



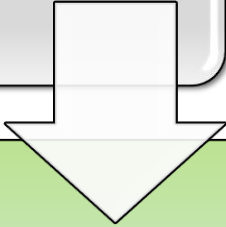
---

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

Wendy Martínez  
Edith Acosta

Asesora: Liliana Muñoz

***S. aureus*, *S. epidermidis*,  
*E. coli*, *P. aeruginosa*,  
adhesión biomateriales,  
>60% son causadas por biopelículas**

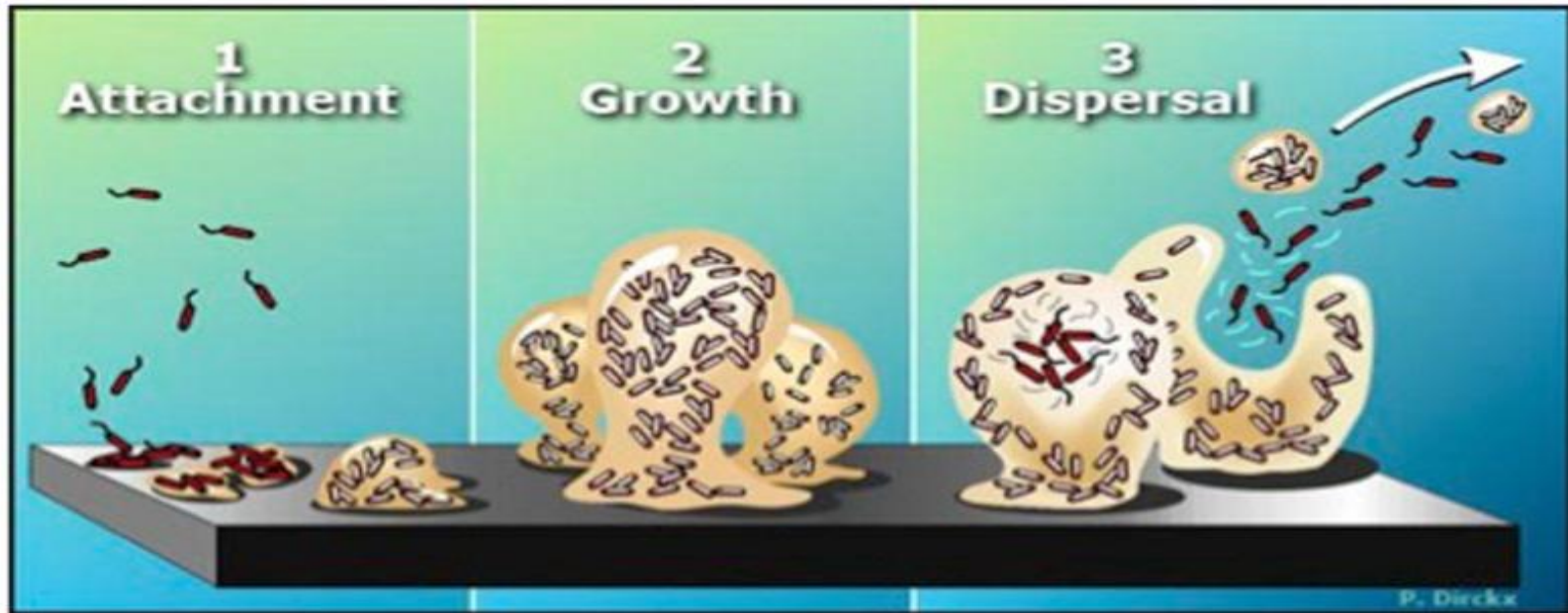


**Resistencia a tratamientos convencionales  
Clasificación de la OMS**



**Matriz de exopolisacáridos, agua 97%,  
microcolonias bacterianas, proteínas , DNA y  
productos de lisis celular**

# ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA



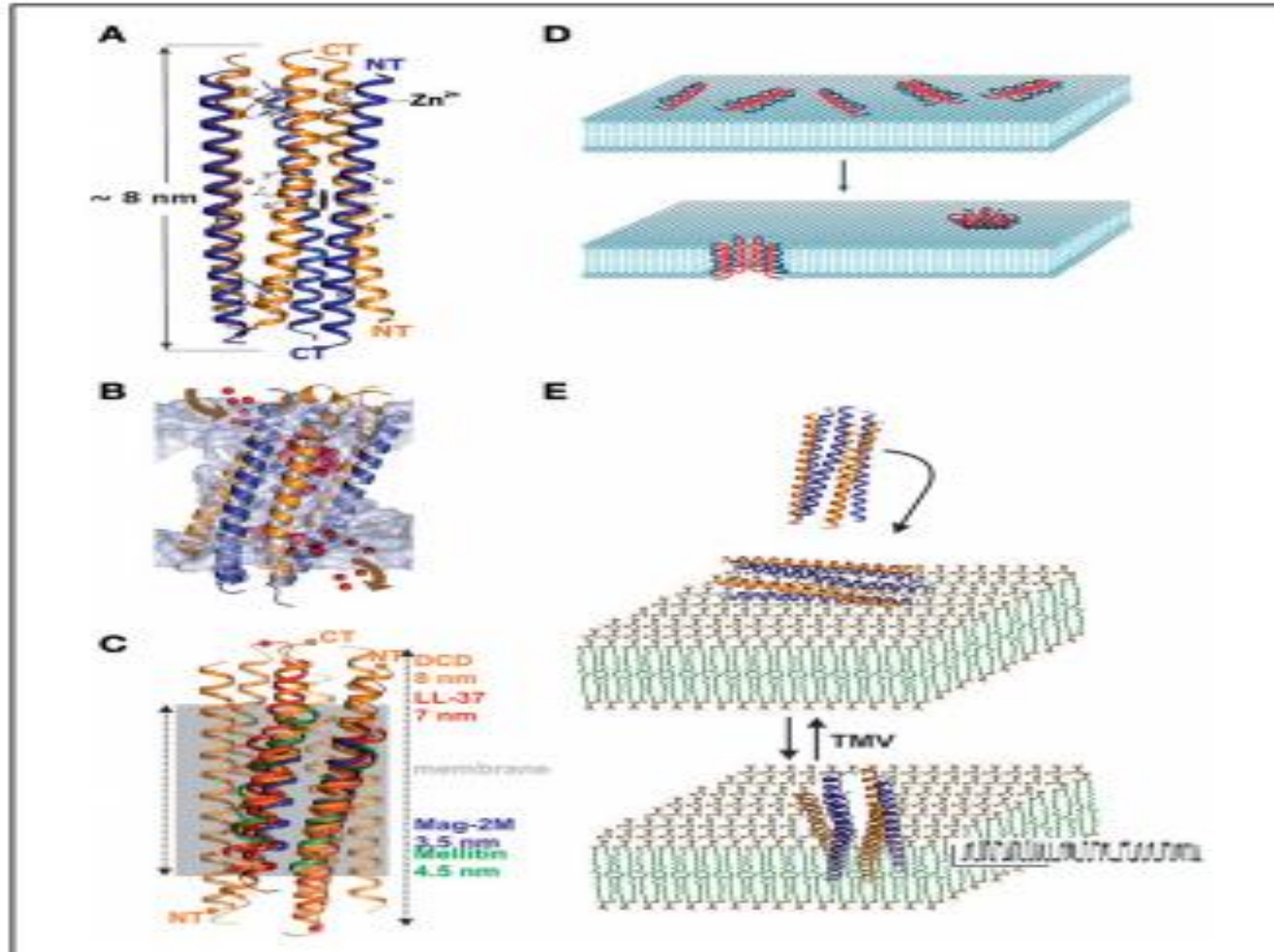
**Staphylococcus:**  
MSCRAMMS :clf A, Fbe, Atl

**Gram negativas :** Fimbrias I-IV  
Hidrofobinas o adhesinas tipo lectina

**Staphylococcus:** Exopolisacáridos, PIA, co-agregación o co-adhesión Proteína Aap, Embp (proteína unión a la matriz extracelular), Bap/Bhp  
**E. coli:** Ag 43, PGA  
**P. aeruginosa:** Alginato, Psl, eDNA

Erosión, migración  
**Staphylococcus:** sistema agr  
**E. coli :** Mecanismos reguladores: RpoS, CRP, CreC y CsrA.  
**P. aeruginosa:** Sistema Rhl

# PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)



# OBJETIVO GENERAL

---

**Analizar la actividad inhibitoria de la biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por parte de los péptidos AC-LL 37-1 y D-LL 37-1.**

# OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

**Comparar cuál es la eficiencia de cada uno de los péptidos antimicrobianos sobre las cepas de aislamiento clínico y sobre las cepas ATCC a través de la observación de las curvas de crecimiento**

**Evaluar el posible potencial inhibitorio los péptidos AC-LL 37-1 y D-LL 37-1 en cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* formadoras de biopelícula por espectrofotometría.**

**Determinar cuál es el efecto de los péptidos antimicrobianos AC-LL 37-1 y D-LL 37-1 sobre cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* formadoras de biopelícula mediante espectrofotometría.**

# Metodología

Se analizaron 40 aislamientos clínicos y cepas ATCC 27853 *P. aeruginosa*, ATCC 35218 *E.coli*, USA 300 *S. aureus*, ATCC 35984 *S.epidermidis* y ATCC 12228 *S.epidermidis*

## Curvas de Crecimiento

Escala Mcfarland 0,5

suspensión de UFC en 5 ml de caldo BHI

confirmada por espectrofotómetro a 620 nm

Bioscrenn C  
Lecturas 600 nm cada hora por 48 h a 37 °C agitación constante

## % Tasa de Inhibición

Cada ensayo se realizó por triplicado

Fase log tardía

## Microplaca

2 uL suspensión bacteriana escala 0,5 Mcfarland, 198 uL caldo LB suplementado con glucosa al 1% Péptido concentración final : 5 uM

Incubación 6-12h  
Fijación

Revelado con CV  
lectura 570 y 492nm

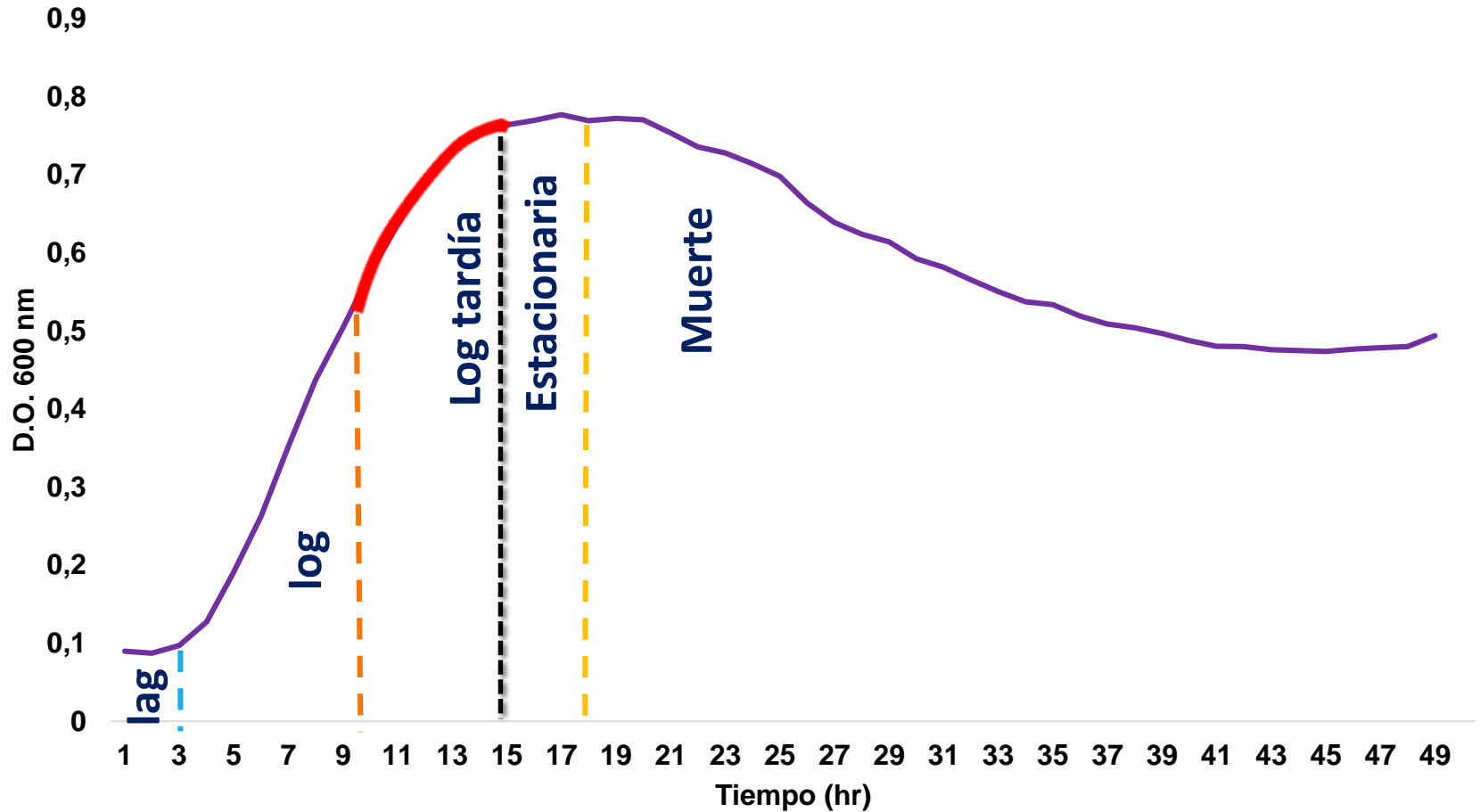
$D.O \text{ fase log tardia cepa} - D.O \text{ fase log tardia cepa peptido} * 100$   
 $D.O \text{ fase log tardia cepa}$



# RESULTADOS

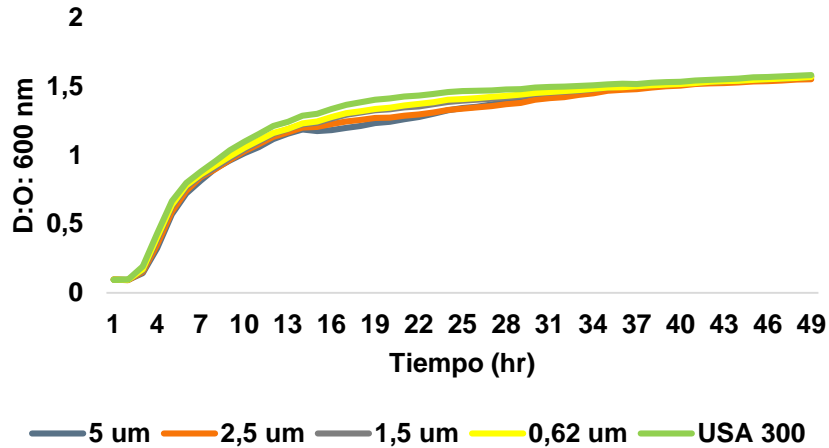


# Curvas de crecimiento

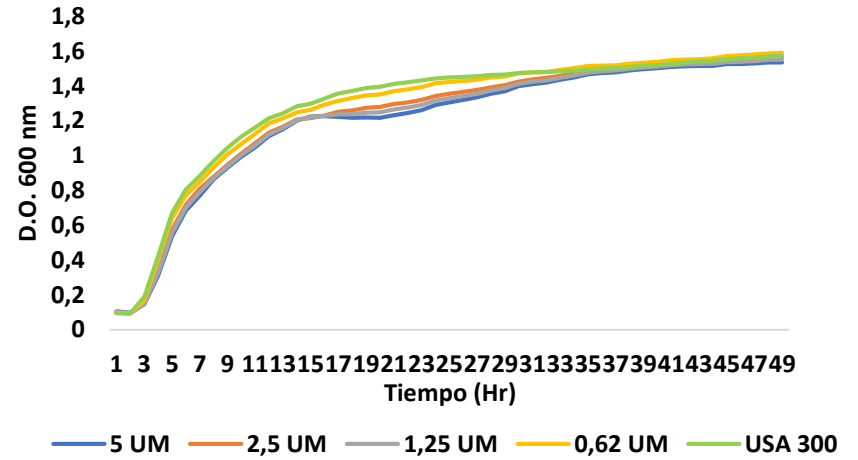


# Gram positivas

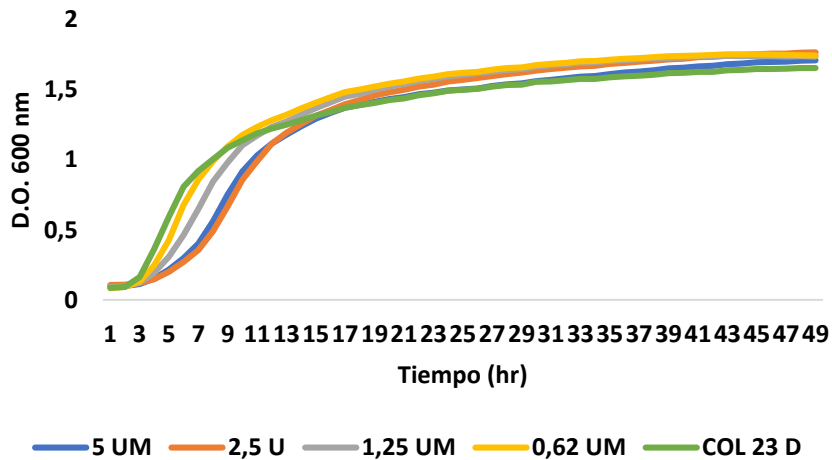
ATCC USA 300 *S. aureus* D-LL37-1



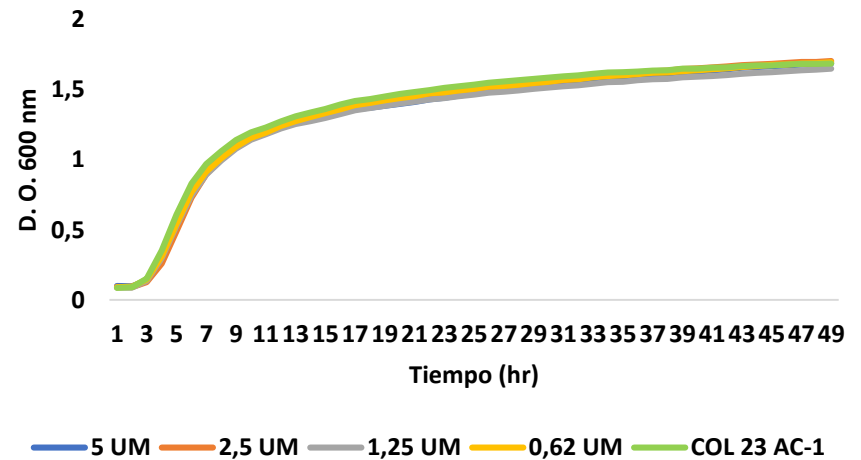
ATCC USA 300 *S. aureus* AC-LL37-1



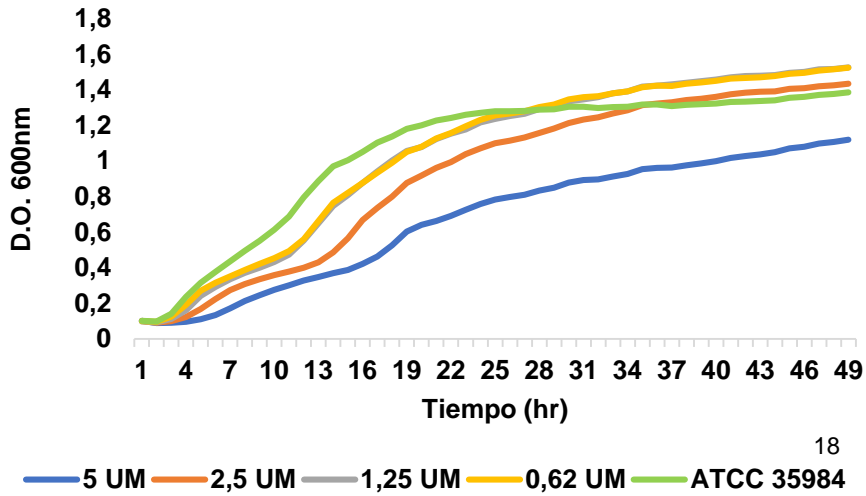
Cepa *S. aureus* Col 23 D-LL37-1



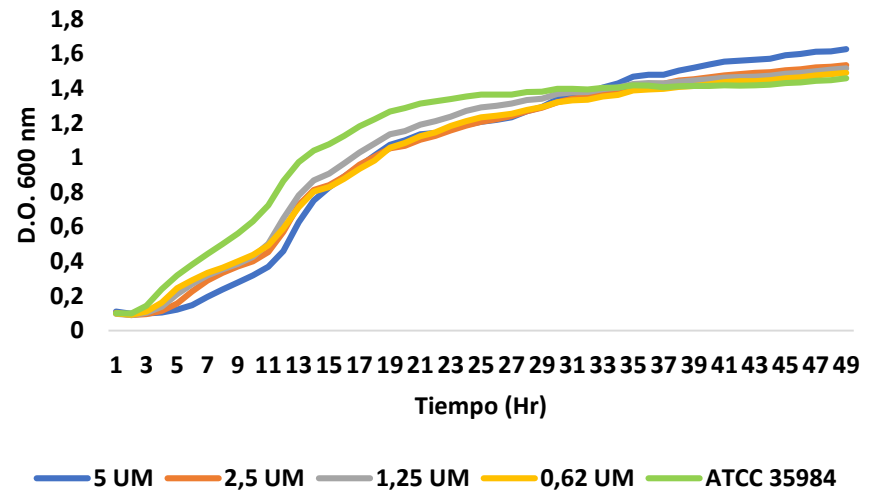
Cepa *S. aureus* Col 23 AC-LL37-1



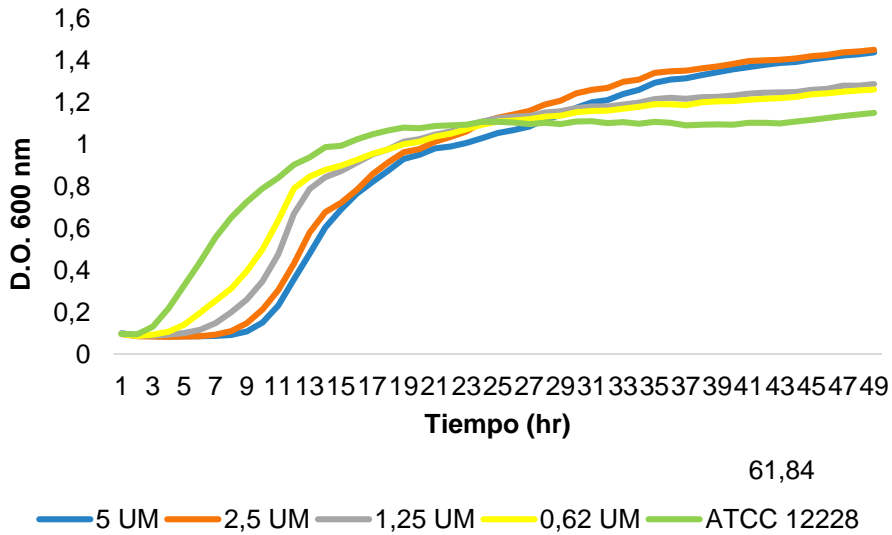
**ATCC 35984 *S. epidermidis* D-LL37-1**



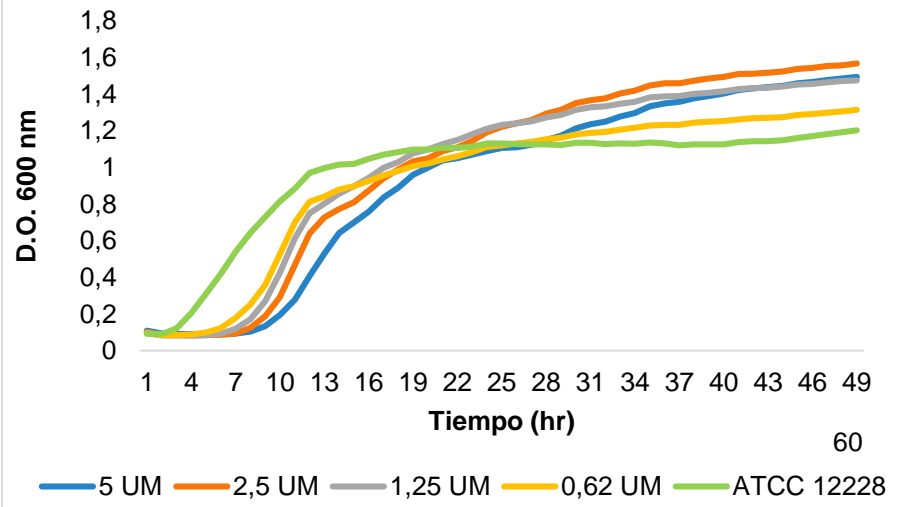
**ATCC 35984 *S. epidermidis* AC-LL37-1**



**ATCC 12228 *S. epidermidis* D-LL37-1**

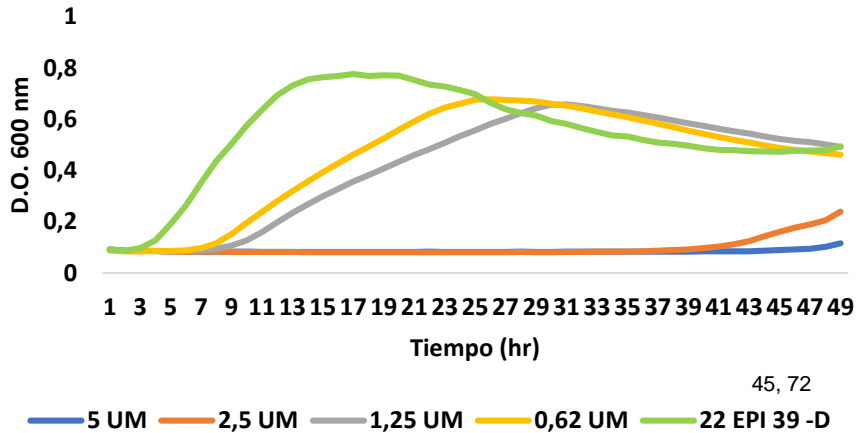


**ATCC 12228 *S. epidermidis* AC-LL37-1**

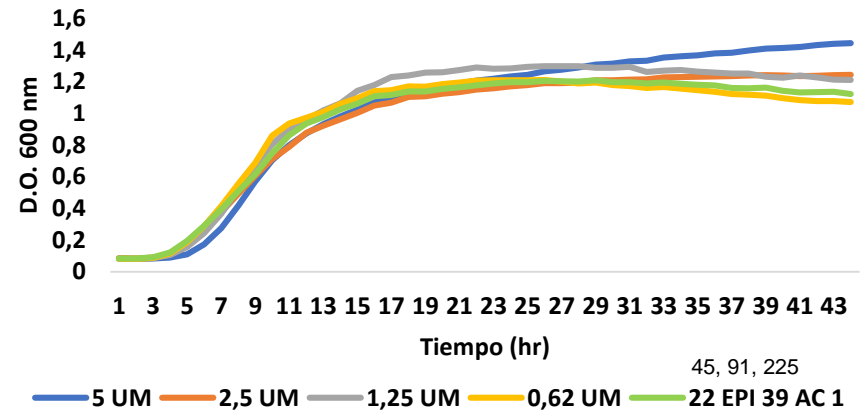


# Tendencia de inhibición

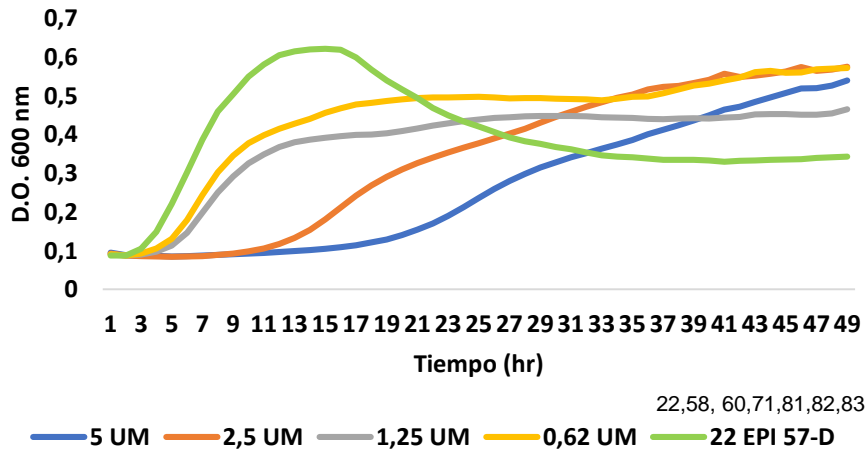
*S. epidermidis* 39 D-LL37-1



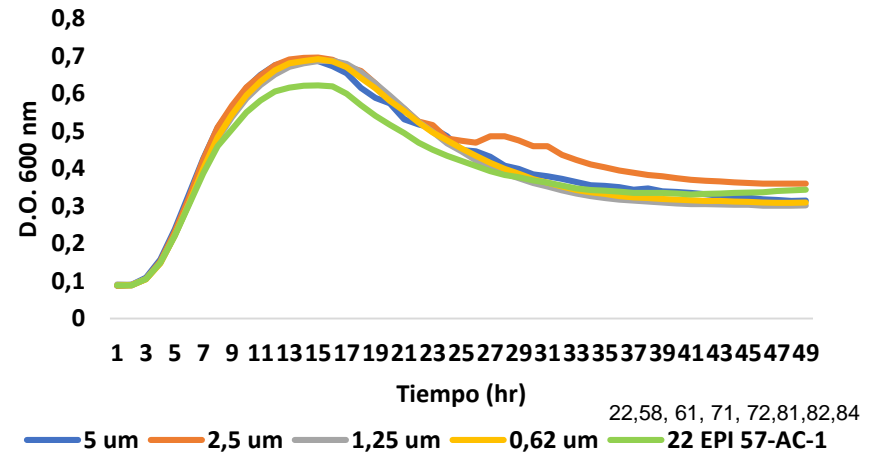
*S. epidermidis* 39 AC-LL37-1



*S. epidermidis* 57 D-LL37-1

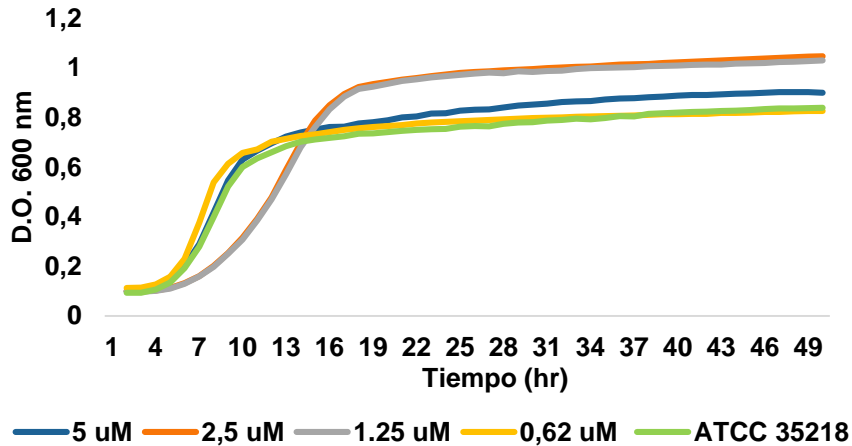


*S. epidermidis* 57 AC-LL37-1

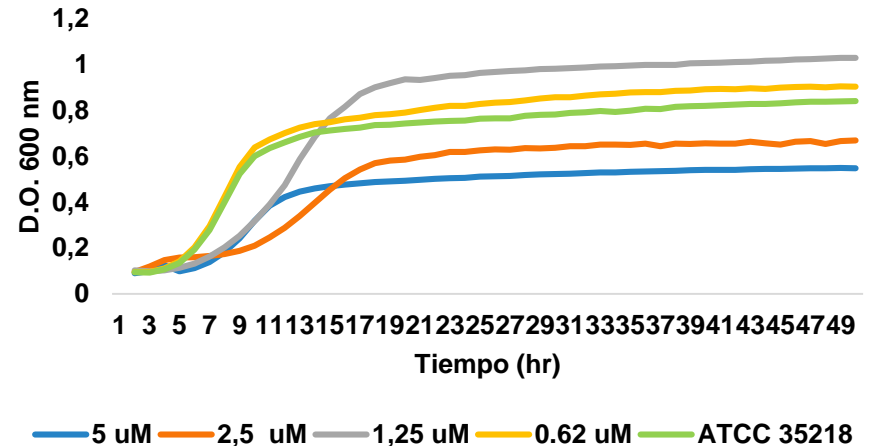


# Gram negativas

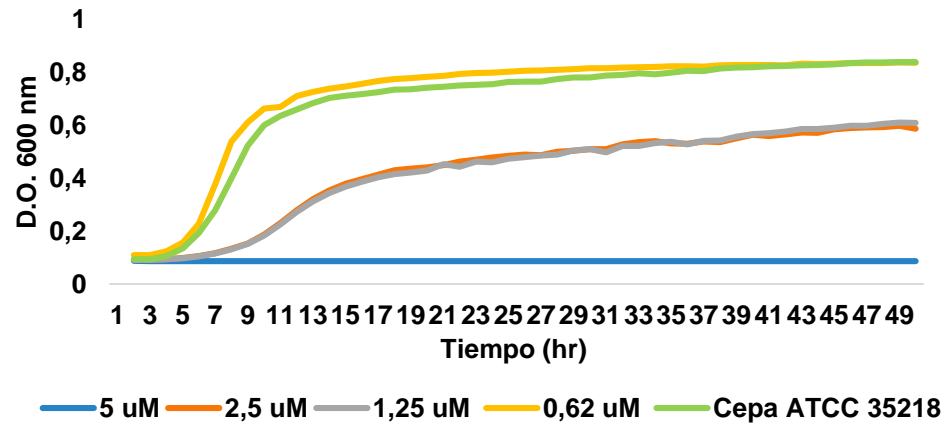
ATCC 35218 *E. coli* AC-LL37-1



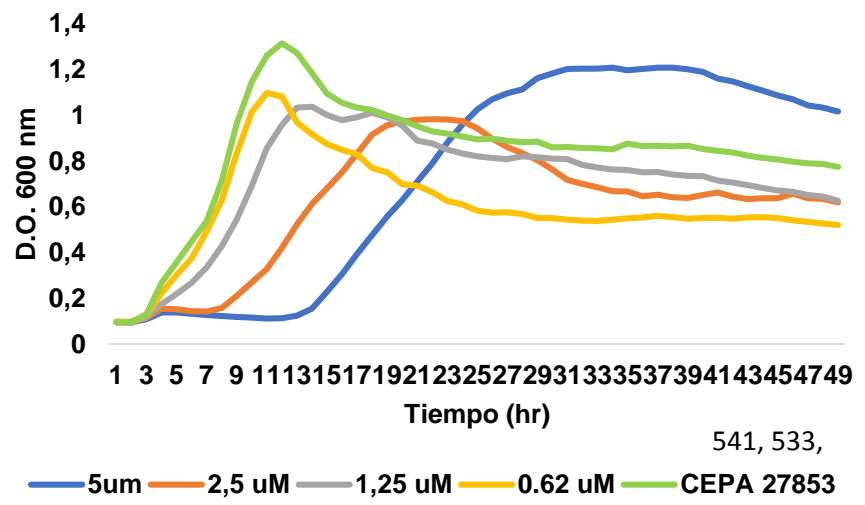
ATCC 35218 *E. coli* D-LL37-1



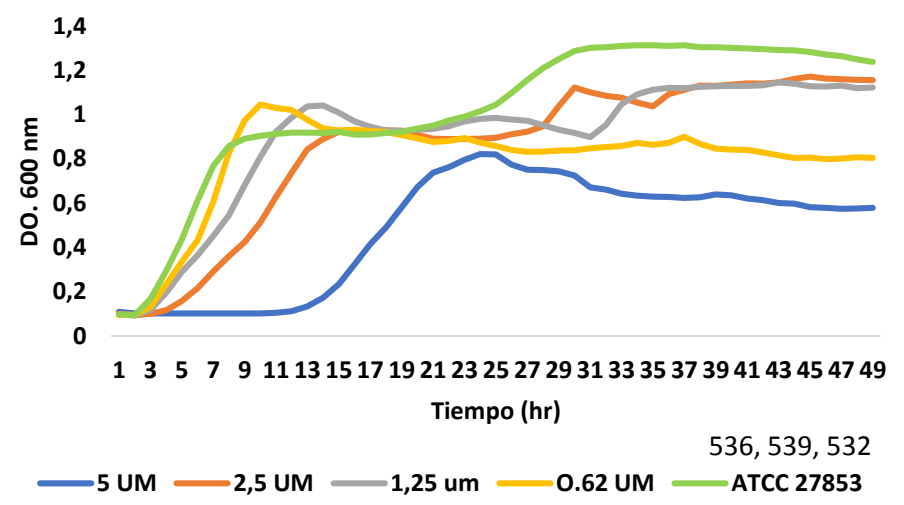
*E. coli* ATCC 35218 LL-37



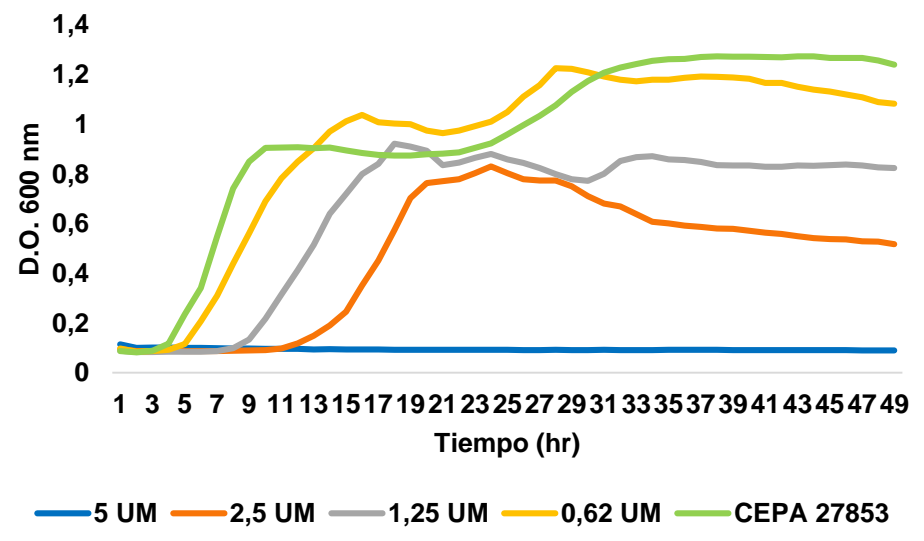
***P. aeruginosa* ATCC 27853 D-LL37-1**



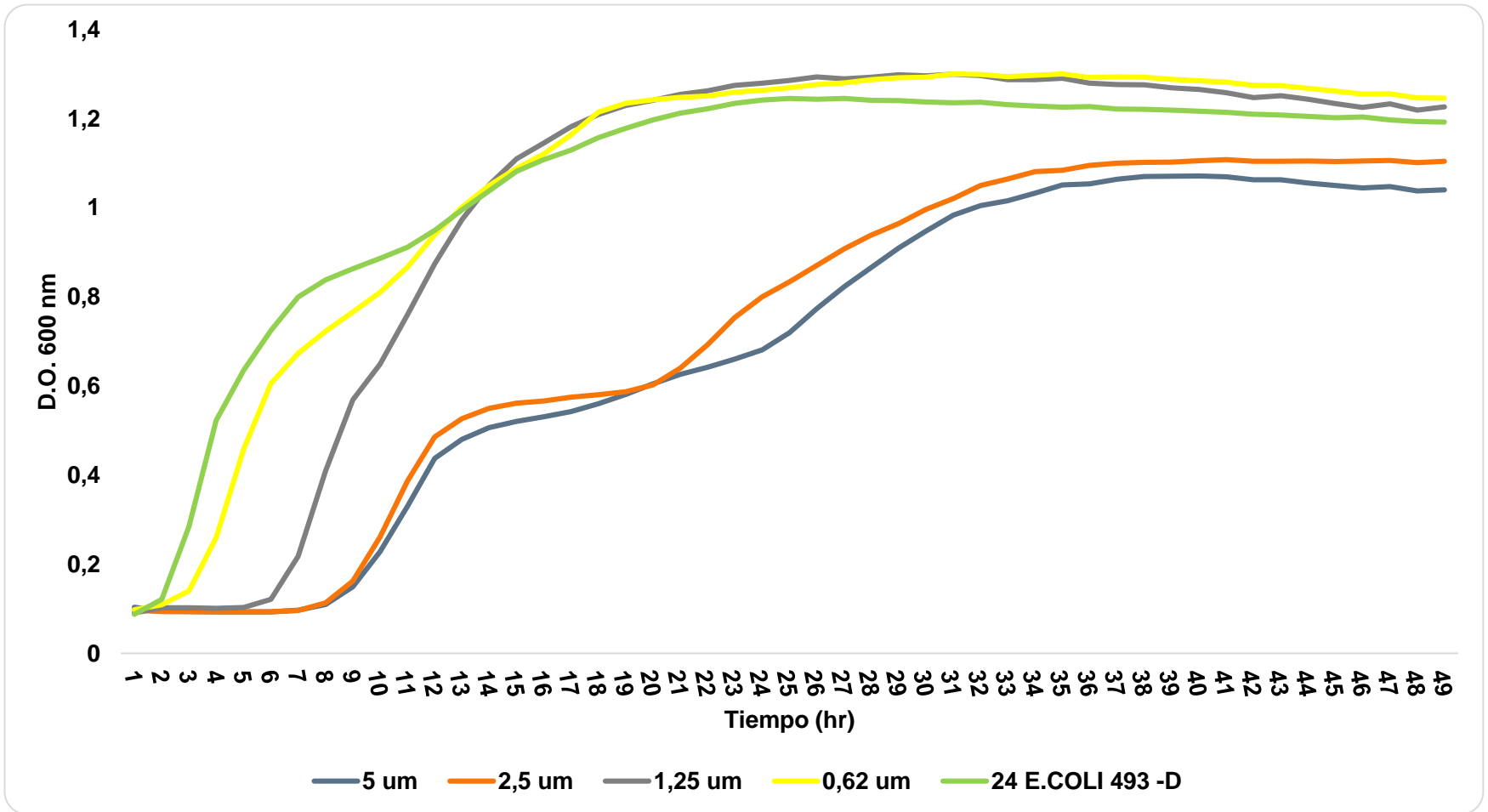
***P. aeruginosa* ATCC 27853 AC-LL37-1**



***P. aeruginosa* ATCC 27853 LL-37**

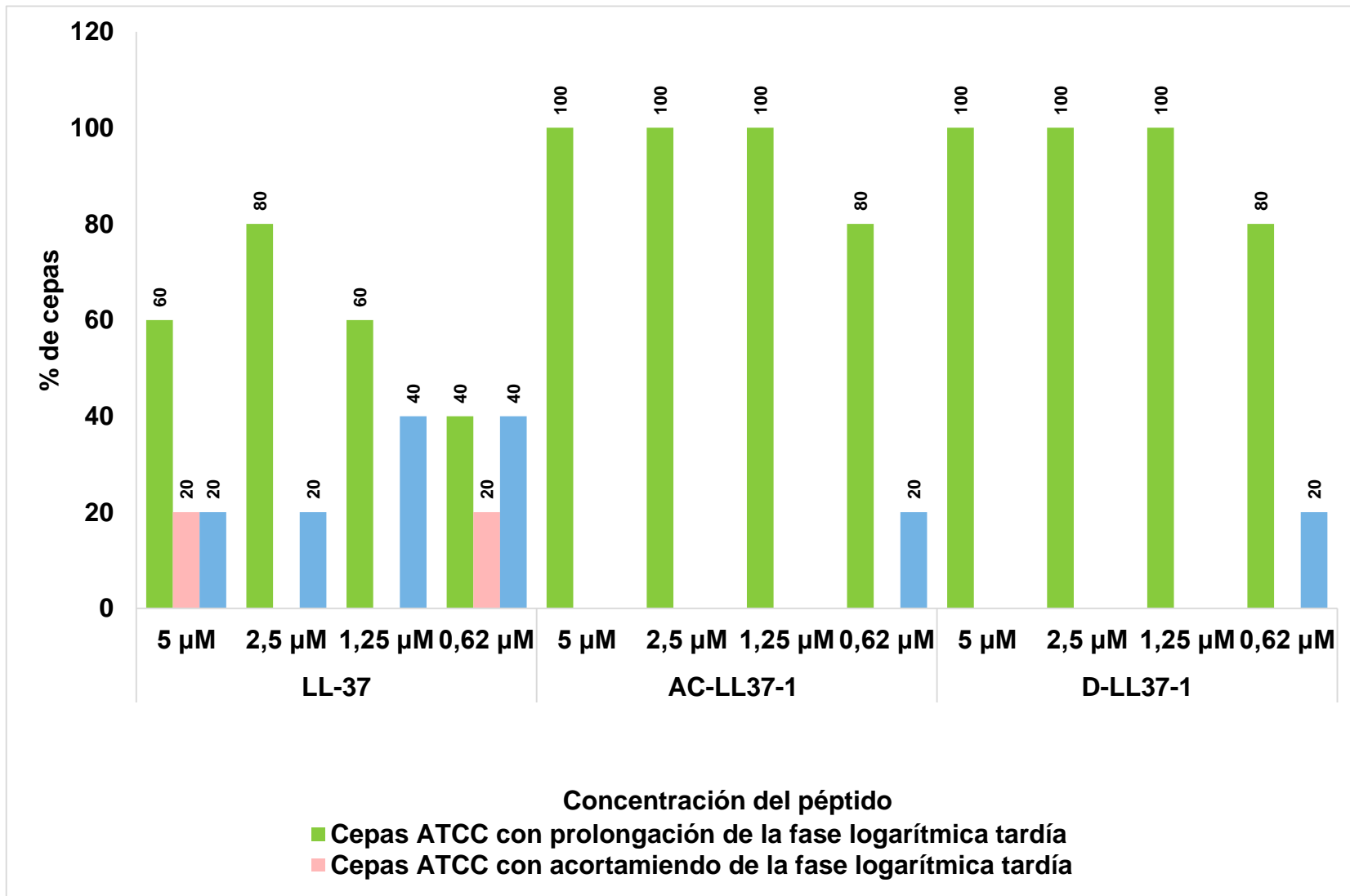


# FENÓMENO DIAÚXICO



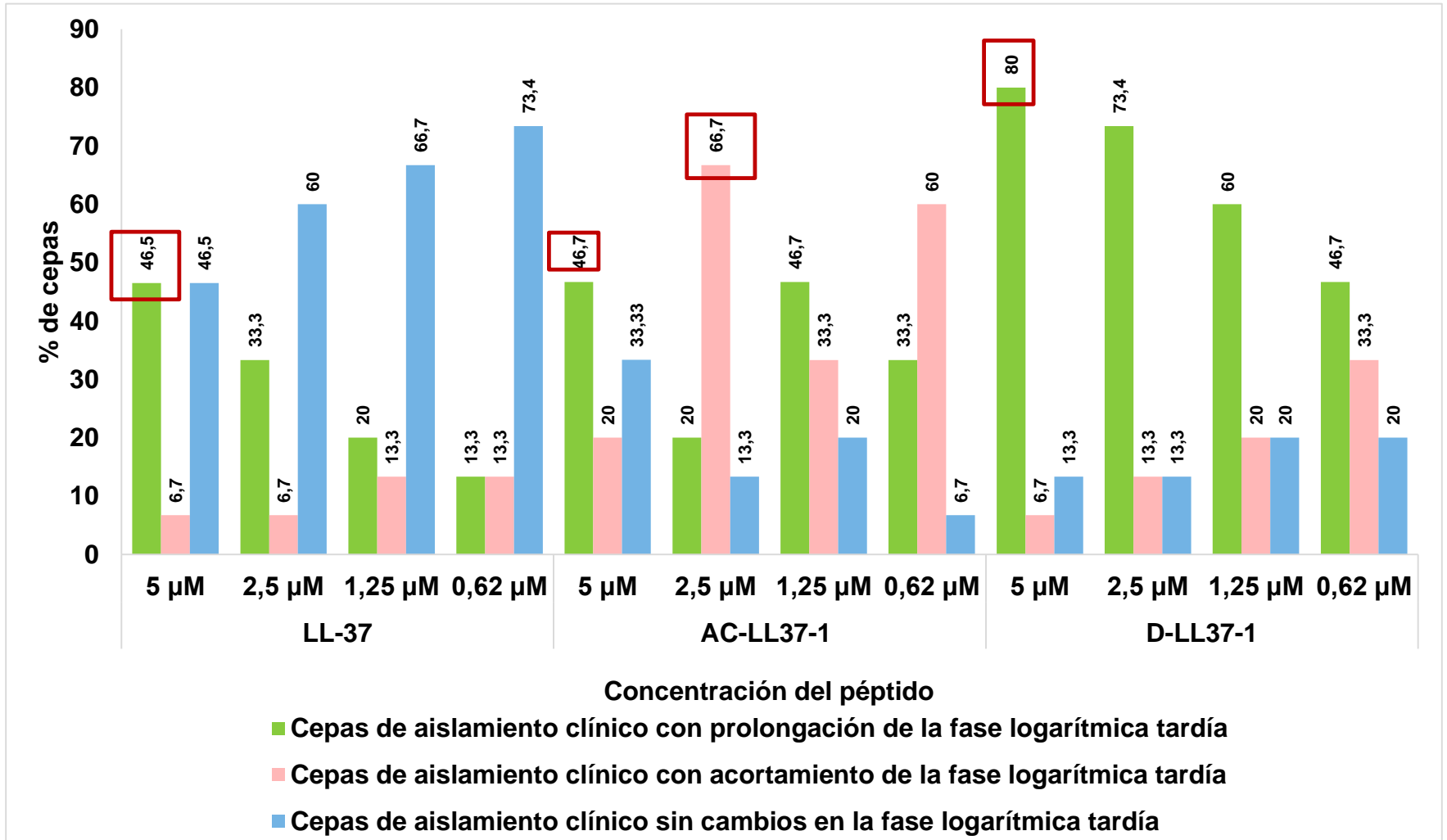
Col 208, ATCC 12228, 22-18, 24-225, 24-492, 24-493, 24-536, 24-539

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

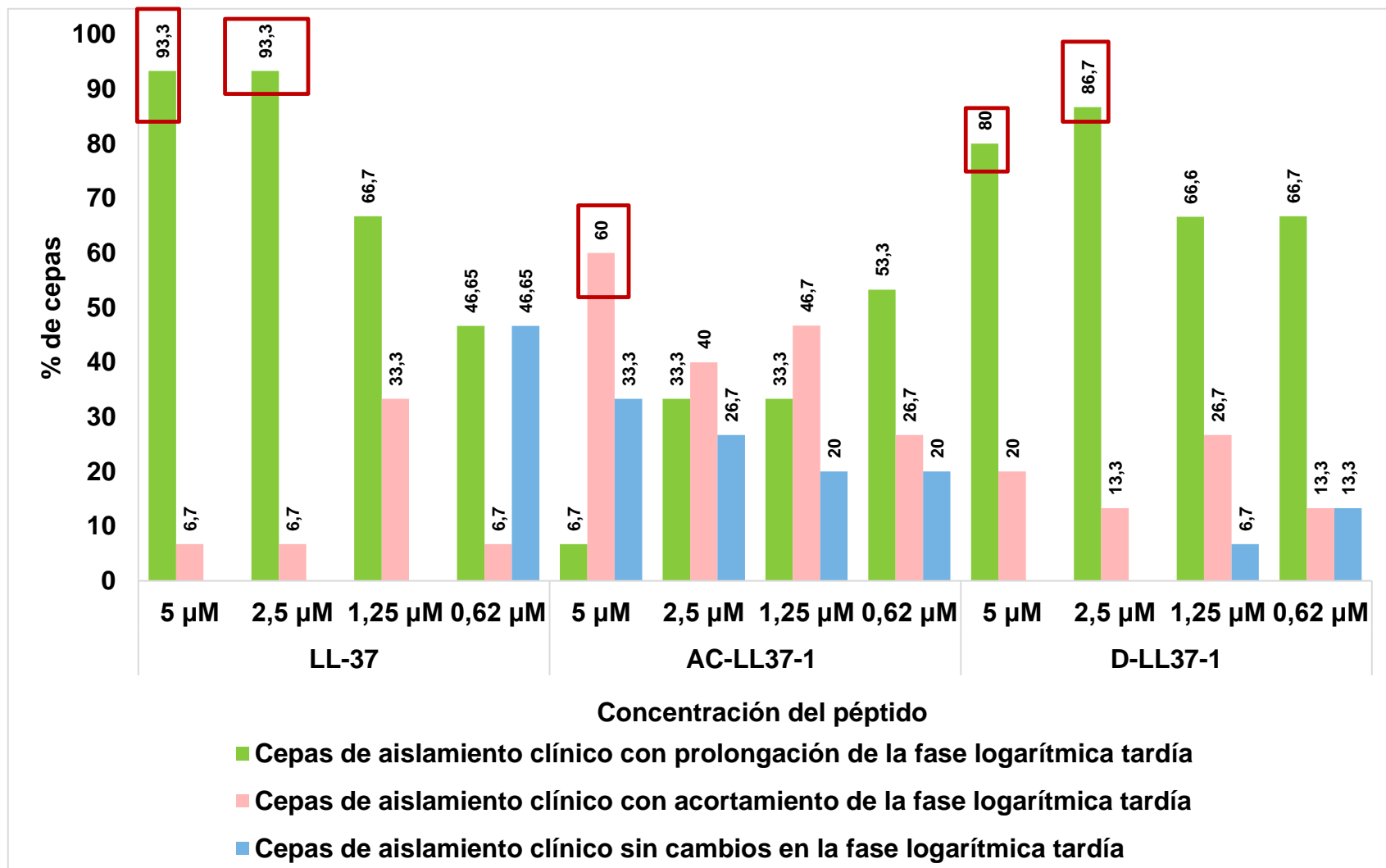




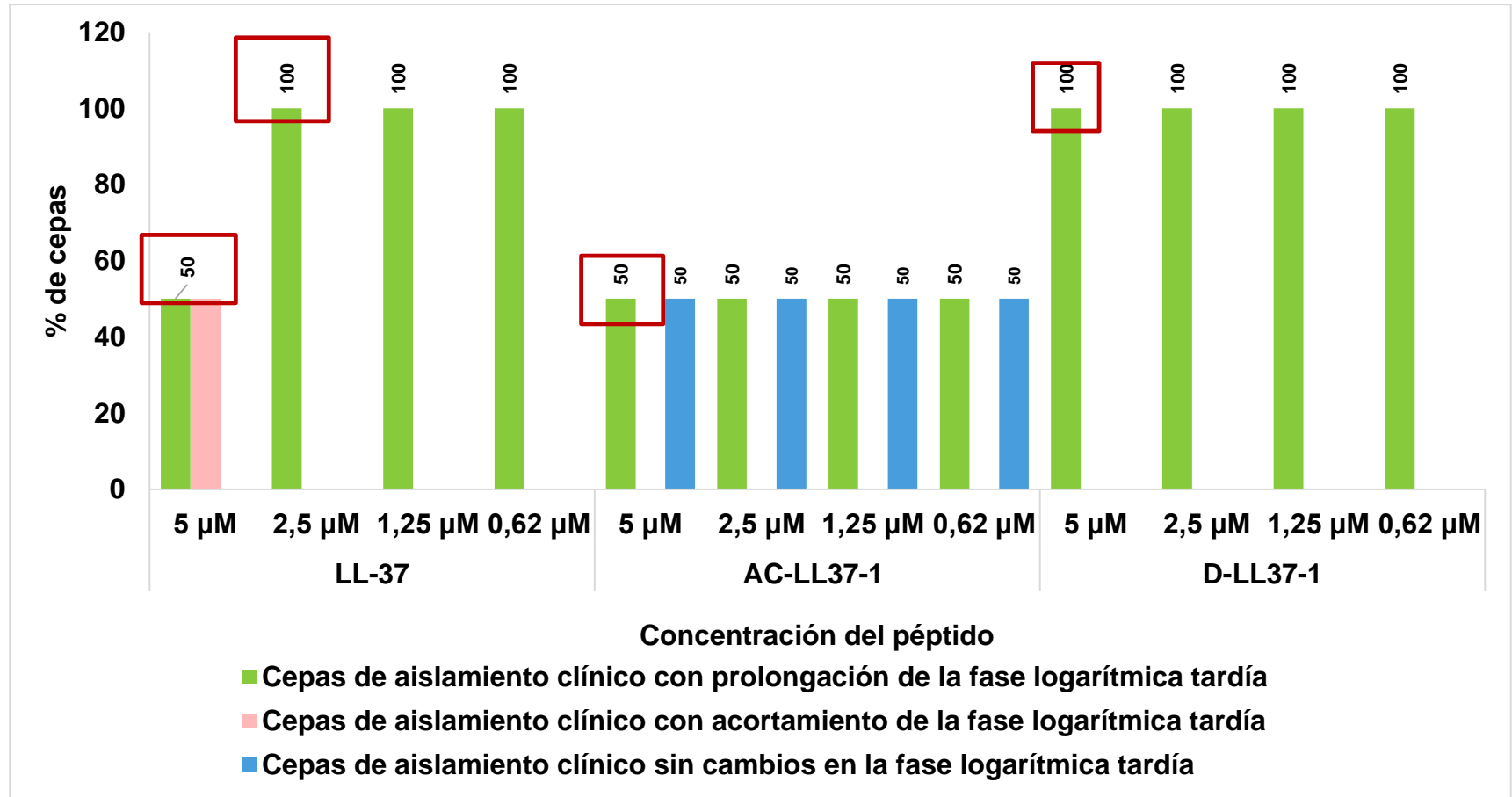
## Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamiento clínico en *S. aureus*



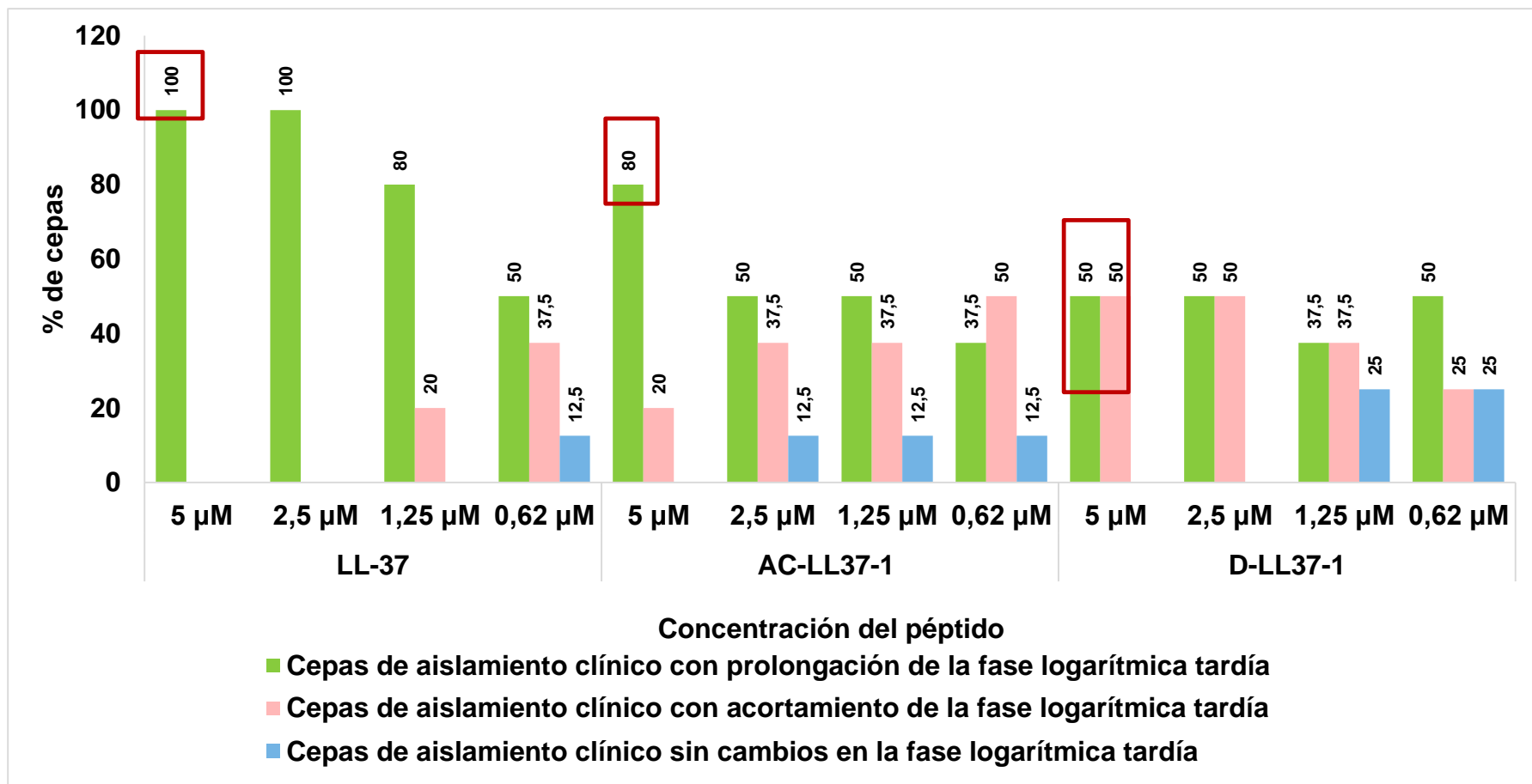
# Comportamiento de la fase logarítmica tardía de cepas de aislamientos clínicos de *S. epidermidis*



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



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



Microorganismo	LL-37	AC-LL 37-1	D-LL37-1	Concentración
<i>S .aureus</i>	Prolongación	Acortamiento	Prolongación	<b>5 uM</b>
<i>S. epidermidis</i>	Prolongación	Acortamiento	Prolongación	<b>5 uM</b>
<i>E. coli</i>	Prolongación y acortamiento	prolongación y acortamiento	Prolongación	<b>5 uM</b>
<i>P. aeruginosa</i>	Prolongación	Prolongación	Prolongación y acortamiento	<b>5 uM</b>

Péptidos LL-37 Y D-LL37: Prolongación 46-96% de la cepas AC-LL37 Efecto contrario

# Tasas de inhibición

Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL3-17 Y D-LI37-1 a una concentración 5 uM en cepas de *S. aureus*

Inhibición de la masa celular con concentración de 5 uM en cepas de <i>S. aureus</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	ACLL-37	DLL-37
20 – 27.6%	13.3 %	0%	0%
10- 17.8%	40%	0%	6.7%
Menor al 10%	6.7%	53.3%	60%
Cepas que no presentan inhibición	40%	46,7%	33.3%

**Deficiencias en la capacidad del isómero peptídico para interactuar eficazmente con la membrana**



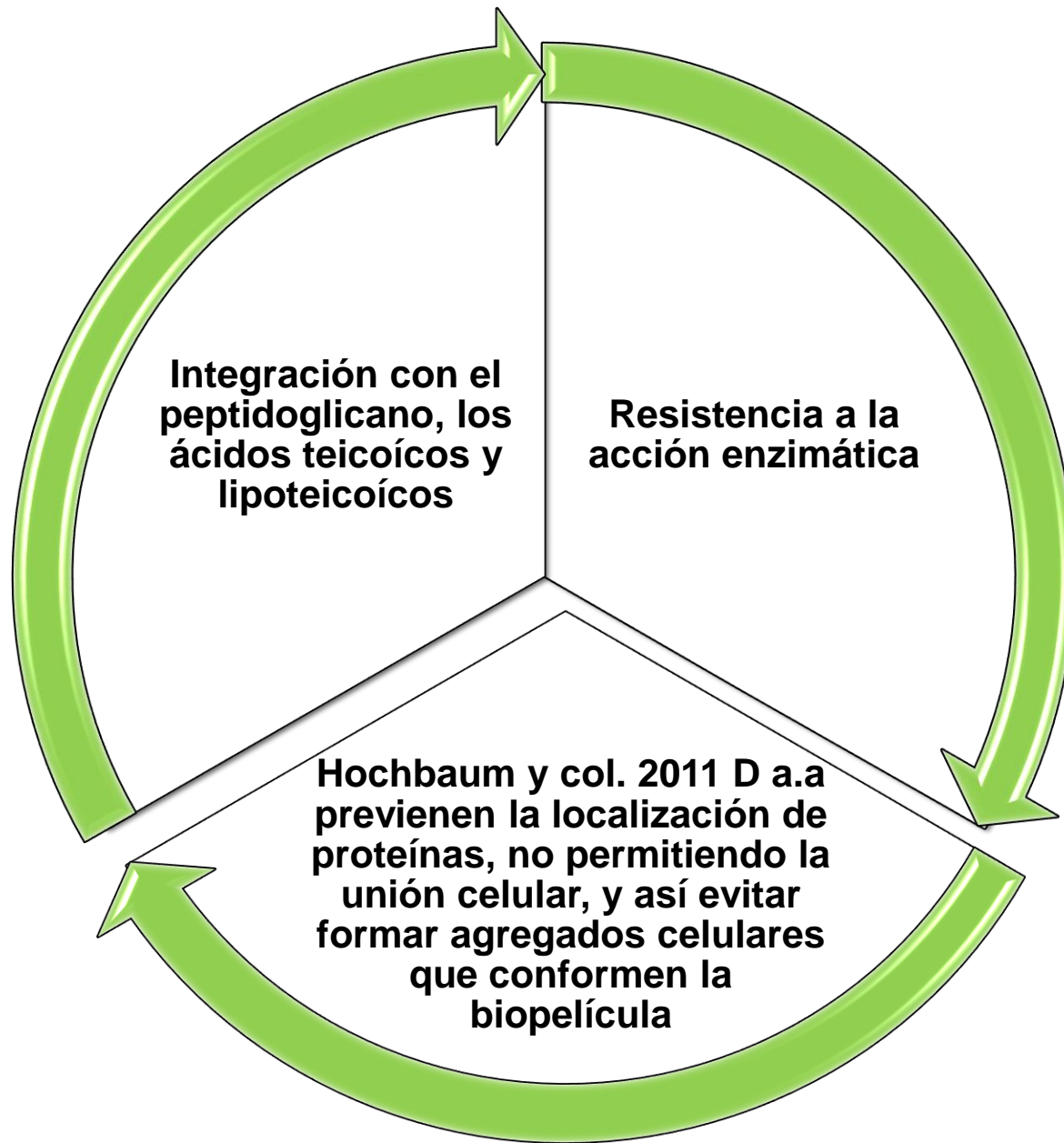
**Nell (2006) confirma que la actividad antibiopelícula o inhibitoria reside en su dominio C-terminal (51, 66), a la par Joo HS et al (2016), y Li M et al (2007) confirman que la aureolisina y V8 inactivan proteolíticamente el péptido.**

**Susceptibilidad a proteinasas denominadas metaloproteasas**

## Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración 5 $\mu$ M en cepas de *S. epidermidis*

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



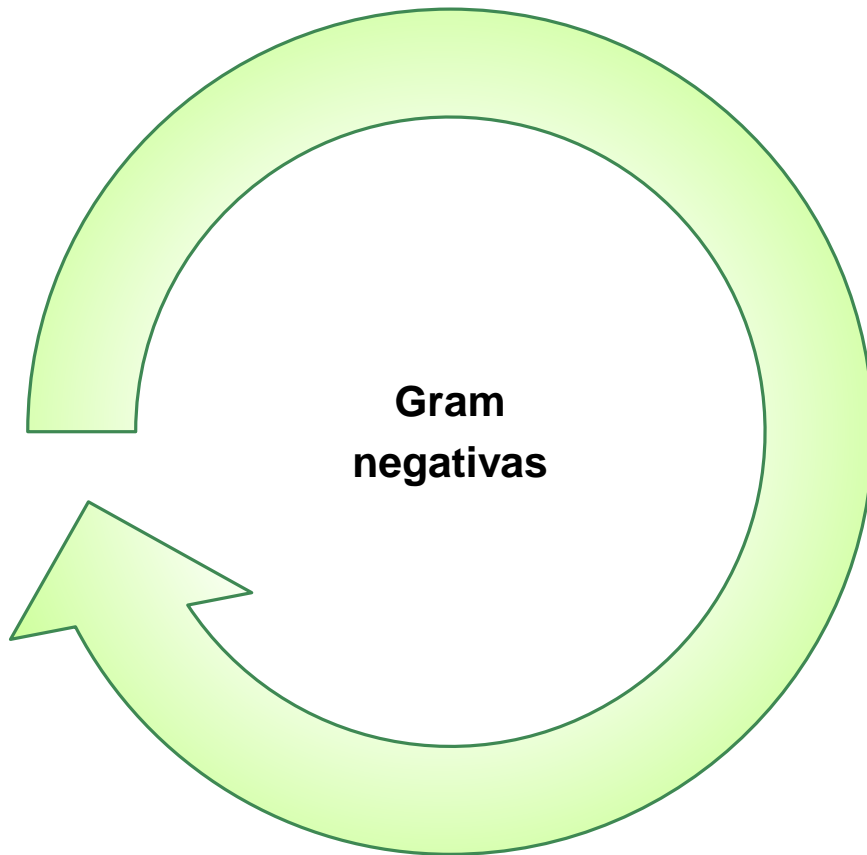


## Relación de la acción del péptido LL-37, AC-LL37-1 Y D-LL37-1 a una concentración de 5 $\mu$ M en cepas de *E. coli*

Inhibición de la masa celular con concentración de 5 $\mu$ M en cepas de aislamientos clínicos de <i>E.coli</i> con los diferentes péptidos			
Rango de inhibición	LL-37	AC-LL37-1	D-LL37-1
64.3- 100%	100%	0%	0%
20-41.2%	0%	0%	50%
0- 10%	0%	0%	50%
Cepas que no presentan inhibición	0%	100%	0%

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

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



- **Elastasa**
- **Overhage et al (2008)** inhibir formación de biopelícula
- **Duplainter (2013)** en el cual demostró in vivo que la modificación del péptido LL-37 a su configuración D
- **Dean et al (2011)** la catelicidina humana 'LL-37 inhibe

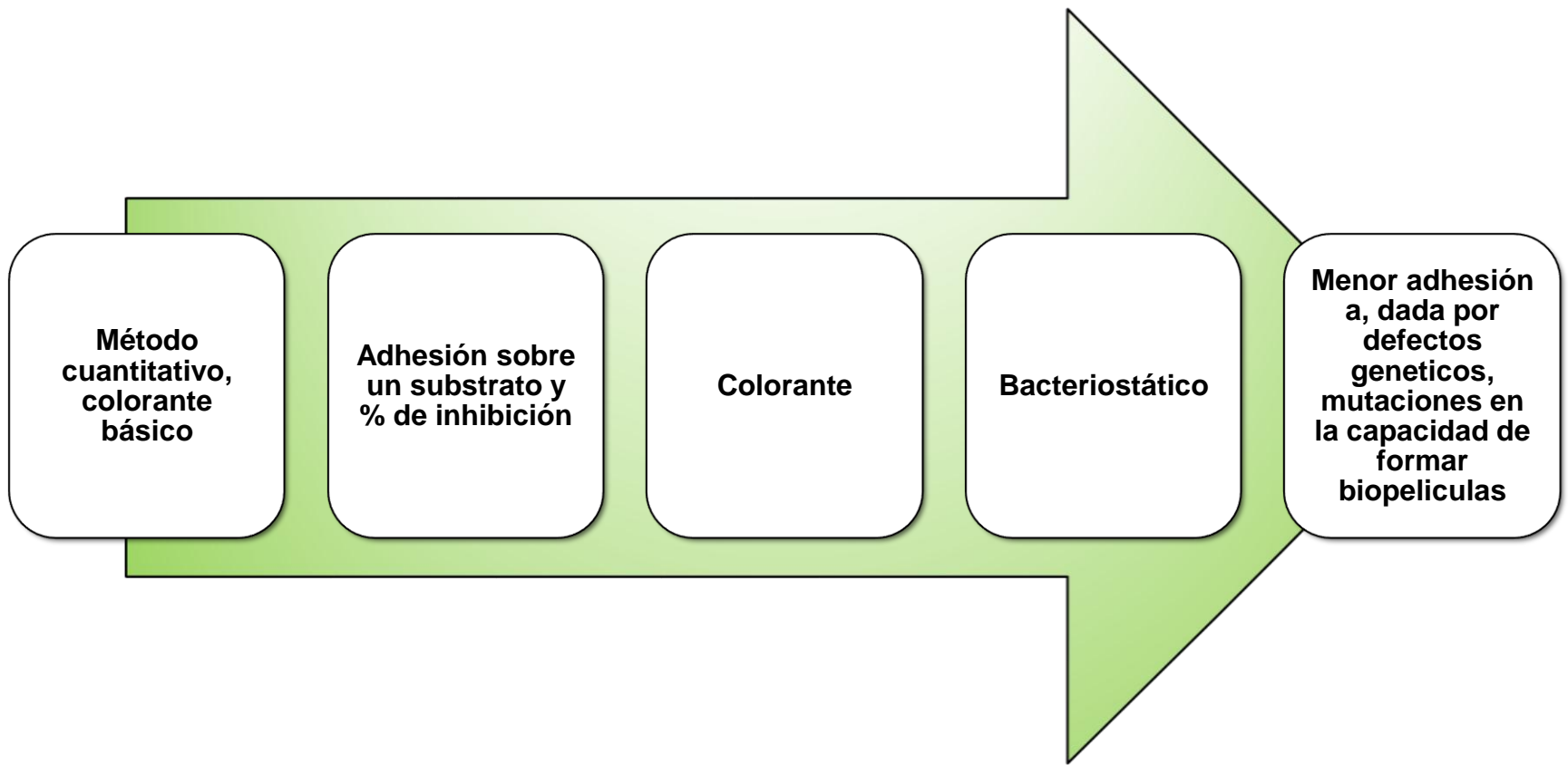
# MICROPLACA

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

Rango de inhibición	Porcentaje global de muestra a las 12 horas	Porcentaje a las 6 horas
Mayor al 50%	30%	0 %
Entre 20-49%	30%	20%
Menor al 20%	10%	40%
No inhibición del péptido	30%	40%

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

Rango de inhibición en 12 h	Péptido LL 37	Péptido AC LL37	Péptido D LL 37
50-75%	9,1%	18,2%	9,1%
20-45,5%	18,2%	27,2%	18,2%
0-18%	0 %	18,2%	54,5%
No inhibición	72,7%	26,6%	18,2%



**Nell (2006) acetilación péptido estabilidad**

**Péptidos destacados: LL-37 y D-LL37 dependiendo de M.O**

# CONCLUSIONES

---

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

---

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

---

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

# Recomendaciones

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

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

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

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

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

# REFERENCIAS

---

Mergaert P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. Nat Prod Rep [Internet]. 2018;35:336-56. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7NP00056A>

Heins A-L, Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. Bioprocess Biosyst Eng. 2018;0(0):0.

Wang L, Keatch R, Zhao Q, Wright JA, Bryant CE, Redmann AL, et al. Influence of type-I fimbriae and fluid shear stress on bacterial behavior and multicellular architecture of early *Escherichia coli* biofilms at single-cell resolution. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2018;(January):AEM.02343-17. Disponible en: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02343-17>

Madar D, Dekel E, Bren A, Zimmer A, Porat Z, Alon U. Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. BMC Syst Biol. 2013;7.

Cádiz jac. Modelo continuo de flujos metabólicos y regulación génica: aplicaciones [internet]. Vol. 1, universidad de chile facultad de ciencias físicas y matemáticas departamento de ingeniería química y biotecnología m. 2014. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129867/cf-canales\\_jc.pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129867/cf-canales_jc.pdf?sequence=1)

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Properties , regulation and roles in human disease *Staphylococcus aureus* biofilms. 2011;(October):445-59.



*Gracias*