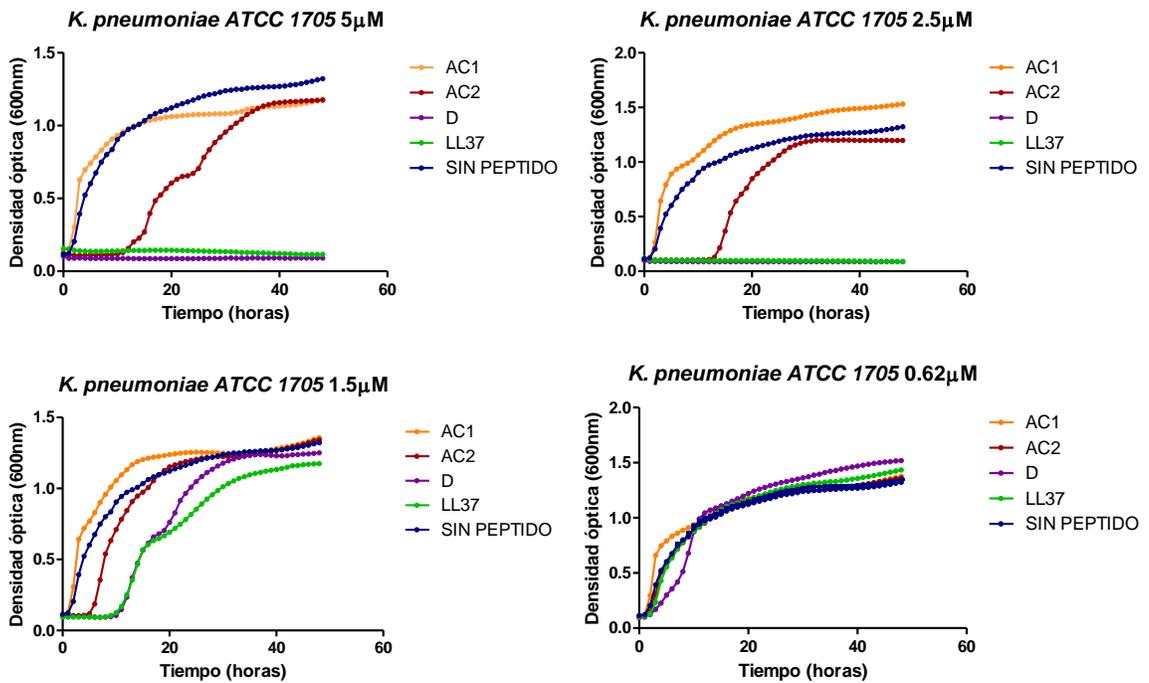


Figura 31. curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 1705 con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

S. typhi nativa

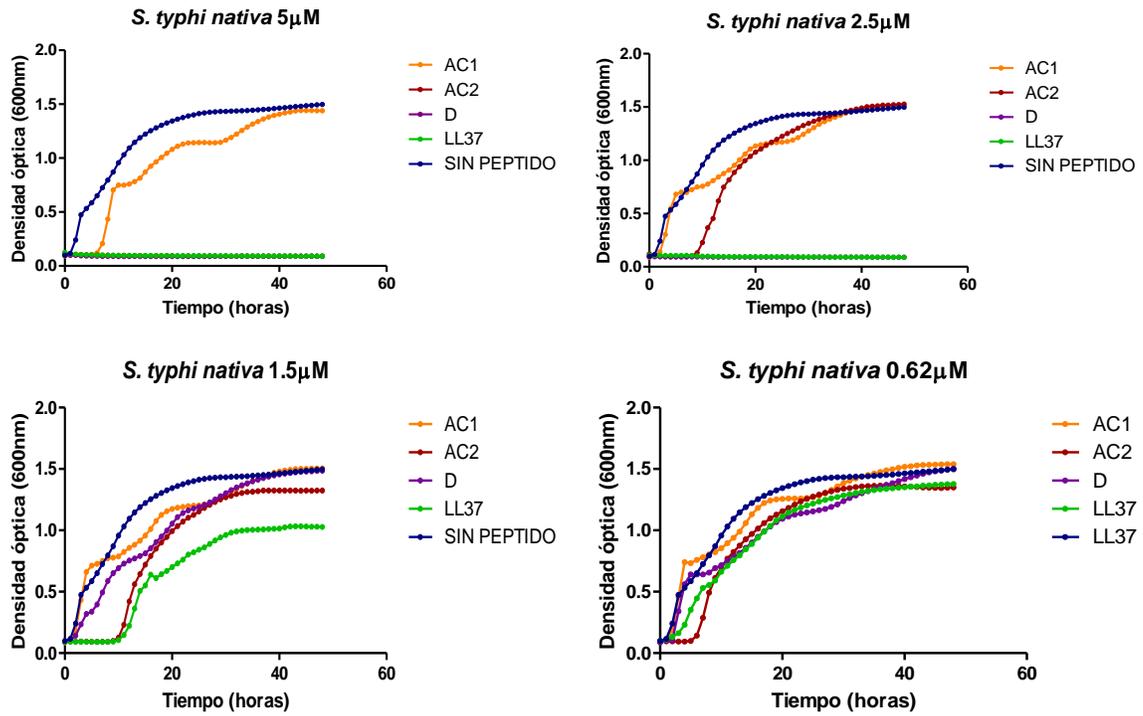
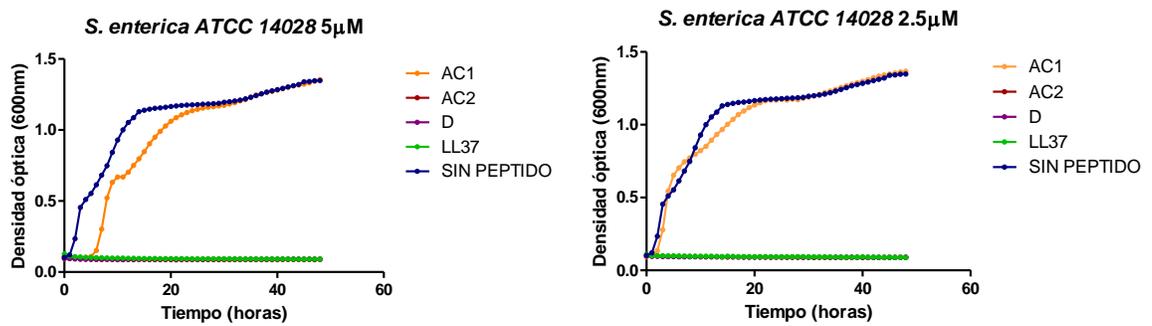


Figura 32. curva de crecimiento de *S. typhi nativa* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

S. enterica ATCC 14028



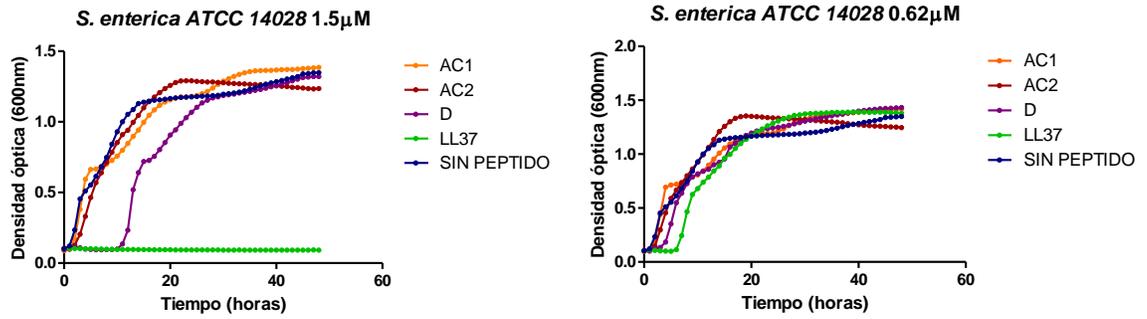


Figura 33. curva de crecimiento de *S. entérica ATCC 14028* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

P. vulgaris ATCC 6380

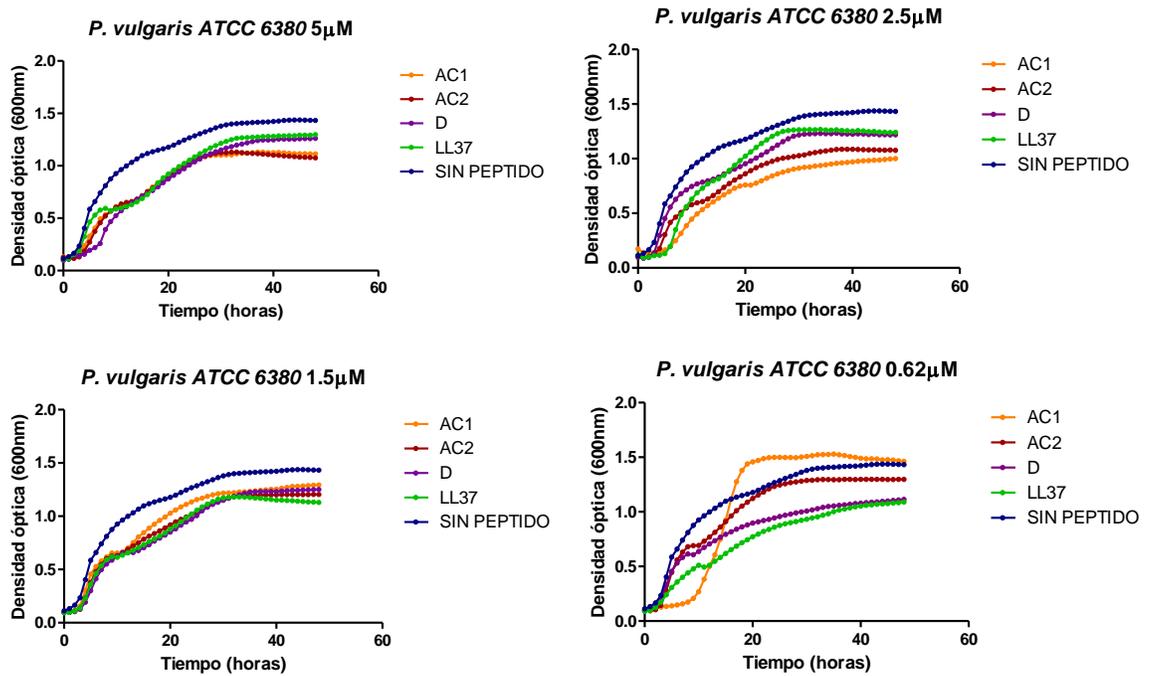


Figura 34. curva de crecimiento de *P. vulgaris ATCC 6380* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

C. freundii nativa

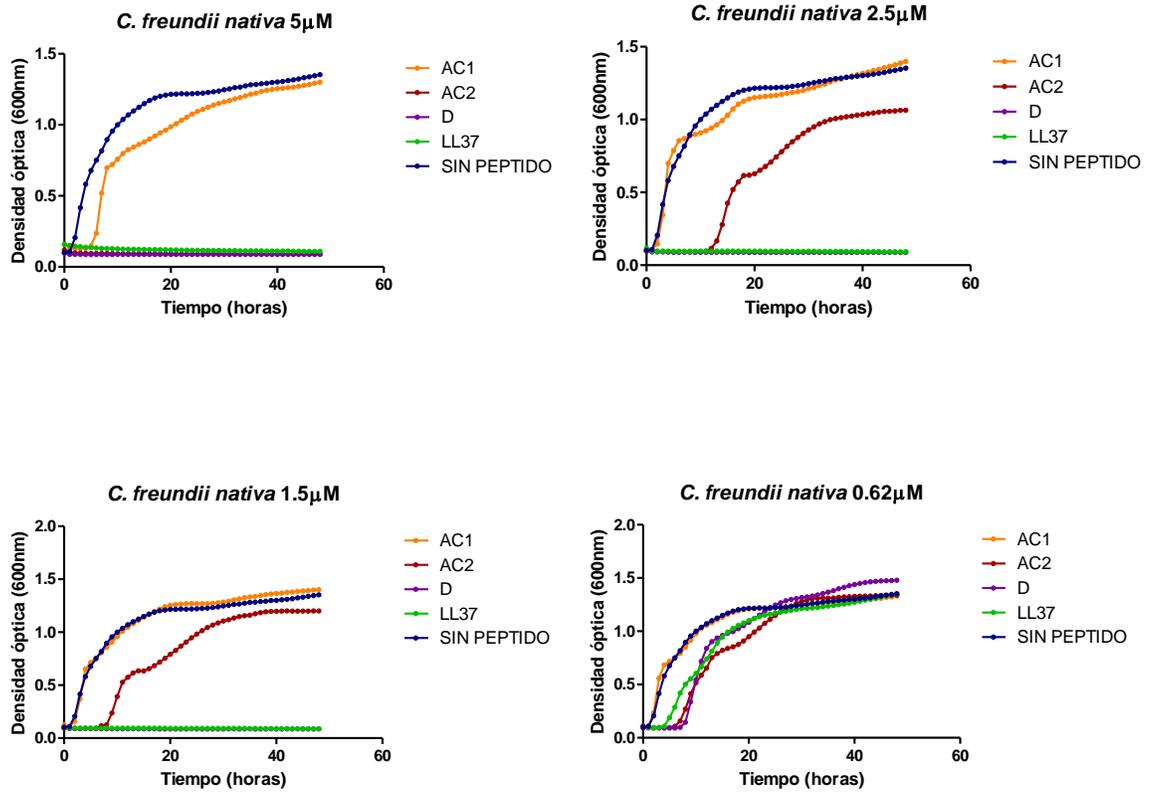
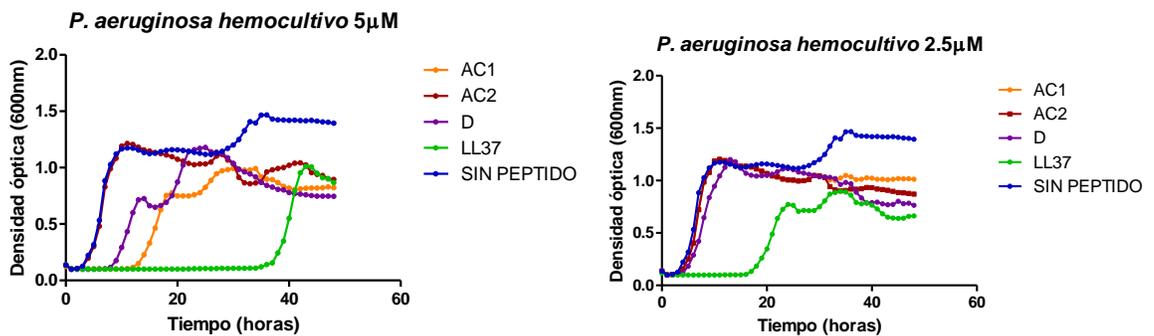


Figura 35. Curva de crecimiento de *C. freundii nativa* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

P. aeruginosa hemocultivo



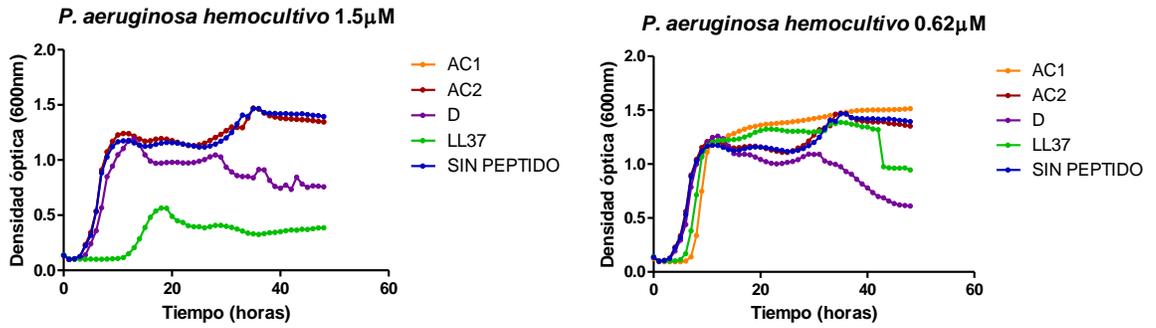


Figura 36. curva de crecimiento de *P. aeruginosa hemocultivo* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

E. coli hemocultivo

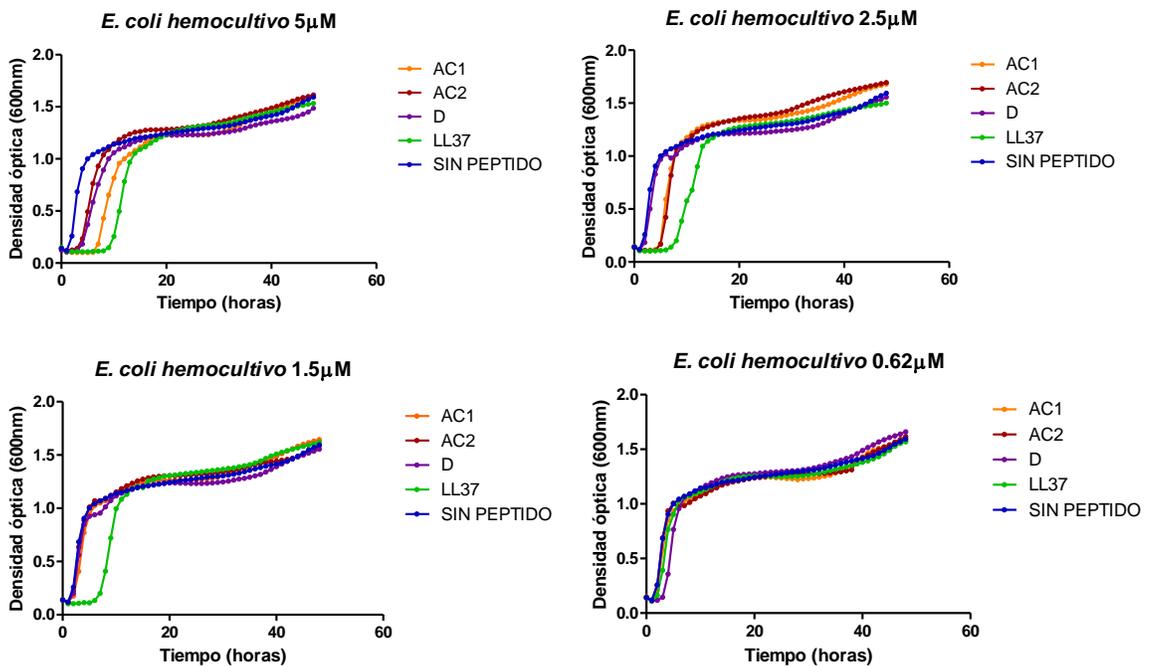


Figura 37. Curva de crecimiento de *E. coli hemocultivo* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

Klebsiella hemocultivo

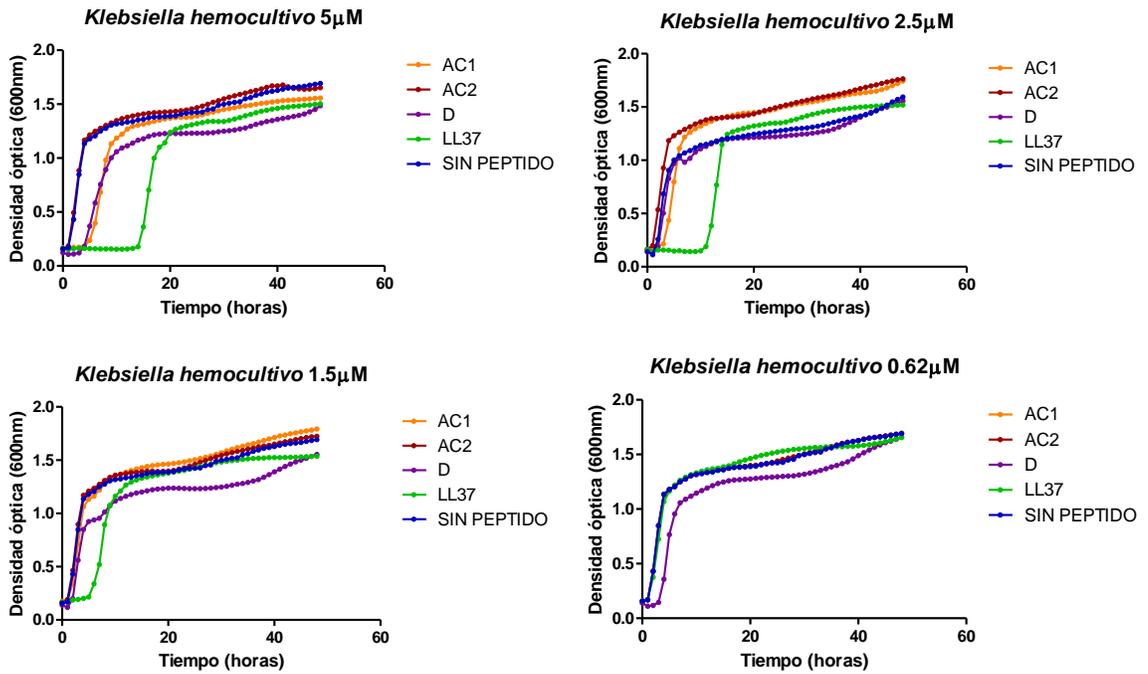
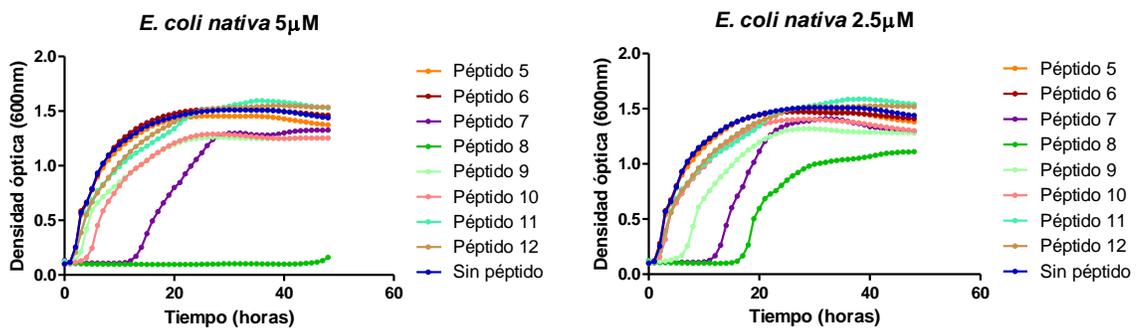


Figura 38. Curva de crecimiento de *Klebsiella hemocultivo* con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 organizado por concentración

Péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12

E. coli nativa



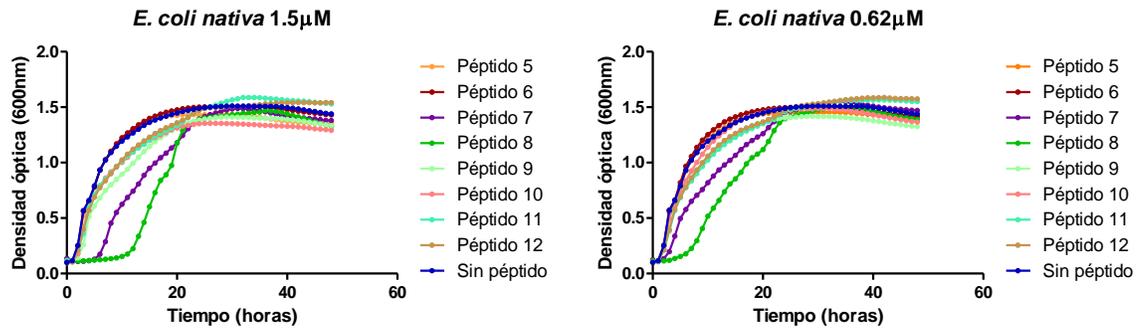


Figura 39. curva de crecimiento de con *E. coli nativa* los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración

K. pneumoniae ATCC 1705

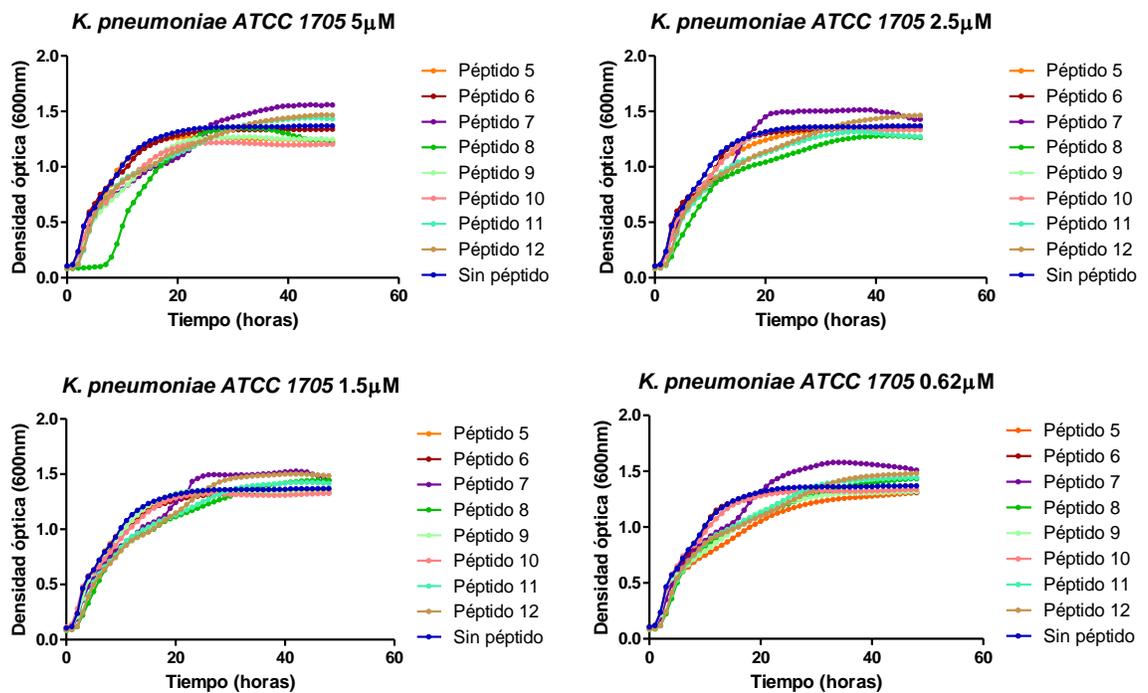


Figura 40. curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 1705 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración

P. aeruginosa ATCC 9027

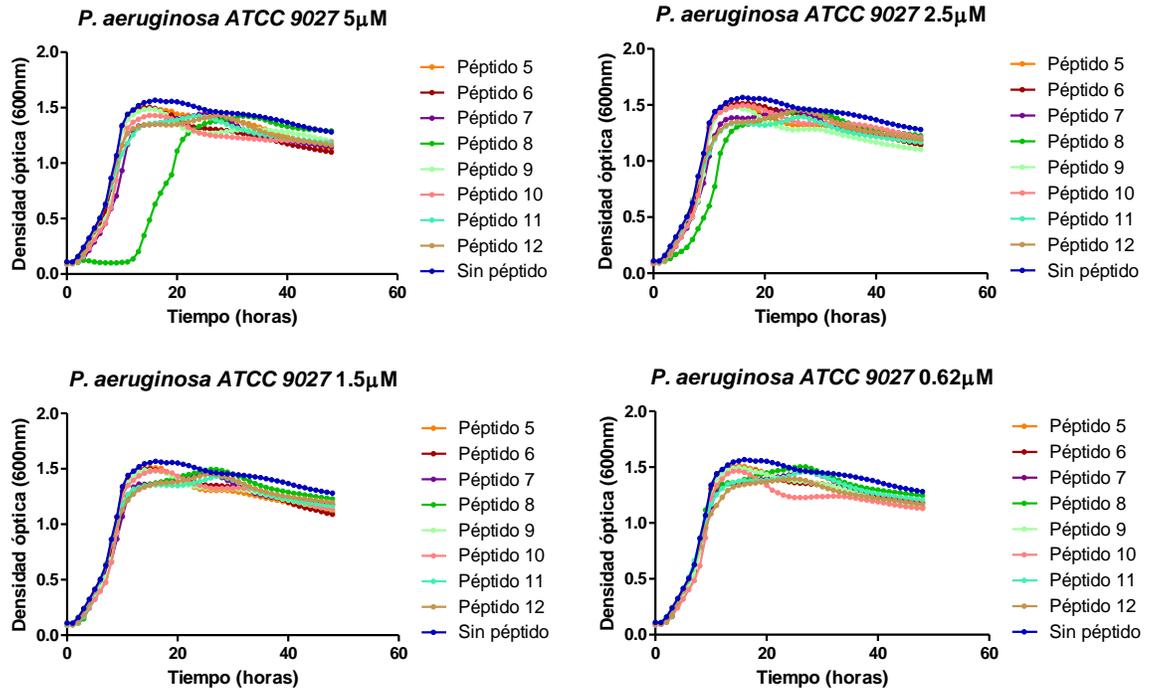
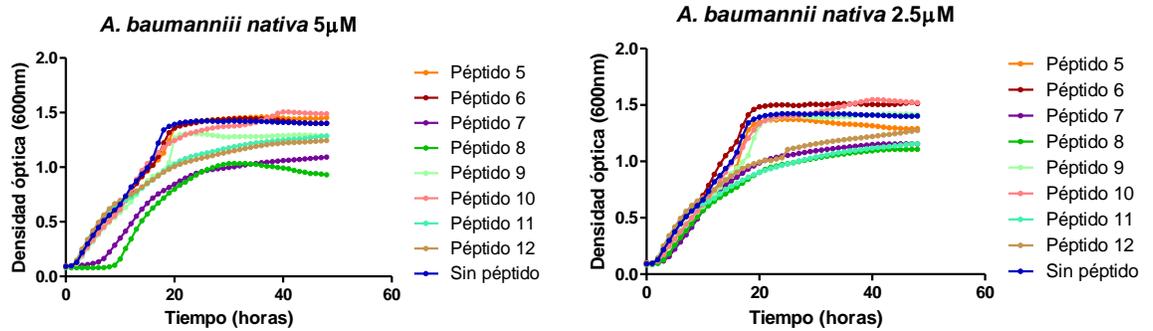


Figura 41. curva de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 9027 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración

***A. baumannii* nativa**



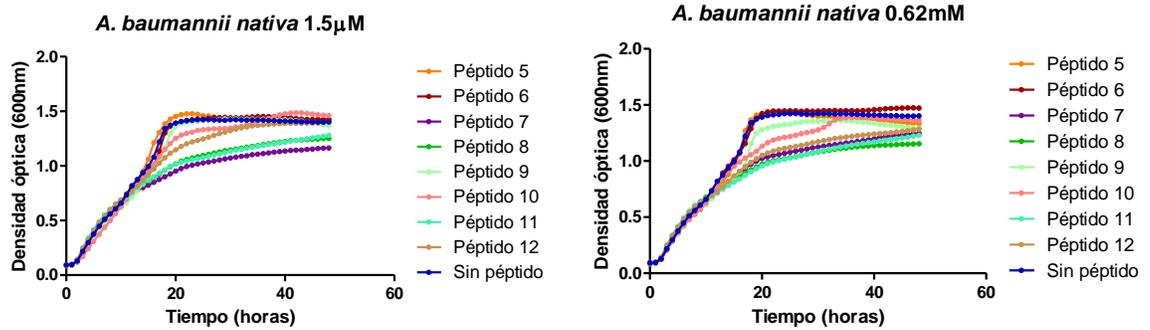


Figura 42. Curva de crecimiento de *A.baumannii nativa* con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración

P. vulgaris ATCC 6380

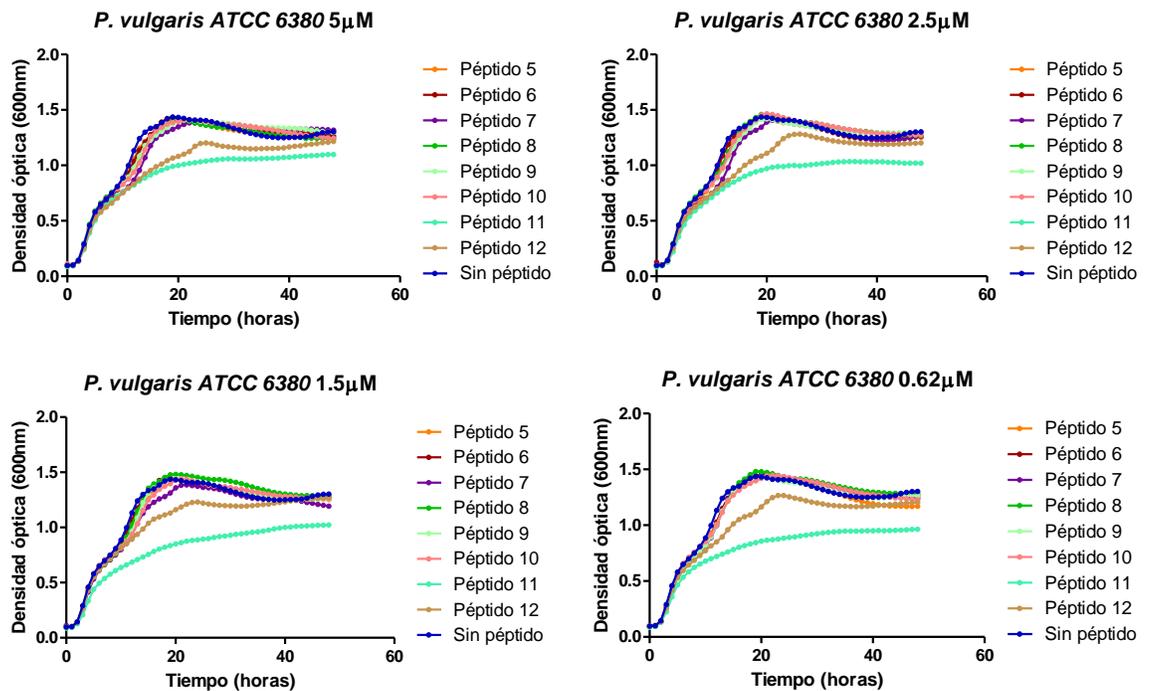


Figura 43. curva de crecimiento de *P. vulgaris* ATCC 6380 con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 y 12 organizado por concentración

4.2 Cristal violeta

Con los ensayos con cristal violeta pudo determinarse si las cepas seleccionadas son productoras de biopelícula y si esta es débil o fuertemente adherente. En la tabla 2 se establecen los rangos para determinar si hubo o no formación de biopelícula y de qué tipo.

Tipo de biopelícula	Rango
No adherente	0,12
Débilmente adherente	0,120-0,240
Fuertemente adherente	>0,240

Tabla 4: rangos para determinar la formación de biopelícula

El primer ensayo de cristal violeta se realizó con el fin de determinar qué cepas eran productoras de biopelícula, para posteriormente realizar ensayos en presencia de los péptidos que mostraron mayor efectividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, y determinar si estos causaban algún efecto en la producción de biopelícula. En la tabla 3 se encuentran los resultados de la producción de biopelícula de cada una de las cepas seleccionadas a las 24 horas de incubación. Asimismo en la figura 44 se observa los resultados de la placa del montaje de las cepas ATCC.

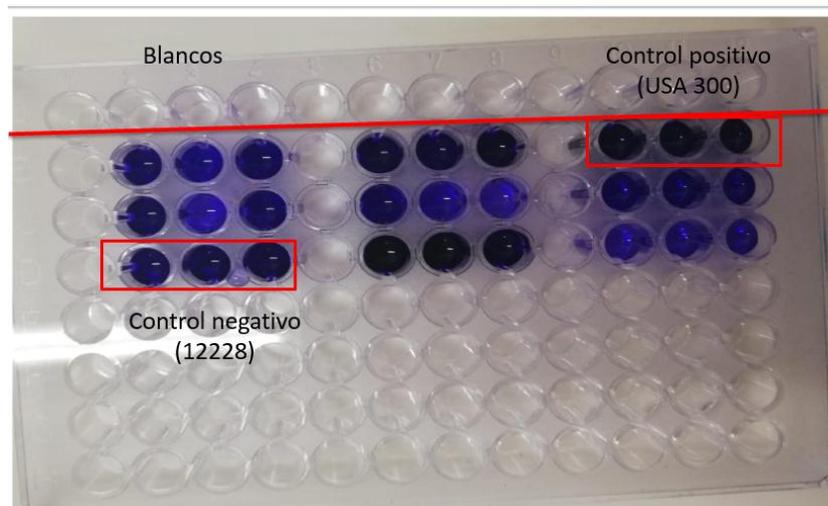


Figura 44. Placa de cristal violeta para las cepas ATCC estudiadas

Formación de biopelícula a las 24 horas de incubación		
Cepa	Promedio de los pozos por triplicado	Tipo de biopelícula

<i>K. pneumoniae</i> 1705	0,238	Débilmente adherente.
<i>A. baumannii</i>	0,449	Fuertemente adherente.
<i>E. coli</i> nativa	0,179	Débilmente adherente.
<i>P. vulgaris</i> 6380	0,115	No adherente.
<i>P. aeruginosa</i> 9027	2,861	Fuertemente adherente.
<i>E. coli</i> hemocultivo	0,188	Débilmente adherente.
<i>Klebsiella</i> hemocultivo	0,184	Débilmente adherente.
<i>Pseudomonas</i> hemocultivo	2,895	Fuertemente adherente.

Tabla 5: resultados de la producción de biopelícula a las 24 horas de incubación.

De las 8 cepas seleccionadas 7 fueron adherentes (87,5%), de las cuales 4, es decir el 62,5% formaron biopelículas débilmente adherentes y solo 3 de las cepas (37,5%) formaron biopelículas fuertemente adherentes. *P. vulgaris* 6380 fue la única de las cepas que no formó biopelícula. En la figura 45 se puede apreciar gráficamente el porcentaje de cepas productoras y no productoras de biopelícula.

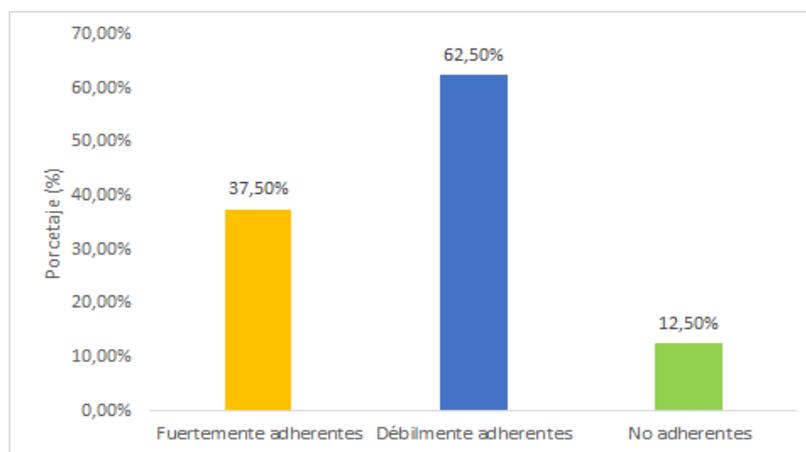


Figura 45. Porcentajes de la formación de biopelícula por el método de Cristal violeta.

5. Discusión

Los péptidos antimicrobianos han surgido como una terapia alternativa, en respuesta al problema de resistencia bacteriana, sus capacidades de inhibir el crecimiento y la formación de biopelícula son una de sus principales actividades y debido a la gran cantidad de péptidos, los mecanismos de acción y los efectos sobre los microorganismos, pueden variar

dependiendo de las condiciones del medio, su estructuración, isomería espacial, carga iónica y células blanco, ya que sin importar que una bacteria pertenezca a la misma familia o género, las alteraciones en su cinética bacteriana pueden ser muy diferentes.

Al realizar un análisis por hora de las cepas utilizadas en este estudio, se puede observar con mayor claridad el efecto que tuvieron los péptidos antimicrobianos a lo largo de las 48 horas de crecimiento; se conoce que en términos generales los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 tienen un efecto inhibitorio sobre las bacterias ATCC de este estudio, sin embargo con el programa Graphpad prism 5 se pudo realizar un estudio estadístico conocido como Two way ANOVA, con el cual se realizó un análisis por hora para observar el comportamiento de cada péptido sobre cada cepa. Este análisis permitió observar la significancia que hubo en el crecimiento de las cepas sin tratamiento con péptidos, y estas mismas cepas tratadas con los péptidos de esta investigación a diferentes concentraciones.

Si se compara el crecimiento de las cepas con y sin tratamiento, se observa que los péptidos tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria o disminución del crecimiento de los microorganismos cuando se compara con el crecimiento de las cepas sin ser tratadas; en numerosos estudios se ha comprobado la efectividad del péptido LL37 como inhibidor del crecimiento en bacterias Gram positivas y Gram negativas, es el caso de la investigación de Pooshang y colaboradores en la cual se evaluó el efecto del LL37 y algunos de sus derivados en cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde se observó que con el LL37 en su forma nativa presentaba inhibición del crecimiento bacteriano, sin embargo sus derivados causaban un efecto inhibitorio mayor frente a estas dos cepas (100) En este trabajo de investigación se evidenció que en algunas bacterias como por ejemplo *Y. kristensenii* 33639 los péptidos LL37-AC2 y DLL37 eran más eficientes en la inhibición o disminución del crecimiento microbiano.

Como es sabido los antibióticos actúan en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, por lo cual se analizó en qué etapa los péptidos en estudio tenían un efecto sobre las bacterias. Se evidenció que su efecto se da en la fase lag y la fase logarítmica, y que en estas etapas el péptido LL37 genera una diferencia significativa entre el crecimiento de la bacterias con y sin tratamiento en el 100% de las cepas con todas las concentraciones utilizadas, demostrando que es el más efectivo de los 4 péptidos evaluados, por su parte los péptidos LL37-AC2 y DLL37, actúan inhibiendo o disminuyendo el crecimiento del 100% de los microorganismos a todas las concentraciones, a excepción de la concentración de 0.62µM donde disminuye el número de cepas en las que se ve un efecto sobre las dos fases de crecimiento mencionadas anteriormente, sin embargo los resultados con estos péptidos son satisfactorios. Por último el péptido LL37-AC1 también demostró tener actividad biológica sobre las cepas utilizadas, no obstante se determinó que a medida que disminuía la concentración del péptido, igualmente decrecía el porcentaje de bacterias afectadas por el tratamiento. Esto demuestra que los péptidos LL37-AC2, DLL37 y LL37 tienen más estabilidad en el efecto que generan sobre las bacterias en todas las concentraciones en estudio.

Por otro lado con las cepas clínicas utilizadas en este estudio todos los péptidos utilizados (LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37), mostraron disminución en el crecimiento de las cepas a una concentración de $5\mu\text{M}$, con las demás concentraciones se observaron resultados variables, sin embargo se resalta que a una concentración de $2.5\mu\text{M}$ el péptido DLL37 es el único que no muestra un efecto en el crecimiento de las cepas tratadas, por otro lado el péptido LL37 fue el único que mostró una actividad biológica significativa a una concentración de $1.5\mu\text{M}$, asimismo el péptido DLL37 es el único que tiene un efecto significativo a una concentración de $0.62\mu\text{M}$.

Al comparar los rangos de tiempo significativamente estadísticos entre las cepas ATCC y las cepas clínicas se puede apreciar claramente la diferencia entre el efecto causado por estos péptidos en cepas ATCC, donde los rangos de significancia van hasta las 48 horas de crecimiento mientras que en las cepas clínicas las significancias obtenidas se registran solamente en las primeras horas de incubación, lo cual indica que estas cepas son más resistentes y poseen factores de virulencia adquiridos que les permiten resistir de una mejor forma el efecto inhibitorio de los péptidos en estudio, sin embargo esto no indica que estos péptidos no hayan generado una disminución o efecto en el crecimiento de las cepas clínicas, ya que a la concentración de $5\mu\text{M}$ se observa que las significancias entre el crecimiento de las cepas con y sin tratamiento se dan en la fase lag de crecimiento, lo cual señala que en esta fase de adaptación de las bacterias al medio, los péptidos tienen la capacidad de dificultar o alargar este proceso que conlleva a que la bacteria inicie su fase exponencial. Igualmente debe tenerse en cuenta que solo se utilizaron 3 cepas clínicas para este trabajo de investigación, por lo cual estos resultados permiten que en investigaciones futuras se utilicen estos péptidos con otras cepas clínicas para comparar el efecto causado con las bacterias de este estudio.

En cuanto a los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 hay que tener en cuenta que se probaron con la finalidad de determinar si estos causaban un efecto inhibitorio o de disminución en el crecimiento de las bacterias estudio, sin embargo las pruebas con estos péptidos fueron suspendidas después de observar que no causaban un efecto significativo comparable al del péptido LL37 y sus derivados en el crecimiento de las cepas; cabe resaltar que estos péptidos fueron diseñados con anterioridad con el propósito de ser probados en micobacterias, pero al no ser efectivos se decidió que fueran probados en las cepas en estudio, con las cuales tampoco se obtuvieron los resultados esperados.

Se observó que en cepas ATCC estos péptidos generaron significancias variadas en comparación del crecimiento de las cepas con y sin tratamiento. A las concentraciones de $2.5\mu\text{M}$ y $1.5\mu\text{M}$ y $0.62\mu\text{M}$ en la mayoría de las cepas no se observó significancia entre el crecimiento de las cepas sin tratar, con algunas excepciones, lo cual demuestra que la actividad biológica de estos péptidos frente a cepas ATCC es muy baja y probablemente no muestren actividad frente a cepas clínicas. Sin embargo, habría que realizar ensayos con estas cepas para confirmar esta teoría.

Al realizar un análisis de los péptidos que causaron un efecto en la fase lag y exponencial de crecimiento se observa que los péptidos 5 y 11 no tuvieron actividad biológica en estas

fases en ninguna de las cepas tratadas, por otro lado con los demás péptidos se observa un efecto sobre el 20, 40 y 60% de las bacterias dependiendo del péptido y la concentración utilizada, al seleccionar solamente cinco de las cepas ATCC por ser especies de importancia clínica actual, aun puede evaluarse en investigaciones futuras el efecto de estos péptidos en las demás cepas, y así conocer con mayor exactitud el efecto que puedan tener sobre los bacilos Gram negativos más importantes.

Como ya se describió anteriormente varios de los péptidos utilizados en este estudio tienen actividad biológica frente a las cepas estudiadas, sin embargo, con los ensayos realizados también se pudo determinar qué fases del crecimiento bacteriano se veían modificadas frente a la acción de estos péptidos. Aunque no hay tiempos específicos de la duración de cada fase del crecimiento en los bacilos Gram negativos estudiados, si se puede comparar las fases con las curvas de crecimiento de las cepas sin tratamiento. Se determinó que a concentraciones como 1.5 μ M y 0.62 μ M los porcentajes de alargamiento de la fase lag eran altos, esto debido a que los péptidos no estaban tan concentrados y después de un periodo de tiempo las bacterias lograban adaptarse al medio y empezar la fase exponencial de crecimiento, no obstante a concentraciones de 5 μ M y 2.5 μ M los porcentajes de alargamiento de la fase lag eran más bajos debido a que a estas concentraciones el crecimiento de la mayoría de bacterias fue inhibido completamente.

La fase Lag es la primera fase donde no se observa crecimiento bacteriano, sin embargo la bacteria realiza actividades metabólicas para adaptarse al medio, Daniel Schultz y Roy Kishony mencionan que esta fase junto con la fase estacionaria no son muy mencionadas, ya que se le da mayor importancia a la fase exponencial de crecimiento, sin embargo la fase lag es la que permite el inicio del crecimiento bacteriano normal, y donde la bacteria comienza un proceso de adaptación a factores como la temperatura, la composición del medio, entre otros; este proceso está determinado por la expresión de genes que permiten la utilización de fuentes de carbono, para que posteriormente se lleve a cabo la expresión de genes ribosomales y de síntesis de aminoácidos, finalmente la célula comienza a crecer en tamaño generando un acumulación de biomasa, para que después empiece el proceso de división celular e inicie la fase logarítmica o exponencial.(101)

Al haber un alargamiento de esta fase se puede sugerir que los péptidos antimicrobianos utilizados generan que las bacterias tomen más tiempo en acoplarse al medio y a las condiciones en las que se encuentran, sin embargo, al transcurrir el tiempo algunas cepas logran adaptarse y empezar la fase exponencial. Schmidtchen y colaboradores reportan que algunos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* o *Streptococcus pyogenes*, tienen la capacidad de secretar proteinasas como la elastasa y la proteinasa alcalina con el potencial de degradar o inactivar el péptido LL37. (102)

Es por esta razón que se ha modificado la estructura de este péptido, creando derivados que puedan resistir la acción de los factores de virulencia bacterianos. Malmsten y colaboradores idearon estrategias que permitieran otorgar resistencia a los péptidos antimicrobianos para resistir la acción proteolítica de distintas bacterias, evaluaron métodos

para aumentar la estabilidad del péptido EFK17, un derivado del LL37 el cual también posee propiedades antimicrobianas, se le realizaron 4 modificaciones en el enantiómero d-triptófano, las cuales redujeron la degradación proteolítica del péptido cuando se puso en contacto con cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, además estas modificaciones mejoraron la acción antimicrobiana del péptido frente a estas bacterias. (103) Comparando estos resultados con los de este estudio, la única cepa en la que se observó mayor inhibición con péptidos derivados del LL37 (LL37-AC2 y DLL37) fue *Y. enterocolitica*, mientras que con las demás cepas el efecto de estos péptidos fue similar o incluso menor que el del péptido en su forma nativa.

Por otro lado se observó que algunas de las cepas presentaron el fenómeno de crecimiento diaúxico, el cual se presenta cuando la bacteria utiliza más de una fuente de carbono en su fase exponencial de crecimiento. Este es un proceso de adaptación donde al agotarse una fuente de carbono, los microorganismos tienen la capacidad de utilizar otra fuente para continuar su proceso normal de crecimiento. El crecimiento diaúxico se observa en las curvas de crecimiento con dos fases exponenciales, separadas por un periodo de latencia (fase lag); Chu y Barnes han sugerido que la fase lag se da como consecuencia del tiempo que requiere la bacteria para activar ciertos genes metabólicos, por otro lado argumentan que la duración esta fase está relacionada con el tiempo que tarda la bacteria en acoplarse a unas nuevas condiciones de crecimiento. Adicionalmente proponen que el cambio a una segunda fuente de carbono puede realizarse incluso antes de que se agote la primera fuente, esto como un método de preparación generado por la bacteria. (104)

Teniendo en cuenta estas hipótesis y realizando una observación de las curvas de crecimiento obtenidas en el presente estudio, se pudo determinar que bacterias del género *Pseudomonas* presentan este tipo de crecimiento con y sin tratamiento con péptidos antimicrobianos, es decir que probablemente este comportamiento es común en este género bacteriano; sin embargo en las cepas de *Yersinia* (*Y. enterocolitica* 23715 y *Y. kristensenii* 33639), se produjo un crecimiento diauxico con los péptidos DLL37 y LL37, lo cual sugiere que estos péptidos pueden tener un efecto en el crecimiento de estos microorganismos y en la forma en que utilizan las fuentes de carbono del medio, sin embargo no se encuentran estudios en los que se observe un fenómeno similar con estos péptidos, por tanto podrían realizarse más estudios en un futuro que comprueben esta teoría.

Después de analizar el comportamiento que tuvieron las cepas en estudio con las curvas de crecimiento, debe tenerse en cuenta también que la acción de los péptidos antimicrobianos puede variar dependiendo de la forma en que se encuentren las bacterias, se conoce que cuando estos microorganismos forman biopelícula son mucho más resistentes que en su forma platónica, por lo cual su actividad biológica puede verse afectada. En estudios como el realizado por Hahm y colaboradores, se menciona que en ensayos in vitro el péptido LL37 tiene actividad sobre la biopelícula de *S. epidermidis* evitando la adhesión y acción de esta, asimismo tiene la capacidad de reducir la biopelícula ya formada, por lo cual es una alternativa importante para combatir infecciones causadas por este tipo de microorganismos. (105) En el presente estudio la evaluación de la producción de

biopelícula se realizó con el método de cristal violeta, se utilizó caldo BHI suplementado con glucosa, ya que en estudios anteriores como el de Torlak y colaboradores, se ha observado una mejor adhesión de las biopelículas a las superficies con este medio de cultivo, adicionalmente mencionan que la adición de glucosa genera un aumento considerable en la producción de biopelícula, en el caso del estudio de Torlak se observó que al adicionar glucosa al 1% la producción de biopelícula en *S. aureus* aumentaba de un 34.4 a un 83.3%. (106)

En este trabajo de investigación se observó que 5 de las 8 cepas seleccionadas presentaron biopelículas débilmente adherentes y en el caso de *P. vulgaris* biopelícula no adherente; solamente *A. baumannii* nativa, *P. aeruginosa* 9027 y *Pseudomonas aeruginosa* obtenida de hemocultivo presentaron biopelículas fuertemente adherentes, con el método de cristal violeta. La determinación de la producción de biopelícula de algunas de las cepas utilizadas, se realizó con el fin de conocer el tipo de biopelícula que producían estas bacterias y que con base en estos resultados en investigaciones futuras se pueda evaluar el efecto de los péptidos antimicrobianos trabajados en la inhibición y formación de esta, lo cual podría generar resultados interesantes ya que se determinaría si estos péptidos tienen o no la capacidad de actuar sobre unos de los factores de virulencia más importantes en la actualidad.

Adicionalmente estos resultados permiten tener una perspectiva del tipo de biopelícula que podrían producir cepas de estos mismos géneros, que sean multirresistentes y de verdadera importancia clínica, en el caso de *Pseudomonas* los resultados muestran que tanto la cepa ATCC como la cepa aislada de hemocultivo producen biopelículas fuertemente adherentes, lo que demuestra la importancia de implementar un tratamiento alternativo que permita inhibir o disminuir el crecimiento de estas. En el caso de géneros como *Klebsiella* y *Escherichia* se obtuvieron resultados de biopelículas débilmente adherentes, sin embargo esto no quiere decir que todas las cepas de estos géneros presenten el mismo tipo de biopelícula, en el estudio de Ortega y Cerón en el 2017 se observó que en cepas aisladas de catéteres urinarios el 100% y el 60% de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* respectivamente eran productoras de biopelícula fuertemente adherente, además en este mismo estudio se observó su producción en cepas de *P. mirabilis* de las cuales el 100% formaron biopelículas débilmente adherentes, en contraste al resultado de este trabajo de investigación donde se utilizó una cepa ATCC de *P. vulgaris* en la que no se registró formación de biopelícula (109). La comparación de los resultados de este estudio con trabajos de investigación realizados por otros autores permite observar que aunque se trabajen con bacterias del mismo género o especie los resultados pueden ser variables, esto por factores como los genes de resistencia que posea cada cepa o la transferencia de estos entre bacterias.

6. Conclusiones

El crecimiento de las cepas se vio afectado en sus diferentes etapas cuando fue expuesto a los péptidos, evidenciándose una actividad antimicrobiana, la cual fue significativa en la mayoría de los casos en comparación con las cepas que no fueron tratadas. Se observó que

los péptidos antimicrobianos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 tienen la capacidad de alargar la fase lag del crecimiento bacteriano, lo cual causa que la fase logarítmica empiece de forma tardía. Esto puede ser un beneficio en el caso de que estos péptidos se usen como terapia alternativa a los antibióticos ya que desde el inicio tendría un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano.

De los 12 péptidos que fueron probados se demostró que los más eficientes fueron los péptidos LL37-AC2, DLL37 y LL37 los cuales mostraron actividad inhibitoria del crecimiento en cepas ATCC hasta la concentración de 1.5 μ M, lo cual quiere decir que esta es la concentración mínima que se necesitaría en un tratamiento alternativo con estos péptidos para dar resolución a una infección causada por estos microorganismos. Por otro lado, los ensayos realizados con las tres cepas clínicas aisladas de hemocultivos mostraron resultados significativos que aunque no son comparables a los obtenidos con las cepas ATCC demuestran que los péptidos LL37 y sus derivados tienen actividad biológica contra estas bacterias, no obstante cabe la posibilidad de que estos péptidos se ensayen en otras cepas clínicas para observar si tienen un efecto inhibitorio o no sobre estas.

De los péptidos antimicrobianos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se concluye que los péptidos 5 y 11 no tienen actividad biológica frente a las bacterias en estudio, y aunque los demás péptidos tienen la capacidad de alargar la fase lag en algunas de las cepas probadas, tienen una actividad biológica considerablemente más baja que la del péptido LL37 y sus derivados. Por otra parte, se recomienda que estos sean ensayados en otro tipo de microorganismos en los cuales puedan tener una actividad biológica significativa.

A pesar de que se necesitan más estudios para determinar si estos péptidos pueden funcionar como un tratamiento que sustituya el uso de antibióticos, los resultados de este trabajo demuestran el potencial de sus efectos antimicrobianos en diferentes cepas de importancia clínica, lo que refleja su viabilidad para poder tratar las distintas infecciones que estas bacterias puedan generar. Asimismo, se considera que este estudio abre muchas puertas para que se generen nuevas investigaciones a partir de los resultados obtenidos.

Recomendaciones

Debido a que no se realizaron curvas de crecimiento con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con todas las cepas ATCC y las cepas clínicas, se recomienda realizar estos ensayos en futuras investigaciones para tener un panorama completo del efecto de estos péptidos sobre estos bacilos Gram negativos.

Por otro lado se sugiere realizar los ensayos de cristal violeta en presencia de los péptidos utilizados en este estudio para observar si tienen un efecto sobre la formación o maduración de las biopelículas producidas por estas cepas.

7.Referencias

1. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios 2009 [185-92]. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014&nrm=iso.
2. Ministerio de Salud y Protección Social. PROGRAMA DE PREVENCIÓN, VIGILANCIA Y CONTROL DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD- IAAS Y LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Colombia2018 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/programa-iaas-ram.pdf>].
3. Lasa I, Pozo J Ld, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección 2005 [163-75]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&nrm=iso.
4. Laura E. Castrillón Rivera APR, * Carmen Padilla Desgarenes**. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel: Rev Mex 2007 [51:7-67]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2007/rmd072d.pdf>.
5. Instituto Nacional de Salud. Infecciones asociadas a dispositivos Colombia 2018 [Available from: <https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx>].
6. María Victoria O, Sandra Yamile S, María Nilse G, Andrea Melissa H, Carolina D, Mauricio B. Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014 2017 [updated 12/01. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3432>].
7. Sochacki KA, Barns KJ, Bucki R, Weisshaar JC. Real-time attack on single Escherichia coli cells by the human antimicrobial peptide LL-37 2011 [updated Apr 19PMC3080975]. 2011/04/06:[E77-81]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3080975/>.
8. Moffatt JH, Harper M, Mansell A, Crane B, Fitzsimons TC, Nation RL, et al. Lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii shows altered signaling through host Toll-like receptors and increased susceptibility to the host antimicrobial peptide LL-37: American Society for Microbiology; 2013 [2012/12/17:[684-9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250952> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584870/>.
9. Feng X, Sambanthamoorthy K, Palys T, Paranaivitana C. The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii 2013 [updated Nov. 2013/09/28:[131-7]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.007>.
10. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation 2008 [updated SepPMC2519444]. 2008/07/02:[4176-82]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519444/pdf/0318-08.pdf>
11. Hell E, Giske CG, Nelson A, Romling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis 2010 [updated Feb. 2009/12/17:[211-5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002576>.

12. Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ, Strasser JE, Weiss AA. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency: American Society for Microbiology (ASM); 2011 [2011/01/03:[1329-37]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199911>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067513/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067513/pdf/1182-10.pdf>.
13. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37 2011 [PMC3131519]. 2011/07/21:[128]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00128/full>.
14. Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides 2014 [updated Dec. 2014/10/07:[32-7]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978114002903>
15. Shi P, Gao Y, Lu Z, Yang L. [Effect of antibacterial peptide LL-37 on the integrity of *Acinetobacter baumannii* biofilm] 2014 [updated Mar. 2014/03/29:[426-9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670464>
16. Spencer JJ, Pitts RE, Pearson RA, King LB. The effects of antimicrobial peptides WAM-1 and LL-37 on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* 2018 [updated Mar 1. 2018/01/26:[Available from: <https://doi.org/10.1093/femspd/fty007>
17. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores [10.1016/j.eimc.2013.03.016]. 2013 [402-9]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-causadas-por-bacterias-gramnegativas-S0213005X13000955>.
18. Cristhian H-G, Víctor MB, Gabriel M, Adriana C, Juan José M, Elsa de la C, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia 2014 [updated 04/01. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1667>.
19. García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas 2014 [129-35]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000100013&nrm=iso.
20. Calderón Rojas G AUL. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. 2016 [Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
21. R. Vignoli VS. Principales mecanismos de resistencia antibiótica [Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>.
22. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas 2008 [227-32]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000300007&nrm=iso.
23. SUÁREZ CJ, KATTÁN JN, GUZMÁN AM, VILLEGAS MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control 2006 [85-93]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922006000200006&nrm=iso.

24. Daniel AZ. E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras 2015 [22 (2): 57-63]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2015/ms152b.pdf>.
25. Farfán-García AEA-R, Sandra Catherine Vargas-Cárdenas, Fabiola Andrea Vargas-Remolina, Lizeth Viviana. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena 2016 [438-50]. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000400009&nrm=iso.
26. Raúl Garza-Velasco MBG-S. La patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas ocasionadas por ECET y ECEP [Available from: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-ECETyECEP.pdf>].
27. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK. The bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli: transcriptional regulation by environmental signals 1996 [updated Apr. 1996/04/01:[87-100].
28. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. Salud Pública de México. 2007;49:376-86.
29. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention 2005 [465-83]. Available from: <https://cmr.asm.org/content/cmr/18/3/465.full.pdf>.
30. Arias B I, Huguet T JC. Detección Molecular de Toxinas Termoestable y Termolabil de Escherichia coli mediante Hibridación 2002 [193-6]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342002000400005&nrm=iso.
31. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli 2002 [464-75]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&nrm=iso.
32. Pasqua M, Michelacci V, Di Martino ML, Tozzoli R, Grossi M, Colonna B, et al. The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive E. coli (EIEC) toward Pathogenicity: Frontiers Media S.A.; 2017 [2390-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259590>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5723341/>.
33. RÍOS JCC. DETECCIÓN MOLECULAR DE FACTORES DE VIRULENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE Escherichia coli AISLADA DE CONCHA DE ABANICO (Argopecten purpuratus) PROCEDENTES DEL DEPARTAMENTO DE ANCASH- PERÚ” 2018 [Available from: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/3863/Deteccion_CarbajalRios_Joysi.pdf?sequence=1&isAllowed=y].
34. Bai X, Mernelius S, Jernberg C, Einemo I-M, Monecke S, Ehricht R, et al. Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infection in Jönköping County, Sweden: Occurrence and Molecular Characteristics in Correlation With Clinical Symptoms and Duration of stx Shedding: Frontiers Media S.A.; 2018 [125-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765909>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939558/>.

35. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascón J, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in Traveler's Diarrhea Strains 2000 [1780-3]. Available from: <https://doi.org/10.1086/317617>.
36. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection 2006 [updated Jan. 2006/02/03:[12-8].
37. Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durand D, Mercado EH, Contreras C, et al. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea 2011 [21-8]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000100004&nrm=iso.
38. Le Bouguéne C, Servin AL. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens 2006 [185-94]. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x>.
39. Conte MP, Longhi C, Marazzato M, Conte AL, Aleandri M, Lepanto MS, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features: *BioMed Central*; 2014 [748-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338542>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4210564/>.
40. Lee JG, Han DS, Jo SV, Lee AR, Park CH, Eun CS, et al. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes: *Public Library of Science*; 2019 [e0216165-e]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31034508>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6488085/>.
41. Cristina Seral, Gude MJ, Castillo FJ. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas 2012 [25(2):89-99].
42. Jaramillo-Aristizábal MC, Jaramillo-Lozano JE, Cuevas-Peláez M. Endoftalmitis endógena asociada a absceso hepático por *Klebsiella pneumoniae*. Descripción de tres casos y revisión de la literatura 2016 [228-36]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932016000200011&nrm=iso.
43. López Vargas JA, Echeverri Toro LM. *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia 2010 [157-65]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200007&nrm=iso.
44. Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns 2012 [updated May. 2012/04/11:[399-407].
45. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions: *American Society for Microbiology*; 2012 [682-707]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034326>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485753/>.
46. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance: *American Society for Microbiology*; 2015 [2015/07/13:[5873-84]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26169401>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576115/>.

47. Merino MF. Diseño y mecanismos de acción molecular de nuevos inhibidores de β -lactamasa [Available from: <https://eprints.ucm.es/49194/1/MARIA%20FRESCO%20MERINO%20%281%29.pdf>].
48. Calvo J, Cantón R, Cuenca FF, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos [Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>].
49. Liu L-H, Wang N-Y, Wu AY-J, Lin C-C, Lee C-M, Liu C-P. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes 2018 [565-72]. Available from: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1086121430> <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016>.
50. Liu L, Lan R, Liu L, Wang Y, Zhang Y, Wang Y, et al. Antimicrobial Resistance and Cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China: *Frontiers Media S.A.*; 2017 [1357-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775715> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518651/>.
51. Shao Y, Xiong Z, Li X, Hu L, Shen J, Li T, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Citrobacter freundii* isolates from Anhui province, PR China 2011 [updated Dec. 2011/08/06:[1801-5].
52. Liu L, Chen D, Liu L, Lan R, Hao S, Jin W, et al. Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals: *Frontiers Media S.A.*; 2018 [233-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30050870> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6052900/>.
53. Eftekhari FP, Seyedpour SMM. Prevalence of qnr and aac(6)-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran: *Iranian Journal of Medical Sciences*; 2015 [515-21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538780> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4628142/>.
54. Trivedi M, Branton A, Trivedi D, Nayak G, Mondal S, Jana S. Phenotyping and Genotyping Characterization of *Proteus vulgaris* After Biofield Treatment 2015 [updated 11/09. 66-73].
55. Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens 2018 [updated JulPMC6056842]. 2018/06/15: [
56. Ishida H, Fuziwara H, Kaibori Y, Horiuchi T, Sato K, Osada Y. Cloning of multidrug resistance gene pqrA from *Proteus vulgaris* 1995 [453-7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726514> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162559/>.
57. Wang Y, Wang Y, Wu C-M, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, et al. Detection of the staphylococcal multiresistance gene cfr in *Proteus vulgaris* of food animal origin 2011 [2521-6]. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr322>.
58. Zhang Y, Lei C-W, Wang H-N. Identification of a novel conjugative plasmid carrying the multiresistance gene cfr in *Proteus vulgaris* isolated from swine origin in China 2019 [updated 2019/09/06/. 102440]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147619X19300630>.
59. Gonzalez Pedraza J, Pereira Sanandres N, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villarreal Camacho J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección 2014 [73-94]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009&nrm=iso.

60. Siriken B. [Salmonella pathogenicity islands] 2013 [updated Jan. Salmonella Patojenite Adalari; 2013/02/09:[181-8].
61. Inda Marcela Figueroa Ochoa AVR. Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp 2005 [Vol. 47, No. 1-2 pp. 25 - 42]. Available from: medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf.
62. Zhang S, Yin Y, Jones MB, Zhang Z, Deatherage Kaiser BL, Dinsmore BA, et al. Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data: American Society for Microbiology; 2015 [2015/03/11:[1685-92]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25762776>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400759/>.
63. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano 2016 [32-44]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342016000100005&nrm=iso.
64. Tan SY, Tan IKP, Tan MF, Dutta A, Choo SW. Evolutionary study of Yersinia genomes deciphers emergence of human pathogenic species: Nature Publishing Group; 2016 [36116-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27796355>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5086877/>.
65. Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. Antimicrobial Resistance in Yersinia enterocolitica 2015 [updated 12/31. 77-104].
66. Gaspa HR. Infección en quemaduras 2005 [111 - 7]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cplast/cp-2005/cp052h.pdf>.
67. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas 2013 [136-50]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010&nrm=iso.
68. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies 2019 [updated Jan - Feb. 2018/12/01:[177-92].
69. Püntener-Simmen S, Zurfluh K, Schmitt S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Isolates Belonging to the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii (ACB) Complex Isolated From Animals Treated at a Veterinary Hospital in Switzerland: Frontiers Media S.A.; 2019 [17-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30805352>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6370676/>.
70. Vanegas-MÚNera JM, Roncancio-Villamil G, Jiménez-Quiceno JN. Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico 2014 [233-46]. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=261132654008>.
71. Villalón P, Ortega M, Sáez-Nieto JA, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Garrido N, et al. Dynamics of a Sporadic Nosocomial Acinetobacter calcoaceticus - Acinetobacter baumannii Complex Population: Frontiers Media S.A.; 2019 [593-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30967856>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6440288/>.

72. Pestaña MÍ, del Pozo JL. Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia* 2018 [updated 2018/03/01/. 2931-40]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541218300337>.
73. Viñas AM. aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* complex en pacientes con fibrosis quística: Universidad Autonoma De Barcelona. ; 2015
[Available from: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf.
74. Sánchez Hernández G. Confirmación de un brote de bacteriemia por *Burkholderia cepacia* en una unidad de cuidados intensivos pediátricos mediante biología molecular Universidad Nacional Autonoma de Mexico 2011.
75. Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA, Estrada-de los Santos P. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos 2019 [updated 2019/01/01/. 84-92]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754118300038>.
76. Butt AT, Thomas MS. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Burkholderia* Species: *Frontiers Media S.A.*; 2017 [460-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29164069>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5681537/>.
77. Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species 2016 [2016/07/30:[82-90]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620956>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5022785/>.
78. Díaz Caballero AJ, Vivas Reyes R, Puerta L, Ahumado Monterrosa M, Arévalo Tovar L, Cabrales Salgado R, et al. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión 2011 [195-201]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852011000300005&nrm=iso.
79. Nazar C J. Biofilms bacterianos 2007 [161-72]. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162007000100011&nrm=iso.
80. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections 2018 [updated Jan. 2017/10/19:[7-11].
81. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review 2016 [updated Jan. 2015/09/18:[1-15].
82. Loera Muro A, Ramírez Castillo FY, Avelar González FJ, Guerrero Barrera AL. Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir 2012 [49-56]. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408007>.
83. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents 2015 [2015/04/16:[493-512].
84. Cooper S. Bacterial Growth and Division: Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles: Elsevier Science; 2012.
85. Jurtshuk P, Jr. Bacterial Metabolism. In: th, Baron S, editors. *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston The University of Texas Medical Branch at Galveston.; 1996.
86. Varela G. FISILOGIA Y METABOLISMO BACTERIANO [Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>.

87. Merino LA. Fisiología bacteriana Universidad Nacional del Nordeste [Available from: <http://isft194.edu.ar/wp-content/uploads/2013/03/APUNTE-Metabolismo-bacteriano.pdf>].
88. Jesús Ramírez Santos GCF, ** M. Carmen Gómez Eichelmann*. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli* 2005 [Vol. 47, No. 3-4]. Available from: https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3_4f.pdf.
89. Lakshmaiah Narayana J, Chen JY. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents 2015 [updated Oct. 2015/06/07:[88-94].
90. Zhang L-j, Gallo RL. Antimicrobial peptides: Elsevier; 2016 [R14-R9]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.
91. Mangoni ML, McDermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations 2016 [2016/02/10:[167-73]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26738772>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789108/>.
92. Agier J, Efenberger M, Brzezińska-Błaszczyk E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(2):225-35.
93. Zeth K, Sancho-Vaello E. The Human Antimicrobial Peptides Dermcidin and LL-37 Show Novel Distinct Pathways in Membrane Interactions. *Frontiers in Chemistry*. 2017;5(86).
94. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders 1997 [updated Jun 13. 1997/06/13:[15258-63].
95. Yang SC, Hwang TL. The potential impacts of formyl peptide receptor 1 in inflammatory diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2016;8:436-49.
96. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses 2002 [3883-91]. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/169/7/3883.full.pdf>.
97. Levast B, Hogan D, van Kessel J, Strom S, Walker S, Zhu J, et al. Synthetic Cationic Peptide IDR-1002 and Human Cathelicidin LL37 Modulate the Cell Innate Response but Differentially Impact PRRSV Replication in vitro: *Frontiers Media S.A.*; 2019 [233-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31355218>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6640542/>.
98. Jiang Z, Higgins MP, Whitehurst J, Kisich KO, Voskuil MI, Hodges RS. Anti-tuberculosis activity of α -helical antimicrobial peptides: de novo designed L- and D-enantiomers versus L- and D-LL-37 2011 [241-52]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20858205>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263701/>.
99. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37: *Frontiers Research Foundation*; 2011 [128-]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772832>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3131519/>.
100. Aghazadeh H, Memariani H, Ranjbar R, Bagheri KP. The activity and action mechanism of novel short selective LL-37-derived anticancer peptides against clinical isolates of *Escherichia coli*: *Wiley Online Library*; 2019 [75-83]. Available from: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13381>.
101. Schultz D, Kishony R. Optimization and control in bacterial Lag phase 2013 [updated 12/16. 120].

102. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular Microbiology*. 2002;46(1):157-68.
103. Strömstedt AA, Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):593-602.
104. Chu D, Barnes DJ. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Sci Rep*. 2016;6(1):25191.
105. Park S-C, Park Y, Hahm K-S. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(9):5971-92.
106. Torlak E, Korkut E, Uncu AT, Şener Y. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey. *Journal of Infection and Public Health*. 2017;10(6):809-13.
107. Muñoz L, Guevara F, Salazar F, Navarrete J, Pinilla G. Péptidos antimicrobianos análogos a la catelicidina humana ll-37. *Diario de campo*. 2018;3:190-206
108. Liu W, Chen Y, Ming X, Kong Y. Design and Synthesis of a Novel Cationic Peptide with Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. *BioMed Research International*. 2015;1-6.
109. Ortega S, Ceron G. Producción de biopelículas y Resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física. *Investigación en discapacidad*. 2017;6(3):116-121.

Anexo 1

Horas de significancia entre las cepas sin tratamiento y tratadas con los péptidos LL37-AC1, LL37-AC2, DLL37 y LL37 a 5µM, 2.5µM, 1,5µM y 0.62µM

	Concentración de 5µM				Concentración de 2.5µM				Concentración de 1.5µM				Concentración de 0.62µM			
	LL37-AC1	LL37-AC2	DLL37	LL37	LL37-AC1	LL37-AC2	DLL37	LL37	LL37-AC1	LL37-AC2	DLL37	LL37	LL37-AC1	LL37-AC2	DLL37	LL37
CEPAS ATCC																
<i>E. coli 18239</i>	1 a 48	1 a 48	2 a 48	1 a 48	1 a 17	1 a 48	2 a 48	1 a 48	1 a 6	1 a 48	2 a 48	1 a 48	23 a 29, 33 a 48	1 a 10, 38 a 48	2 a 5, 8 a 20	1 a 48
<i>E. coli nativa</i>	3 a 48	1 a 48	1 a 48	1 a 48	3 a 26, 36 a 48	1 a 48	1 a 48	1 a 48	3 a 48	1 a 48	1 a 48	1 a 48	3 a 48	1 a 43	1 a 7	1 a 18, 36 a 48
<i>C. freundii</i>	2 a 36	3 a 48	2 a 48	2 a 48	12 a 15	3 a 48	2 a 48	2 a 48	n/s	2 a 48	2 a 48	2 a 48	n/s	3 a 30	2 a 21	2 a 25
<i>P. vulgaris 6380</i>	4 a 48	4 a 48	3 a 48	4 a 48	3 a 48	4 a 48	3 a 48	3 a 48	4 a 48	4 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 15	12 a 14	4 a 48	4 a 48
<i>Y. enterocolitica 23715</i>	4 a 48	2 a 48	2 a 48	3 a 48	4 a 48	3 a 48	2 a 48	3 a 48	4 a 48	3 a 48	2 a 48	2 a 48	n/s	3 a 48	2 a 48	2 a 48
<i>Y. kristensenii 33639</i>	4 a 14, 26 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 11, 17 a 40	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 9, 15 a 21, 33 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 8, 13 a 32, 45 a 46	3 a 48	3 a 48	3 a 48
<i>P. putida 31483</i>	7 a 48	4 a 48	2 a 48	0 a 1, 3 a 48	9, 13 a 18	4 a 48	2 a 48	0, 2 a 48	8 a 9, 13 a 20	4 a 48	3 a 26, 31 a 48	2 a 48	8	8 a 9, 28 a 48	2 a 10, 12 a 21	2 a 6, 11 a 48
<i>B. cepacia 25608</i>	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	5 a 9	3 a 48	3 a 48	3 a 48	5 a 9	3 a 48	4 a 48	3 a 48
<i>P. aeruginosa 9027</i>	3 a 13	2 a 48	2 a 48	2 a 48	2 a 7	2 a 48	2 a 13	2 a 21	n/s	3 a 19	2 a 11	2 a 19	2 a 6, 13 a 17	2 a 48	40 a 48	3 a 7, 15, 28 a 29, 31, 45 a 48
<i>P. aeruginosa nativa</i>	3 a 48	6 a 11, 15 a 19, 29	3 a 48	3 a 48	3 a 11, 31 a 35	3 a 48	3 a 48	3 a 48	7 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 16	8 a 48	7 a 48	4 a 48

		a 37														
PA 01	2 a 32	1 a 48	4 a 48	0 a 1, 3 a 48	2 a 22	2 a 48	4 a 27	3 a 48	2 a 48	2 a 36	3 a 18	4 a 46	8 a 20	2 a 48	9 a 18	3 a 5, 16 a 35
S. enterica 14028	2 a 25	2 a 48	2 a 48	2 a 48	2 a 3, 9 a 19	2 a 48	2 a 48	2 a 48	2 a 3, 8 a 18	2 a 4, 8 a 12	2 a 24	2 a 48	4 a 5, 9 a 16	2 a 3, 5 a 7	2 a 5, 10 a 15	2 a 18,
S. typhi	2 a 48	3 a 48	2 a 48	2 a 48	2 a 3, 8 a 35	3 a 28	2 a 48	2 a 48	2, 9 a 36	3 a 48	3 a 32	2 a 48	2, 10 a 15, 19 a 31,	3 a 27, 41 a 48	2, 8 a 36,	3 a 37, 42 a 48
Acinetobacte r 49137	2 a 48	2 a 48	3 a 48	3 a 48	2 a 48	2 a 34	3 a 48	3 a 48	2 a 14, 21 a 26	2 a 48	3 a 39	3 a 35	n/s	4 a 8	5 a 8, 10 a 36	3 a 48
A. baumannii nativa	3 a 48	3 a 48	3 a 48	2 a 48	3 a 21	3 a 48	3 a 48	2 a 48	3 a 13	3 a 48	3 a 48	2 a 48	3 a 13	3 a 48	3 a 17, 19 a 38	2 a 48
K. pneumoniae 1705	22 a 48	3 a 48	2 a 48	4 a 48	n/s	3 a 25, 46 a 48	2 a 48	2 a 48	n/s	3 a 12	2 a 28	2 a 48	n/s	N/S	2 a 14	3 a 4
K. pneumoniae 1706	3 a 12, 15 a 18, 29 a 36	4 a 48	3 a 48	3 a 48	3 a 8	4 a 31	3 a 48	3 a 48	20 a 29	4 a 48	3 a 48	3 a 48	22 a 26	4 a 48	3 a 6, 8 a 14, 22 a 38	3 a 30
CEPAS CLINICAS																
Klebsiella hemocultivo	3 a 7	n/s	4 a 10	7 a 14	3 a 4	2 a 3	N/S	7 a 11	n/s	N/S	N/S	n/s	n/s	N/S	n/s	N/S
E. coli hemocultivo	4 a 8	3 a 4	3 a 6	5 a 10	4 a 5	3 a 6	N/S	5 a 8	n/s	N/S	N/S	5 a 7	n/s	N/S	3 a 4	N/S
P. aeruginosa hemocultivo	8 a 14	3 a 4	7 a 10	32 a 38	n/s	3 a 6	N/S	n/s	n/s	N/S	N/S	n/s	N/S	N/S	45 a 48	N/S

Anexo 2

Horas de significancia entre las cepas sin tratamiento y tratadas con los péptidos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 5µM, 2.5µM, 1.5µM y 0.62µM

	Concentración de 5µM							
	Péptido 5	Péptido 6	Péptido 7	Péptido 8	Péptido 9	Péptido 10	Péptido 11	Péptido 12
<i>E. coli nativa</i>	N/S	N/S	5 a 16	14 a 48	N/S	3 a 19	N/S	N/S
<i>P. aeruginosa 9027</i>	40 a 48	20 a 48	N/S	5 a 10	8 a 9, 19 a 30	7 a 10, 19 a 42	10 a 20, 34 a 37	10 a 22
<i>A. baumannii</i>	18	17 a 18	4 a 13	7 a 48	17 A 19	N/S	N/S	N/S
<i>K. pneumoniae 1705</i>	N/S	3 a 6	N/S	5 a 8	3 a 4, 12 a 15	3, 7 a 48	N/S	N/S
<i>P. vulgaris 6380</i>	N/S	12 a 14	11 a 14	12 A 13	12 a 13	12 A 14	13 a 26	3 a 40

	Concentración de 2.5µM							
	Péptido 5	Péptido 6	Péptido 7	Péptido 8	Péptido 9	Péptido 10	Péptido 11	Péptido 12
<i>E. coli nativa</i>	N/S	N/S	5 a 14	14 a 17	3 a 14	9 a 10	N/S	N/S
<i>P. aeruginosa 9027</i>	19 a 32, 34 a 48	47 a 48	N/S	N/S	8 a 9, 19 a 48	8	10 a 23, 34 a 39	10 a 20
<i>A. baumannii</i>	N/S	15, 46 a 47	6 a 8	17 a 31	17 A 18	N/S	18 a 25	N/S
<i>K. pneumoniae 1705</i>	N/S	3 A 6	N/S	5 a 20	N/S	3, 6	40 a 48	N/S
<i>P. vulgaris 6380</i>	N/S	N/S	11 a 14	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 29	3 a 22, 34 a 36

	Concentración de 1.5µM							
	Péptido 5	Péptido 6	Péptido 7	Péptido 8	Péptido 9	Péptido 10	Péptido 11	Péptido 12
<i>E. coli nativa</i>	N/S	N/S	5 a 6	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S

<i>P. aeruginosa</i> 9027	8, 20 a 48	35 a 48	N/S	N/S	8, 21 a 26, 38 a 40	7 a 8, 22 a 27	10 a 22	10 A 20
<i>A. baumannii</i>	N/S	N/S	N/S	N/S	17 a 18	18 a 23	N/S	27 a 42
<i>K. pneumoniae</i> 1705	N/S	3 A 6	N/S	6 a 13	N/S	N/S	N/S	N/S
<i>P. vulgaris</i> 6380	N/S	N/S	12 a 13	N/S	12 a 13	12 A 14	11 a 33	3, 5 a 22, 26 a 35

	Concentración de 0.62µM							
	Péptido 5	Péptido 6	Péptido 7	Péptido 8	Péptido 9	Péptido 10	Péptido 11	Péptido 12
<i>E. coli</i> nativa	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
<i>P. aeruginosa</i> 9027	22 a 24, 35 a 48	38 a 48	N/S	N/S	39 a 42	7 a 9, 18 a 48	10 a 20	10 A 21, 22 a 39
<i>A. baumannii</i>	N/S	N/S	N/S	18 a 26	16 a 18	18 A 19	N/S	N/S
<i>K. pneumoniae</i> 1705	10 a 20	3 A 6	N/S	N/S	11 a 20	N/S	N/S	N/S
<i>P. vulgaris</i> 6380	N/S	11 a 13	N/S	12	12	13	12 a 33, 47 a 48	3, 5 a 21, 29 a 39

Anexo 3: Información de las cepas del estudio

Cepas Bacterianas	Características
<i>E. coli</i> ATCC 18239	No se encuentra información
<i>E. coli</i> nativa	No se encuentra información
<i>Citrobacter freundii</i> nativa	No se encuentra información
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	Nivel de bioseguridad tipo 2. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	Aislada de Sangre humana, petequias y de la cámara anterior del ojo de mujer de 47 años en Missouri (EE. UU) en el año 1968. Nivel de bioseguridad tipo 2. Propiedades antigénicas: biotipo 1, serotipo 8. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31483	Aislada de Laguna de aguas residuales en Carolina del Sur Nivel de bioseguridad tipo 1 Aplicaciones: Degrada y Elimina los detergentes y agentes activos de superficie de aguas residuales Condiciones de crecimiento: 30°C. Atmósfera: Aeróbica.
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25608	No se encuentra información
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Aislada de Infección del oído externo. Nivel de bioseguridad tipo 2 Aplicaciones: Ensayo de conservantes antimicrobianos, pruebas de eficacia, prueba de medios, control de calidad y pruebas de esterilidad Produce surfactante ramnolípido. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> nativa	No se encuentra información
<i>Yersinia kristensenii</i> ATCC 33639	aislada de una liebre. Nivel de bioseguridad tipo 2. Aplicaciones: Control de calidad. Condiciones de crecimiento: 26°C. Atmósfera: Aeróbica.
<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium ATCC 14028	aislada de hígado de pollos de 4 semanas de edad. Nivel de bioseguridad tipo 2. Aplicaciones: Prueba de medios, Investigación entérica e Investigación emergente de enfermedades infecciosas. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica.
<i>Salmonella typhi</i>	No se encuentra información
<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 49137	Aislada de muestra clínica. Nivel de bioseguridad tipo 2. Aplicaciones: Control de calidad y cepa de control de calidad para productos MicroScan. Condiciones de crecimiento: 30°C
<i>Acinetobacter baumannii</i>	No se encuentra información
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA-1706	Nivel de bioseguridad tipo 2 Aplicaciones: Designación de control negativo Test de Hodge (HMT) modificado. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA-1705	Aislada de Varón de 42 años en orina en el año 2007 Nivel de bioseguridad tipo 2 Aplicaciones: Designación de control positivo Test de Hodge (MHT) modificado, investigación respiratoria y pruebas multidrogas. Condiciones de crecimiento: 37°C. Atmósfera: Aeróbica.

Información tomada de la página web de la organización ATTC (American type culture collection), <https://www.atcc.org/>