

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO**

Liliana Estefanía Fandiño Devia

**Tesis de grado para optar al título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis**

**Asesora
Marcela Manrique Moreno, PhD
Profesora Asociada
Instituto de Química
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MEDELLÍN
2019**

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.**

Liliana Estefanía Fandiño Devia

Tesis de grado para optar al título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis

Marcela Manrique Moreno, PhD
Asesora

Javier Silva Agredo, PhD
Miembro del Comité Tutorial

Edwin Bairon Patiño González, PhD
Co-asesor, Miembro del Comité Tutorial

Andrés Villa Restrepo, PhD
Miembro del Comité tutorial

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MEDELLÍN
2019**

CONTENIDO

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Resistencia Antimicrobiana	12
2.2 Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana	14
2.2.1 <i>Inactivación Enzimática del Antibiótico</i>	15
2.2.2 <i>Alteración del Sitio Blanco del Antibiótico</i>	15
2.2.3 <i>Alteración en las Barreras de Permeabilidad</i>	16
2.3 Resistencia Antimicrobiana En Bacterias Gram Negativas	16
2.3.1 <i>Resistencia Mediada por β-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)</i>	18
2.3.2 <i>Clasificación de las β-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)</i>	19
2.4 <i>Escherichia coli</i> Productora de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	21
2.5 Péptidos Antimicrobianos	23
2.5.1 <i>Propiedades Fisicoquímicas de los PAMs</i>	25
2.5.2 <i>Mecanismo de Acción de los PAMs</i>	28
2.5.3 <i>Resistencia Asociada a los PAMs</i>	31
2.5.4 <i>Perspectivas del Uso Terapéutico de Péptidos Antimicrobianos</i>	32
2.5.5 <i>Uso de modelos lipídicos en el estudio de interacciones péptido-lípido</i>	34
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GENERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	37
4.2 Péptidos Sintéticos	37
4.3 Determinación de la Actividad Antimicrobiana	39
4.3.1 <i>Análisis Estadístico</i>	40
4.4 Análisis de Citotoxicidad	40
4.5 Análisis por Espectroscopia Infrarroja	41
4.6 Permeabilidad de la Membrana Microbiana	42
5. RESULTADOS	43

5.1 Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	43
5.2 Análisis de Citotoxicidad.....	45
5.3 Análisis por Espectroscopia Infrarroja.....	46
5.4 Permeabilidad de la Membrana Microbiana	48
6. DISCUSIÓN	50
7. CONCLUSIONES.....	60
AGRADECIMIENTOS.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de Resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> BLEE.....	37
Tabla 2. Características de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$	38
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en cepas de <i>E coli</i> productoras de BLEE	43
Tabla 4. Actividad hemolítica del péptido $\Delta M3$ en eritrocitos humanos.....	45
Tabla 5. Actividad hemolítica del péptido $\Delta M4$ en eritrocitos humanos. ¡Error! Marcador no definido.	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativas.	14
Figura 2. Estructura de los péptidos antimicrobianos.	27
Figura 3. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	30
Figura 4. Diagrama de ruedas de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$	37
Figura 5. Actividad antimicrobiana del péptido $\Delta M3$ y $\Delta M3$ en las cepas de <i>E. coli</i> BLEE HD7, HD8, HD11 y BK43028.	43
Figura 6. . Cambio de transición de fase de los lípidos más representativo de <i>E. coli</i> con el péptido $\Delta M3$	46
Figura 7. Microscopia de fluorescencia de las cepas de <i>E. coli</i> BLEE con el péptido $\Delta M3$	47
Figura 8. Microscopia de fluorescencia de las cepas de <i>E. coli</i> BLEE con el péptido $\Delta M4$.	48

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Los últimos avances enfocados en la investigación y desarrollo de nuevas moléculas con potencial actividad antimicrobiana han sido escasos y en algunos casos ineficientes, lo que representa un reto constante a nivel científico y clínico, que deja pocas posibilidades en el tratamiento de enfermedades causadas en muchos casos por bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (*E. coli*). Este microorganismo es responsable de infecciones nosocomiales y comunitarias, adquiriendo y desarrollando mecanismos de resistencia a los principales antibióticos disponibles en la actualidad, tal es el caso de *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

La implementación de nuevas técnicas y herramientas para el diseño y evaluación de péptidos antimicrobianos con características bioquímicas y estructurales específicas se convierte en una opción viable con el propósito de implementar su uso en el ámbito intra y extra hospitalario, como alternativa para contrarrestar los efectos de la creciente resistencia a los antibióticos. En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en cuatro cepas de *E. coli* productoras de BLEE. La evaluación de la actividad biológica incluyó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y la actividad citotóxica en eritrocitos humanos. Adicionalmente, la alteración en la permeabilidad de la membrana de *E. coli* se determinó por microscopía de fluorescencia y mediante la técnica de espectroscopía infrarroja se evaluó como los péptidos interactúan con liposomas compuestos de los fosfolípidos más representativos de la membrana de *E. coli* (fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina). La

evaluación de la actividad de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ demostró que estos tienen potencial uso como agentes antimicrobianos en *E. coli*, con una CMI de 2,5 y 5 μM , respectivamente. Se determinó que la CMB de ambos péptidos fue de 10 μM para todas las cepas evaluadas. El porcentaje de hemólisis para $\Delta M3$ a 40 μM y 1,25 μM fue de 12,3% y 0,2%, respectivamente. En el caso de $\Delta M4$ se obtuvo un valor de 76% y 2,1%; lo que sugiere que el péptido $\Delta M3$ tiene menor actividad citotóxica y, por tanto, sería un potencial candidato en el desarrollo de una terapia antimicrobiana futura. La capacidad de permeabilización de la membrana en todas las cepas de *E. coli* por parte de los péptidos se confirmó por microscopia de fluorescencia. La técnica de espectroscopia infrarroja permitió evidenciar a través del uso de sistemas liposomales, que el péptido $\Delta M3$ induce cambios en la temperatura de transición de los liposomas, demostrando la afinidad del péptido y los lípidos utilizados.

1. INTRODUCCIÓN

Desde antes del descubrimiento de la penicilina en 1928 por Fleming y su posterior implementación en la década de 1940, las bacterias han demostrado tener una gran capacidad de adaptarse al entorno medioambiental y a la presión selectiva que han ejercido los antibióticos. Esto ha llevado a la propagación y diseminación de microorganismos con diferentes mecanismos de resistencia y la capacidad de difundirse ampliamente causando infecciones nosocomiales y en la comunidad (Jindal et al., 2015). Los fármacos antimicrobianos descubiertos en el siglo XX y que han sido empleados como terapia en enfermedades infecciosas, han contribuido notoriamente en el tratamiento y evolución de las enfermedades salvando millones de vidas en todo el mundo; sin embargo, el uso constante y prolongado de los mismos, ha hecho que los niveles de resistencia aumenten considerablemente dejando pocas alternativas terapéuticas y por tanto, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial (Mukerji et al., 2017).

Las bacterias Gram negativas están ampliamente relacionados con enfermedades en unidades de cuidado intensivo (UCI) tales como neumonía asociada a ventilador, infecciones en sangre relacionadas a catéter e infecciones del tracto urinario, entre otras (Iredell et al., 2016). De igual forma se han caracterizado por tener y desarrollar mecanismos de resistencia a múltiples fármacos, en *E. coli* se han reportado perfiles de resistencia específicos a múltiples antibióticos, es el caso de *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) la cual es resistente a penicilinas, cefalosporinas hasta de cuarta generación y monobactámicos. Esta bacteria es considerada de prioridad crítica según la OMS, dada las

pocas opciones de tratamiento disponible para contrarrestar las enfermedades ocasionadas por el microorganismo (Cabrera et al., 2007, Tornimbene et al., 2018).

Es importante mencionar que de dieciocho compañías dedicadas al desarrollo de nuevos antibióticos a nivel mundial solo tres siguen vigentes (Merck, Johnson & Johnson y Pfizer) (Boucher et al., 2013). Principalmente, debido a las regulaciones exigentes, el uso de medicamentos genéricos y a las dificultades técnicas para desarrollar nuevas moléculas que tengan actividad en microorganismos Gram negativos; sin dejar de lado que actualmente, las compañías farmacéuticas están centrando su atención, en el tratamiento de enfermedades crónicas como la hipertensión ya que son más lucrativas (Jindal et al., 2015) (Fair & Tor, 2014). En los últimos veinte años solo se han desarrollado y aprobado dos nuevas clases de antibióticos (lipopéptidos y oxazolidinonas), ambos contra bacterias Gram positivas. La última nueva clase de fármacos contra bacterias Gram negativas fue descubierta en 1962 con la Polimixina B. Como ejemplo de 42 nuevos agentes terapéuticos en preparación para uso clínico, solo 12 antibióticos mostraron actividad contra bacterias prioritarias Gram negativas y solo cinco de ellos, han progresado a Fase de prueba III en los últimos diez años (Iredell et al., 2016).

Debido a la lamentable asociación que existe entre la resistencia de los microorganismos y la ausencia de antibióticos eficaces en el control de infecciones, se hace prioritario el estudio de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana en cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Numerosas investigaciones han centrado su atención en los péptidos antimicrobianos (PAMs), que han demostrado tener una actividad antimicrobiana de amplio espectro con baja tendencia de desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos,

convirtiéndolos en potenciales agentes terapéuticos. Estas moléculas que hacen parte del sistema inmune innato de numerosos organismos, ejercen su mecanismo de acción sobre los patógenos sin que estos puedan contrarrestar su efecto fácilmente. Dentro de los mecanismos que se han propuesto para explicar su actividad biológica, el más reconocido es la disrupción de la membrana bacteriana a través de la interacción electrostática de las cargas del péptido y los fosfolípidos de la bicapa, que finalmente causa la lisis del microorganismo (Pane et al., 2017).

En este contexto, tiene lugar la investigación de nuevos péptidos antimicrobianos como respuesta a la creciente necesidad de enfrentar el aumento en la resistencia bacteriana a los antibióticos en uso. Los péptidos antimicrobianos se consideran como una estrategia promisoriosa en el tratamiento de infecciones causadas por diferentes microorganismos, por lo anterior en los últimos años el Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas, perteneciente al Instituto de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia ha centrado su atención y trabajo, en el diseño, síntesis, identificación y evaluación de péptidos con potencial actividad biológica. En uno de los trabajos de investigación del grupo se diseñó y evaluó el péptido sintético $\Delta M2$ el cual demostró tener actividad contra bacterias Gram negativas sensibles a antibióticos betalactámicos (Oñate et al., 2017). A partir de este péptido, y para el desarrollo de este trabajo de investigación se diseñaron dos nuevos péptidos denominados $\Delta M3$ y $\Delta M4$, con el propósito de evaluar su actividad en cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Resistencia Antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo de resistir el efecto de un antibiótico al cual era sensible originalmente, esta puede clasificarse como intrínseca o adquirida. La resistencia natural o intrínseca es propia de cada especie bacteriana, tal es el caso de la resistencia a vancomicina en bacterias Gram negativas; mientras que la resistencia adquirida se da en aquellas bacterias que por naturaleza son sensibles a un antibiótico pero pueden modificar los mecanismos de resistencia en función de su variabilidad genética, ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Martínez, 2010). Este tipo de resistencia es evolutiva y su frecuencia depende de la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre el microorganismo (Jindal et al., 2015).

En las últimas dos décadas se ha evidenciado un incremento significativo de microorganismos con múltiples mecanismos de resistencia a diferentes fármacos, (Ruppé et al., 2015) lo que se ha convertido en un problema de salud pública mundial, aumentando considerablemente el tiempo de las estancias hospitalarias, los costos de los medicamentos y retrasando la administración de la terapia antibiótica adecuada (Jindal et al., 2015). Esto aumenta las tasas de morbilidad y mortalidad, principalmente por el uso indebido y abuso de los antibióticos en terapias de medicina veterinaria y humana; a causa de la prescripción inadecuada y administración innecesaria de antibióticos, además del tiempo y dosis de administración incorrectos, así como el uso de antibióticos de amplio espectro en bacterias

sensibles, sin dejar de lado, el uso generalizado de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos, en unidades de cuidados intensivos y el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los microorganismos aislados; lo que favorece no sólo a la proliferación de bacterias resistentes, aumento en la virulencia por los cambios en la expresión de genes y la transferencia horizontal de genes (Ruppé et al., 2015). Además, en los últimos sesenta años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de estos microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos y desinfectantes debido al uso excesivo de productos de limpieza, la contaminación de fuentes de agua y suelos con antibióticos provenientes de industrias agrícolas y ganaderas, así como de clínicas y hospitales (Paphitou, 2013). En Estados Unidos, por ejemplo, el 80% de los antibióticos son empleados en producción animal, por lo que desde hace más de 35 años se han descrito casos de transferencia de genes de resistencia de animales a humanos lo que ha causado un aumento en los perfiles de resistencia en la microbiota de animales y granjeros (Cabrera et al., 2007). Esta problemática afecta a pacientes, instituciones prestadoras de salud, industrias farmacéuticas y a la comunidad en general. Por lo que en el año 2014 la OMS generó el primer informe mundial sobre resistencia antimicrobiana basado en datos de 14 países donde se pone en manifiesto una grave amenaza para la salud pública dado que en ausencia de medidas urgentes y coordinadas por parte de muchos de los afectados; el mundo está abocado a una era pos-antibiótica en la que infecciones comunes y lesiones menores como por ejemplo los abscesos cutáneos, la conjuntivitis o la otitis, que fueron tratables durante años volverán a ser potencialmente mortales. En el año 2017, se creó el primer sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (GLASS: Global Antimicrobial Resistance

Surveillance System) el cual permite recopilar, analizar y compartir datos de todos los países en cuanto al estado actual de la resistencia antimicrobiana (Tornimbene et al., 2018).

2.2 Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana tanto intrínseca como adquirida se puede clasificar en tres mecanismos básicos por medio de los cuales los microorganismos pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo con el mecanismo expresado y al mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia principales son inactivación enzimática del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad. Cabe resaltar que los tres mecanismos se pueden presentar simultáneamente en un microorganismo (Vignoli & Seija, 2015). Estos mecanismos de resistencia se ilustran en la figura 1.

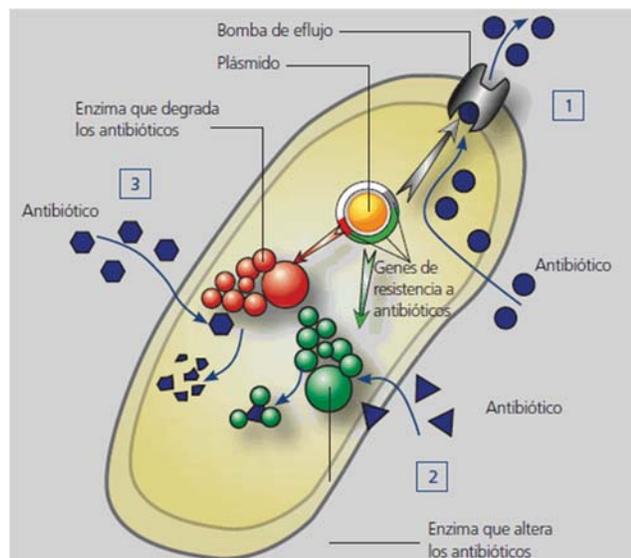


Figura 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativas. 1) Bombas de eflujo, 2) modificación del sitio de acción del antibiótico y 3) inactivación enzimática. Tomado de (Sanchez et al., 2015)

2.2.1 Inactivación Enzimática del Antibiótico

Este mecanismo se basa en la capacidad del microorganismo de generar enzimas capaces de alterar la estructura química del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad y actividad bactericida o bacteriostática sobre la bacteria. Dentro de este mecanismo se destacan enzimas como las β -lactamasas, son las enzimas más prevalentes y son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámicos a través del enlace amida de esta familia de antibióticos. Es importante resaltar que este, es el mecanismo de resistencia más prevalente en bacterias Gram negativas. Dentro de este mecanismo también se pueden presentar otro tipo de modificaciones al antibiótico no hidrolíticas como acetilaciones, adenilaciones y fosforilaciones. Un ejemplo son las O-fosfotransferasas que catalizan la fosforilación, transfiriendo un grupo fosfato desde un ATP hasta un grupo hidroxilo del aminoglucósido provocando así la alteración de la estructura de los antibióticos (Vignoli & Seija, 2015).

2.2.2 Alteración del Sitio Blanco del Antibiótico

La resistencia bacteriana a través de este mecanismo de acción consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras. Un ejemplo, es la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, esto les permite a bacterias como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* ser resistentes a las quinolonas. Así mismo, se pueden presentar modificaciones en el gen que codifica el blanco del antibiótico, como las alteraciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP) que se ha detectado en *Streptococcus pneumoniae* que confiere resistencia a penicilina e incluso a ceftriaxona; y la adquisición de genes que

codifiquen para sustitutos de los blancos originales, como PBP2 en *Staphylococcus spp.* (Tafur et al., 2008).

2.2.3 Alteración en las Barreras de Permeabilidad

Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos, por alteraciones estructurales en los componentes de la membrana bacteriana que influyen en la permeabilidad, así como a por la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo, las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce en el microorganismo (Tafur et al., 2008, Vignoli & Seija, 2015). La resistencia por alteración de estas barreras y por bombas de eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. En bacterias Gram negativas estos sistemas se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Dentro de los múltiples sistemas de eflujo en estos microorganismos, los más conocidos son Mex AB, Opr M, Mex Opr J, Mex EF y OprN (Ruppé et al., 2015).

2.3 Resistencia Antimicrobiana En Bacterias Gram Negativas

La resistencia a los antimicrobianos en las bacterias Gram negativas es un reto importante en el tratamiento de las infecciones clínicas en todo el mundo debido a la capacidad de estos microorganismo de desarrollar rápidamente resistencia contra los antimicrobianos en uso; además, estas bacterias han demostrado ser resistentes a todas las opciones de antibióticos

disponibles actualmente, llegando a una situación similar a la que se tenía antes de la era antibiótica (Fair, 2014, Martínez, 2010).

Estos microorganismos causan entre el 21 y 50% de las infecciones bacterianas y de estas, alrededor del 30% son resistentes a antibióticos β -lactámicos, siendo las más graves las infecciones causadas por Enterobacterias como *E. coli*. Estos microorganismos son responsables del 45-70% de la neumonía asociada a ventilación, del 20–30% de las infecciones asociadas a catéter y comúnmente asociadas a sepsis adquiridas en la UCI e infecciones del tracto urinario (ITU) (Fair & Tor, 2014, Iredell et al., 2016). La resistencia antimicrobiana adquirida por *E. coli* ha dado lugar a limitaciones terapéuticas, aumento de los costos de estancias hospitalarias y de las tasas de morbilidad y mortalidad, con pocos o ningún agente antimicrobiano nuevo para combatir las infecciones graves que amenazan la vida (Iredell, 2016).

La resistencia a los betalactámicos en bacterias Gram negativas está dada principalmente por mutaciones en los genes cromosómicos bla TEM y bla CTX-M. Dichos genes de resistencia han surgido por mutación o adquisición de plásmidos o transposones, elementos de expresión genética que incorporan genes sin promotor, de tal modo que se convierten en genes funcionales. Adicionalmente, existen elementos genéticos móviles como los plásmidos que codifican para β -lactamasas y otros mecanismos de resistencia, por lo que la transferencia de un solo plásmido puede ser suficiente para generar múltiples mecanismos de resistencia en la cepa receptora (Tang et al, 2014), dando como resultado un aumento en la expresión de mecanismos de resistencia como la inactivación enzimática, bombas de eflujo, pérdidas de permeabilidad o cambios en el sitio de acción del antibiótico.

2.3.1 Resistencia Mediada por β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Los antibióticos betalactámicos actúan sobre la fase final de la síntesis de peptidoglicano, como sustratos competitivos de las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana llamadas transpeptidasas, específicamente de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), causando la destrucción de la pared celular y por tanto teniendo un efecto lítico en la bacteria (Bush, 2010). Como se mencionó anteriormente, dentro de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en Gram negativos, se encuentran la modificación enzimática del antibiótico (Tafur et al., 2008), donde se destacan las β -lactamasas. Estas enzimas fueron descritas por primera vez después del surgimiento de la ampicilina en 1960, la primera β -lactamasa descrita fue la TEM-1 aislada de una cepa de *Staphylococcus aureus*, capaz de hidrolizar la penicilina. Posteriormente, fue aislada una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una β -lactamasa capaz de inactivar tanto a las aminopenicilinas como a las cefalosporinas de primera generación, se le denominó SHV-1 (Morejón, 2013). La aparición de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se atribuyó al uso de cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam, y se produjeron a partir de una serie de mutaciones puntuales en las β -lactamasas TEM y SHV de espectro reducido, asociadas a cambios en los aminoácidos de su sitio activo lo que permitió ampliar su capacidad hidrolítica. La diseminación de BLEEs transmitidas por plásmidos son actualmente consideradas como el principal problema de resistencia en enterobacterias (Tang, Apisarnthanarak, & Hsu, 2014).

Las primeras variaciones de TEM y SHV se describieron en 1983 justo después de la introducción al mercado de las cefalosporinas de tercera generación, cuando un grupo de investigadores, encabezados por Knothe, aislaron de una cepa de *Klebsiella ozaenae* una

nueva β -lactamasa producto de mutaciones de la SHV-1, a la que llamaron SHV-2, la misma era capaz de hidrolizar las cefalosporinas de cuarta generación y aztreonam (Morejón, 2013). Estas enzimas posteriormente se propagaron de manera exitosa en cepas de *K. pneumoniae*, *Enterobacter sp.* y *E. coli*, causando brotes hospitalarios en la década de 1990 (Smet et al., 2008). Estas cepas continúan siendo endémicas en la actualidad, pero han sido superadas por otro tipo de BLEE llamada CTX-M descubierta en 1989, derivada de betalactamasas cromosómicas de especies de *Kluyvera*. Esta BLEE no tiene relación filogenética con las otras BLEE descritas hasta el momento y está asociada principalmente a individuos colonizados sin condición médica relevante (Martínez & Calvo, 2010).

Las BLEEs confieren a las bacterias resistencia a un gran número de antibióticos betalactámicos de uso común como penicilinas, cefalosporinas hasta de cuarta generación y monobactámicos (aztreonam), pero son incapaces de hidrolizar cefamicinas y carbapenémicos (Morejón, 2013). Su actividad se basa en la capacidad de romper el puente amida del anillo betalactámico de estos antibióticos y producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas, esto evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas de unión a penicilina (PBP) y de esta forma impedir la formación de la pared, por lo que no se induce la lisis bacteriana. Cabe resaltar que en el ámbito clínico la presencia de una infección causada por una bacteria productora de BLEE debe ser considerada como resistente a cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos (Paterson, 2005).

2.3.2. Clasificación de las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las β -lactamasas se han clasificado generalmente en dos esquemas principales, el esquema molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Madeiros, como

se observa en la tabla 1. El primero clasifica las β -lactamasas en cuatro grupos principales (A-D) de acuerdo al sitio activo de la enzima, por lo que las β -lactamasas de clase A, C y D corresponden a las serin- β -lactamasas y las de clase B a las metalo- β -lactamasas.

Tabla 1. Clasificación de las β -lactamasas por el sistema de clasificación de Ambler y el de Bush Jacoby Madeiros. Tomado de (Martín et al., 2013).

β -lactamasas	Bush, Jacoby, Madeiros	Molecular (Ambler)	Familias de β -lactamasas	Sustratos
Espectro Ampliado	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Bencilpenicilinas, minopenicilinas, Carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, Cefalosporinas de espectro estrecho**
	2d	D	OXA-1 a OXA-10, PSE-2 (OXA-10)	El mismo sustrato de TEM-1, TEM-2, SHV-1, más cloxacilina, metilicina y oxacilina. Inhibidas escasamente por ácido clavulánico.
Espectro extendido (BLEE)	2be	A	TEM-3 a TEM-26 SHV-2 A SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefalosporinas de tercera generación** y aztreonam
	2br	A	TEM-30 a TEM-36, IRT-2	β -lactamasas tipo IRT (Inhibitor Resistant TEM). Resistentes a los inhibidores de β -lactamasas ácido clavulánico y sulbactam, pero sensible a tazobactam.
	2d	D	OXA-1 a OXA-10	El mismo sustrato del grupo de espectro ampliado más cefepima para algunas enzimas.
	2f	A	Otras (BES-1, familia GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 y VEB-2)	El mismo sustrato de la familia TEM y SHV

Por el contrario, la clasificación de Bush-Jacoby-Madeiras se basa en la similitud funcional, el perfil del sustrato y la capacidad de ser inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico y el sulbactam. En esta clasificación existen cuatro grupos funcionales y varios subgrupos (2b, 2d, 2br, 2f, etc.), el grupo 1 corresponde a enzimas con actividad cefalosporinasa, no inhibible por el ácido clavulánico; el grupo 2 corresponde a las penicilinasas y cefalosporinasa que si son inhibibles; mientras que en el grupo 3 están la

metaloenzimas de tipo B, que son inhibibles por el EDTA. Finalmente, en el grupo 4 están aquellas enzimas con actividad penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico que se encuentran en especies de *Pseudomonas cepacia* (Smet et al., 2008).

Esta clasificación es más relevante para clínicos y microbiólogos dado que tiene en cuenta la importancia de los inhibidores de β -lactamasas y los sustratos β -lactámicos. En esta categoría se encuentran las betalactamasas tipo TEM y SHV las cuales son las más comunes en bacterias Gram negativas principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. También se encuentran las tipo CTX-M que son de naturaleza plásmidica y han tenido mayor relevancia recientemente dado que confiere resistencia a antibióticos como cefotaxime, cefuroxime y cefepime; sin causar un aumento significativo en la concentración inhibitoria mínima (CIM), mientras que las tipo OXA raramente se encuentran en enterobacterias. (Tang et al., 2014).

2.4 *Escherichia coli* Productora de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

E. coli es la bacteria Gram negativa implicada con más frecuencia en infecciones tanto adquiridas en la comunidad como nosocomiales, aunque este microorganismo hace parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, la OMS la cataloga como de prioridad crítica dado las pocas opciones de tratamiento disponibles y la facilidad que tiene el microorganismo de adquirir mecanismos de resistencia a la mayoría de antimicrobianos (García et al., 2011). La presencia de *E. coli* productora de BLEE se asoció inicialmente a brotes intrahospitalarios, principalmente en área de cuidados intensivos y quirúrgicas; sin embargo, en los últimos años se han descrito aislamientos de infecciones adquiridas en la comunidad, brotes en unidades de cuidado intermedio, y en portadores sanos. Estos casos se deben principalmente a la

capacidad del microorganismo de adquirir mecanismos de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, en el que la bacteria adquiere genes de resistencia a través de mecanismos como conjugación, transformación y transducción, permitiendo el aumento de cepas multirresistentes como es el caso de *E. coli* BLEE (Fair, 2014). En humanos el principal reservorio de *E. coli* con BLEE es el tracto digestivo y su transmisión se facilita por la transmisión plasmídica de estas enzimas entre personas a través del contacto físico directo (García et al., 2011). Este microorganismo se ha asociado directamente con infecciones del tracto urinario, así como infecciones intestinales, neumonía, peritonitis, colecistitis y bacteriemias. También se ha considerado que ciertos alimentos de origen animal, principalmente en relación con las aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de estas enzimas al hombre, debido al uso constante de antibióticos en la industria avícola lo que genera un aumento significativo en los perfiles de resistencia (Bush, 2010).

Algunos factores de riesgo asociados a infecciones causadas por *E. coli* BLEE están relacionados con el estado clínico del paciente, el tiempo de hospitalización, la enfermedad de base y el uso de terapias antibióticas prolongadas o inadecuadas (García et al., 2011). Actualmente, la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está dando en cuanto a la distribución mundial de *E. coli* BLEE procedente principalmente del ámbito extra hospitalario, debido a que estas cepas se han asociado con resistencia cruzada con otros antibióticos como las flouoroquinolonas y la gentamicina. También se ha descrito la adquisición de la enzima metalo- β -lactamasa NDM-1 de *Klebsiella pneumoniae*, que confiere resistencia a todos los antibióticos betalactámicos incluidos los carbapenémicos a excepción de los monobactámicos, por lo que se considera urgente encontrar acciones

conjuntas que permitan combatir la creciente resistencia a los antibióticos por parte de este microorganismo. (Fair, 2014, Smet et al., 2008).

2.5 Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas evolutivamente conservadas que cumplen un papel crítico en el sistema inmune innato de bacterias, virus, plantas, vertebrados e invertebrados. Estas moléculas hacen parte de la primera línea de defensa contra patógenos, se ha descrito que tienen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral e incluso actividad antitumoral (Mahlapuu et al., 2016). Los PAMs son moléculas constituidas generalmente de 10-50 aminoácidos (<10 kDa), aunque varían mucho en función de su secuencia y estructura, comparten algunas características como ser policatiónicas debido a residuos de lisina y arginina en la estructura, y estar constituidos en un 50% de residuos hidrofóbicos lo que las hace estructuras anfipáticas (Travkova et al., 2017, Sivieri et al., 2017, van der Weide et al., 2017).

El primer PAM reportado de origen animal fue la Defensina identificado en granulocitos de conejos (Ahn et al., 2006). Los humanos producen cuatro tipos diferentes de β -defensinas (HBD 1-4) compuestas de hasta 45 residuos y son expresadas por las células epiteliales de la piel; estos péptidos son activos contra bacterias, hongos y virus; y están involucrados principalmente en procesos de inmunidad celular ya que tienen la propiedad de unirse al péptido C1q y activar de esta forma la vía clásica del sistema del complemento (Lemos, 2001). Adicionalmente tienen un efecto quimiotáctico para linfocitos T, monocitos y células dendríticas maduras, además de inducir la síntesis de citocinas (Lemos, 2001).

Una de las familias de péptidos más reconocidas son las cecropinas, las cuales fueron aisladas de la polilla de *Hyalophora cecropia* y se han identificado más de 150 moléculas activas, que han demostrado tener actividad contra bacterias, hongos y protozoos (Bulet et al., 1999). Hasta la fecha, se han identificado y registrado en las bases de datos como GenBank y APD (Antimicrobial Peptide Database) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) más de 800 secuencias de péptidos naturales y sintéticos disponibles para estudios como antimicrobianos. Algunas de estas moléculas se han utilizado desde 1969 como la Polimixina B, lipopéptido usado hasta la fecha como una de las últimas opciones de tratamiento en infecciones causadas por bacterias Gram negativas; sin embargo con notorios efectos nefrotóxicos y neurotóxicos (Sivieri et al., 2017).

2.5.1 Estudios Previos de PAMs en E. coli

Numerosos estudios han descrito la actividad antimicrobiana de estas moléculas contra diferentes microorganismos, principalmente contra bacterias. Holfeld y colaboradores evaluaron la actividad de la Pirrocoricina obteniendo una CIM de 2 μM sobre cepas de *E. coli* sensibles (Holfeld et al., 2018). Otros investigadores (S. Lee et al., 2001), (Dias et al., 2017) y (Ebbensgaard et al., 2015) han evaluado la actividad antimicrobiana de diferentes PAMs catiónicos sobre *E. coli* encontrando para esta bacteria rangos de actividad de entre 3 y 78 μM . Algunos de los estudios realizados con péptidos son estructuras modificadas de péptidos naturales como es el caso del Pexiganan (MSI-78) creado por la compañía *Magainin Pharmaceutical Inc PA, EE. UU.* Este péptido proviene de modificar estructuralmente la Magainina, péptido aislado de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*, con actividad antimicrobiana de amplio espectro sobre más de 3109 aislados clínicos bacterianos

incluyendo cepas de *E. coli* (Zasloff, 1987). El Pexiganan llegó a fase II de prueba dos de ensayos clínicos, pero fue descartado por la FDA debido a que demostró menor efectividad (66%) comparado con el antibiótico de control (Ofloxacin, 82%) en 835 pacientes con úlceras en los pies ocasionadas por la diabetes (Gordon et al., 2005).

Diferentes PAMs han mostrado tener características prometedoras como potenciales fármacos en estudios preclínicos. La compañía Helix Biomedix Inc, (*Bothell, WA, EE. UU.*), está desarrollando un microbicida de amplio espectro para ser usado contra bacterias (*Garnerella, Prevotella, Peptostreptococcus* y *Bacteroides*), hongos (*Candida sp.*), y virus (HSV-2, HSV-1) que causan enfermedades de transmisión sexual (ETS) (Gordon et al., 2005). El péptido Plectasina de la compañía *Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca)* es una defensina fúngica aislada de *Pseudoplectania nirgrella* que presenta actividad *in vitro* contra las bacterias Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae* en modelos murinos de infecciones como peritonitis (Mygind et al., 2005).

En Colombia, la investigación de PAMs se ha llevado a cabo en el marco de proyectos de investigación desarrollados por varias instituciones. En este sentido se tienen reportes de la evaluación antimicrobiana de péptidos catiónicos principalmente en *E. coli* y *Staphylococcus aureus* sensibles (Oñate et al., 2017) (Hincapié et al., 2018) Sin embargo, hasta el momento no se reportan estudios en cepas que expresen mecanismos de resistencia.

2.5.2 Propiedades Fisicoquímicas de los PAMs

La carga de los PAMs es un factor asociado con mucha frecuencia a su actividad antimicrobiana, muchos estudios han relacionado la carga positiva de los PAMs directamente

con el proceso bactericida sobre patógenos, debido a la interacción electrostática entre los grupos cargados positivamente del péptido y los grupos cargados negativamente de las membranas (Jiang et al., 2009). Dathe et al., 2001 describió que una carga entre +2 y +9 está relacionada con PAMs biológicamente activos sobre bacterias, esta actividad se basa en el hecho de que las sustituciones de aminoácidos producen una variación de ciertos parámetros estructurales que influyen en la actividad del péptido. Por lo tanto, los cambios en la posición de los residuos cargados pueden influir en la helicidad, y en el momento hidrofóbico sin dejar de lado, que un aumento en la carga está relacionado con una hidrofobicidad reducida, afectando la actividad antimicrobiana y generando péptidos con mayor actividad hemolítica (Wieprecht et al., 1997, Bessalle et al., 1992).

La hidrofobicidad por su parte, es un factor igualmente relevante en la interacción con las membranas bacterianas; por lo general, alrededor del 50% de los residuos que constituyen los PAMs son de tipo hidrofóbico, esta es una característica fundamental, debido a que la región hidrofóbica del péptido es la que tiene contacto con la zona hidrofóbica de la membrana; por lo que la modificación de esta característica puede ser un factor crucial en la actividad sobre diferentes microorganismos (Lee, 2014).

Se ha descrito que posterior a la interacción electrostática entre el péptido y la membrana, este adopta una conformación helicoidal que facilita la inserción del PAM a la bicapa (Lee, 2014). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la hidrofobicidad y la carga global positiva de los PAMs, están relacionados directamente con la selectividad de los mismos, debido a que un PAM altamente hidrofóbico puede causar alteración tanto en membranas procariotas como eucariotas, por lo que podría ser potencialmente hemolítico (Fernández et al., 2007, Eisenberg, 1984, Wieprecht et al., 1997).

2.5.3 Clasificación de los PAMs

De acuerdo a su estructura tridimensional se clasifican en tres grandes grupos, aquellos estabilizados por láminas β , hélices α y aquellos de estructura lineal (Chung & Khanum, 2017). En la figura 2 se muestra un ejemplo de estas estructuras.

2.5.3.1 Péptidos β -Laminares

Estos PAMs presentan patrones de hoja β bien definidos, son reconocidos por ser activos en membranas; sin embargo, la evidencia sugiere que la mayoría de PAMs que tienen esta conformación, tienen la capacidad de atravesar la membrana celular e interactuar directamente con el DNA (Sivieri et al., 2017, Yeaman & Yount, 2003). Dentro de los PAMs que tienen conformación de lámina β , se pueden citar las taquiplesinas y protegrinas, las primeras son catiónicas, de aproximadamente 17 aminoácidos, con dos puentes disulfuro y son producidas por los cangrejos herradura. Las segundas son sintetizadas por leucocitos de porcinos, poseen dos puentes disulfuro entre cuatro residuos de cisteína y tienen también carga positiva (Marshall & Arenas, 2003).

2.5.3.2 Péptidos α -Helicoidales

Esta es la estructura más común de los PAMs, con una conformación anfipática α -helicoidal que permite la inserción de un sector hidrofóbico bien definido en la bicapa lipídica. Se presenta cuando los residuos se organizan alrededor de un eje imaginario y el péptido toma una estructura de hélice en ambientes membranosos lo que aumenta su actividad antimicrobiana promoviendo la interacción entre los fosfolípidos y el péptido a través de la interacción electrostática (Sivieri et al., 2017).

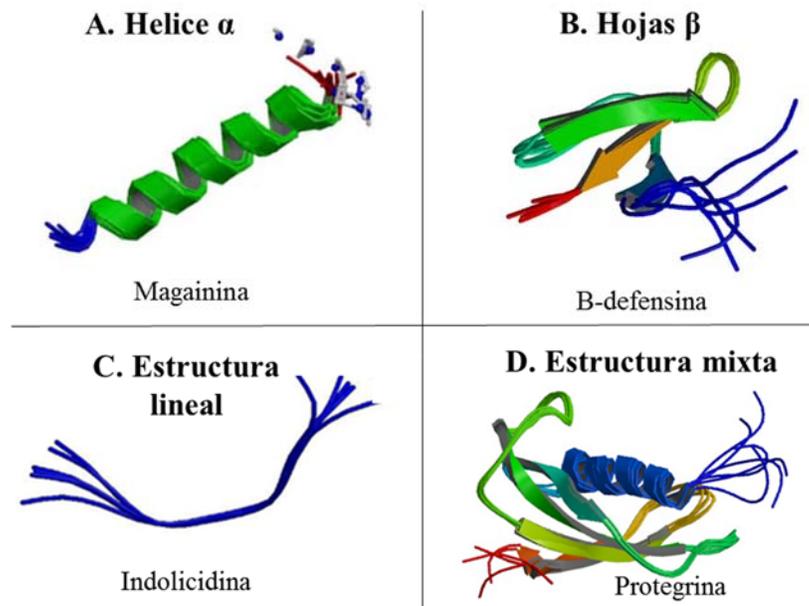


Figura 1. Clasificación de los PAMs según su estructura, tomado de Travkova et al., 2017.

A) Magainina (estructura helicoidal), *B)* β -defensina (estructura de lamina β), *C)* Indolicidina (Estructura lineal) y *D)* (Estructura mixta).

Esta estructura está estabilizada por puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo (C=O) del enlace peptídico del primer residuo y el grupo amino (NH) del enlace peptídico del cuarto residuo. Dentro de este grupo, los péptidos más estudiados son las Magaininas, moléculas pequeñas aisladas con reconocida actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos como bacterias y hongos con baja actividad hemolítica, otro ejemplo es la Cecropina aislada de hemolinfa de insectos, este péptido también ha mostrado alta actividad antimicrobiana y poca citotoxicidad (S. Lee et al., 2001).

2.5.4 Mecanismo de Acción de los PAMs

Los PAMs son reconocidos por actuar de forma rápida y eficiente bajo condiciones *in vitro* sobre un gran número microorganismos. Su actividad antimicrobiana se basa en la interacción electrostática, de los residuos cargados positivamente en los PAMs y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en los Gram positivos o los lipopolisacáridos en los Gram negativos (Téllez & Castaño, 2010). Después de esta interacción, la anfipaticidad de las estructuras facilita la interacción de las regiones cargadas positivamente con los fosfolípidos, lográndose así la inserción del péptido en la membrana (Zelezetsky & Tossi, 2006, Travkova et al., 2017). Esto genera áreas de inestabilidad en la membrana bacteriana, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa, una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir alteraciones estructurales en la membrana y por lo tanto a la célula (Bulet et al., 1999).

Teniendo en cuenta lo anterior, se han descrito varios mecanismos relacionados con la forma en que el péptido interactúa con la membrana de los microorganismos y logra inducir la lisis bacteriana (Jenssen et al., 2006, Chung & Khanum, 2017). Describir solo la interacción electrostática para causar la muerte bacteriana es insuficiente, se deben tener en cuenta algunos detalles moleculares adicionales. Se ha encontrado por ejemplo, que algunos PAMs como la Buforina II no interactúa sobre la membrana sino que la atraviesa y logra unirse al DNA mediante motivos de unión relacionados con las histonas (Li et al., 2017). Otros PAMs, como la Indolicina, pueden causar disrupción de la membrana, además de unirse al ADN o a algunas enzimas asociadas a éste, como la topoisomerasa I y la ARN polimerasa. Este tipo de péptidos pueden inhibir el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos (Avitabile et al., 2016). Otros péptidos son capaces de alterar la síntesis proteica, al interrumpir la incorporación de histidinas y alterar las enzimas involucradas en el proceso

(Gordon, et al., 2005). PAMs como la Pirrocoricina y la Drosocina, ejercen su mecanismo de acción actuando sobre el plegamiento de las proteínas mediante la inhibición de chaperonas específicas de las bacterias, como DnaK en *E. coli*. (Téllez & Castaño, 2010).

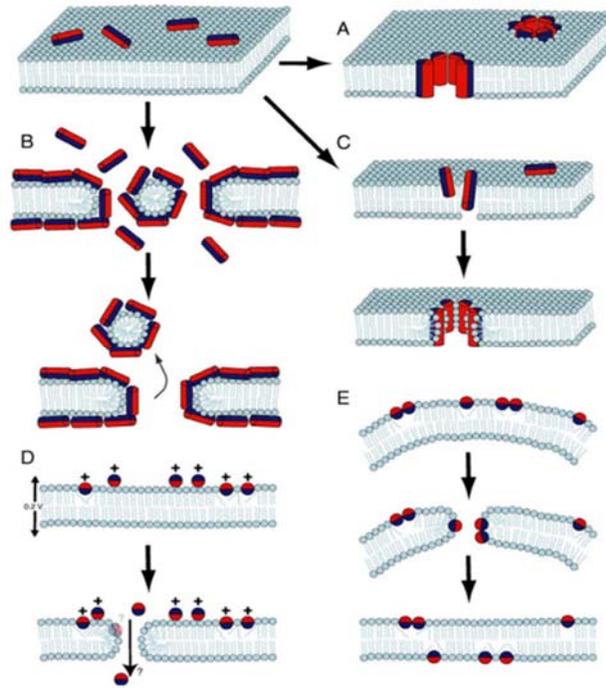


Figura 2. Mecanismos de acción de los PAMs, Tomado de Travkova et al., 2017. A) barril, B) alfombra, C) poro toroidal, D) electroporación molecular y E) balsa de hundimiento.

Los principales mecanismos de acción de los PAMs están asociados a la interacción con la membrana bacteriana, la ilustración de estos mecanismos se puede observar en la figura 3. Dentro de estos mecanismos descritos se encuentra el modelo de carpeta o alfombra, en que el PAM interactúa únicamente con la región polar del lípido y la cadena peptídica es orientada paralelamente sobre la superficie celular, en este caso, no se presenta penetración de la bicapa y la disrupción de la membrana se da de forma similar a la acción de un detergente (Zelezetsky & Tossi, 2006). Otro mecanismo es la de la formación de un poro toroidal, en el

que un número de péptidos atraviesan la membrana bacteriana. El mecanismo de barril se basa en la organización del péptido luego de ingresar a la membrana formando un “barril” de forma que las cadenas laterales hidrofóbicas encaran el centro hidrofóbico de la membrana y las cadenas polares enfrentan el centro creando un poro hidrofílico, lo que genera una pérdida en el equilibrio osmótico y en el potencial de membrana causando finalmente la muerte celular (Téllez & Castaño, 2010, Zelezetsky & Tossi, 2006, Pushpanathan et al., 2013).

2.5.5 Resistencia Asociada a los PAMs

Se ha postulado que la resistencia asociada a PAMs es baja, ya que sólo se puede presentar resistencia si se da un cambio en la composición de los lípidos de la membrana del microorganismo, ocasionando un cambio en la carga o en la fluidez de esta, haciendo que los PAMs pierdan afinidad por las membranas bacterianas y por tanto evitando que induzcan la muerte del microorganismo (Nizet, 2006). Sin embargo, a pesar de esto se han descrito algunos mecanismos de resistencia de las bacterias a los PAMs, determinados por algunas propiedades en la membrana de los microorganismos como la carga, composición (lipopolisacáridos y lípidos) y la presencia de un potencial electroquímico en la membrana citoplasmática. Adicionalmente, la respuesta de la bacteria a cambios ambientales y estrés, así como mecanismos de transporte activo, bombas de expulsión y degradación del péptido a través de proteasas (Shang, et al., 2016, Yeaman & Yount, 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que la bacteria *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de modificar la carga de su membrana al introducir aminoácidos como D-alanina, desde el citoplasma hacia la superficie del ácido teicoico, constituyente de la barrera de peptidoglicano. En otros casos, los polisacáridos de la cápsula limitan la interacción de los PAMs con los sitios de acción en

la membrana bacteriana, lo que explica que las cepas sin cápsula de *Klebsiella pneumoniae* sean más sensibles a la acción de los péptidos antimicrobianos (Shang et al., 2016) (Gordon, et al., 2005). En microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.*, se ha descrito la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar los PAMs, como elastasas, gelatinasas, metaloproteinasas, metaloproteasas, proteasas de cisteína y proteasas de superficie (Nizet, 2006).

2.5.6 Perspectivas del Uso Terapéutico de Péptidos Antimicrobianos

La creciente necesidad de encontrar nuevas moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias resistentes ha hecho que se tenga un especial interés en el diseño y evaluación de moléculas como los péptidos. El potencial terapéutico de los PAMs se atribuye principalmente a la capacidad de causar lisis en la membrana bacteriana, demostrando así capacidad para matar rápidamente un amplio espectro de microorganismos que incluyen bacterias, hongos y virus resistentes a múltiples fármacos convirtiéndolos en una promisorio opción terapéutica (Datta, et al., 2016). Uno de los PAMs que se producen actualmente como terapia antimicrobiana es la Daptomicina, este es un lipopéptido aniónico sintetizado naturalmente por la bacteria Gram positiva *Streptomyces roseosporus* y descubierto en la década de 1980 y aprobado por la FDA desde el año 2003. Su actividad se da contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Giuliani et al., 2007).

Adicionalmente, se han identificado actividades de sinergismo de algunos péptidos con antibióticos de uso convencional (García et al., 2018). Por ejemplo, En estudios realizados

por Nuding y otros se demostró que los péptidos HBD1 - HBD3, HNP1, HD5, y LL-37 al combinarse con antibióticos como tigeciclina, moxifloxacina y el meropenem tienen efecto sinérgico, lo cual favorece la actividad antimicrobiana contra cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Clostridium difficile* (Nuding et al., 2014). También la bacitracina ha mostrado este comportamiento en combinación con antibióticos de uso tópico como la neomicina y la polimixina B (Zhang & Falla, 2006). Así mismo, se ha descrito que algunos PAMs como el LL-37, pueden neutralizar las endotoxinas bacterianas como el LPS evitando la secreción de citocinas proinflamatorias que pueden causar destrucción del tejido, shock e incluso la muerte. Esto demuestra que pudieran ser empleados como inmunomoduladores en enfermedades infecciosas y no infecciosas (Zhang & Falla, 2006).

Sin embargo, el principal inconveniente en el uso de estas moléculas como agentes terapéuticos ha sido que sólo algunos han sido efectivos en modelos animales y empleando altas concentraciones causando toxicidad; y aunque la actividad en membranas eucariotas es mucho menor que en procariontes, es importante determinar los posibles efectos adversos que los PAMs puedan inducir (Eisenberg, 1984, Gordon et al., 2005). Es por lo anterior que existen algunos parámetros relacionados con la seguridad en la implementación clínica de los PAMs, que es importante tener en cuenta como lo es la toxicidad; esta, puede ocurrir a diferentes niveles: en la membrana, en la célula y toxicidad sistémica. La selectividad de la membrana es un parámetro que se utiliza para caracterizar la toxicidad de la membrana *in vitro* y se define por la proporción de HC50/MIC, donde HC50 es la concentración necesaria para causar una hemólisis del 50% en los glóbulos rojos humanos (Zelezetsky & Tossi, 2006).

La carga de las membranas bacterianas en comparación con las de las células humanas difieren debido a la complejidad y composición, de modo que los PAMs con cargas positivas muestran una mayor interacción por la membrana bacteriana, lo que resulta en una mayor actividad hacia los microorganismos, y por tanto menor toxicidad en las células eucariotas. (Gordon, et al., 2005). También se propone que la hidrofobicidad de los PAMs puede estar relacionado con su efecto sobre la membrana de las células humanas. El daño celular y la toxicidad sistémica son más difíciles de predecir ya que los mecanismos subyacentes son complejos. La toxicidad celular se refiere a la toxicidad de una sola célula, que se puede medir en células humanas a través de ensayos como MTT, liberación de LDH y síntesis de ATP (Fotakis y Timbrell, 2006). La toxicidad sistémica puede deberse a diversos efectos, como la activación de los factores de transcripción, la alteración de las vías metabólicas y la activación de la respuesta inmune, lo que dificulta la predicción de la actividad de los PAMs. Por ejemplo, la Polimixina B un antibiótico de tipo lipopéptido, es el último recurso para el tratamiento de bacterias Gram negativas multirresistentes, y aunque es seguro a nivel de membrana, puede causar nefro y neurotoxicidad importantes en los pacientes (Falagas y Kasiakou, 2006).

2.6. Uso de modelos lipídicos en el estudio de interacciones péptido-lípido

Las membranas biológicas son estructuras complejas desde el punto de vista de su composición, son consideradas matrices dinámicas capaces de mediar y modular los cambios de conformación, señalización, y reconocimiento de múltiples receptores con actividad fisiológica. Debido a que desempeñan un papel fundamental en los organismos, se han creado modelos sintéticos basados en la estructura de la bicapa lipídica (Chan & Boxer,

2008), pero simplificando la composición con el objetivo de evaluar el efecto de agentes exógenos sobre la estructura de la membrana. Uno de estos agentes son los PAMs, dado que la membrana celular es considerada su blanco de acción, ya sea como objetivo principal de su actividad antimicrobiana o permitiendo la entrada para atacar otros blancos celulares como el DNA y el RNA (Teixeira et al., 2012).

Las membranas de células procariotas y eucariotas difieren considerablemente en la composición lipídica y este aspecto es particularmente importante para la acción de los PAMs, ya que se cree que es la base molecular que explica la especificidad de los péptidos hacia las membranas bacterianas (Travkova et al., 2017). Teniendo en cuenta la diferencia en la composición, se pueden simular a través de sistemas lipídicos sintéticos modelos más representativos, como medio para obtener información relevante sobre la acción de los péptidos antimicrobianos, las interacciones que establecen y su efecto sobre la estructura y el correcto funcionamiento de la membrana bacteriana. Este tipo de sistemas sintéticos permite controlar variables como el pH, la composición y la fuerza iónica y su relación con el comportamiento del sistema (Navas et al., 2005). En las bacterias Gram negativas como es el caso de *E. coli*, la fosfatidiletanolamina (PE) es el fosfolípido más abundante a nivel de membrana, por lo que se usa comúnmente en modelos lipídicos en muchos estudios biofísicos (Leite et al., 2015). Otros lípidos como el fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilserina (PS) presentan una carga neta negativa a pH fisiológico y son abundantes en las membranas de patógenos bacterianos. Estos lípidos se usan comúnmente en modelos de membranas de bacterias y hongos (Nowotarska et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial uso de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ para la eliminación de cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad antimicrobiana y la concentración inhibitoria mínima de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en cepas de *E. coli* productoras BLEE.
- Determinar el porcentaje de citotoxicidad de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en eritrocitos humanos.
- Estudiar las interacciones entre los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ y los lípidos de la membrana de *E. coli*.
- Determinar cualitativamente el daño producido por los péptidos en la membrana de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas *E. coli* BLEE (HD7, HD8, HD11 y BK43028) con caracterización fenotípica y genotípica. Estas cepas son sensibles a cefamicinas, carbapenémicos e inhibidores de β -lactamasas, resistentes a penicilinas cefalosporinas hasta de cuarta generación y a monobactámicos. Como control del experimento se usó la cepa de *E. coli* ATCC 25922, la cual es sensible a todos los antibióticos betalactámicos. Estas cepas se obtuvieron del banco de cepas del Grupo de Investigación de Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA) de la Escuela de Microbiología, de la Universidad de Antioquia.

Tabla 2. Perfil de Resistencia de las cepas de *E. coli* BLEE.

HD7	HD8	HD11	BK43028
BLEE TEM	BLEE SVH	BLEE TEM	BLEE TEM

4.2 Péptidos Sintéticos

Diseño y síntesis de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$

El diseño de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ fue realizado por los profesores Marcela Manrique Moreno y Edwin Patiño González del Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas, previo al desarrollo de esta tesis. Para el diseño se utilizaron los recursos informáticos en línea RZ LAB (<http://rzlab.ucr.edu/> y <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>) y Predict protein (PP, <http://www.predictprotein.org/>), y se tuvieron en cuenta parámetros estructurales de longitud, carga e hidrofobicidad. Los dos péptidos tienen 20 residuos, son catiónicos y con un porcentaje de hidrofobicidad cercano al 50%, ver tabla 3. Los péptidos fueron

sintetizados por GenScript, utilizando la técnica de síntesis en fase sólida, en un sintetizador automático, la desprotección se realizó utilizando 2 porciones de 3 ml de DMF (dimetilformamida) durante 1 min cada una, continuando con 3 ml de piperidina en DMF durante 15 min y el desacople se hizo con el uso de una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)/agua (8,5/1,5; v/v) a temperatura ambiente. Después de desacoplar el producto de la resina se purificó utilizando HPLC preparativo en gradiente (0.1 % TFA)-acetonitrilo, (10-50 % acetonitrilo durante 40 min) y el éxito de la síntesis se confirmó utilizando HPLC acoplado a masas mediante una columna RP-C18 y la técnica MALDI TOF-MS.

Tabla 3. Características de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$.

Péptido	Secuencia	Carga	Hidrofobicidad
$\Delta M3$	NFFKRIRRAGKRIRKAIISA	+8	45%
$\Delta M4$	NFFKRIRRAWKRIWKWIYSA	+7	50%

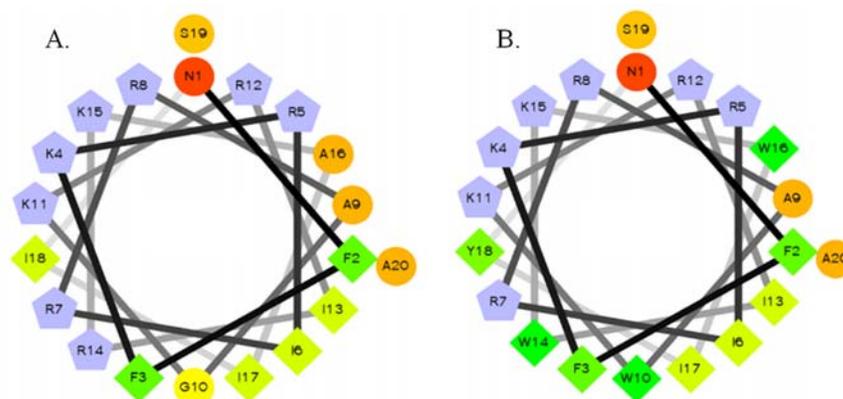


Figura 3. Diagrama de ruedas de los péptidos A) $\Delta M3$ y B) $\Delta M4$. Los residuos hidrofóbicos están representados desde el color verde (más hidrofóbico) hasta el amarillo (cero hidrofobicidad); los residuos cargados en color azul (cargados negativamente rombos, y pentágonos positivamente) y los círculos rojos son residuos hidrofílicos.

4.3 Determinación de la Actividad Antimicrobiana

La evaluación de la capacidad antimicrobiana de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ se llevó a cabo adaptando los protocolos establecidos por el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (Cavalier et al., 2005). Con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de microdilución en placa, las cepas de *E. coli* se sembraron por aislamiento en agar nutritivo (*Merck Millipore*) y se dejaron en incubación a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron de 3 a 5 colonias en caldo Mueller Hinton ajustado de cationes (*Merck Millipore*), para formar una suspensión a 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/ml). Seguido de esto, se hizo una dilución 1:100 para obtener un inóculo bacteriano de 1×10^5 UFC/ml. Finalmente, se tomaron 50 μ L de suspensión bacteriana de cada cepa y se depositaron en un plato de ELISA de polipropileno de 96 pozos, a estas se les añadió 50 μ l de la solución de cada péptido diluido en PBS a 40, 20, 10, 5, 2,5 1.25, 0,625 y 0,312 μ M. Como control positivo se usó el antibiótico Meropenem a una concentración de 2 μ g/ml y como control negativo se usó PBS. La lectura de los platos se hizo durante 24 horas a 37 °C en el espectrofotómetro para microplacas Multiskan (*Thermo Fisher Scientific*). Para garantizar la reproducibilidad del ensayo, se realizaron tres experimentos independientes para cada cepa con cada péptido a las concentraciones anteriormente mencionadas.

La determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) se hizo con el fin de determinar la concentración mínima de péptido que causaba la muerte de 99 % de las cepas de *E. coli*. Para esto se tomaron 20 μ L de los pozos donde no se evidenció crecimiento bacteriano en la técnica de microdilución en placa, se sembraron por aislamiento en agar

nutritivo y se dejaron incubando a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se procedió a hacer el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

4.3.1 Análisis Estadístico

La evaluación de las variables de concentración de los péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ y el crecimiento microbiano en la prueba para determinar CIM se realizó a través de la prueba estadística *U de Mann Whitney*. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS, versión 21 para Windows (*SPSS, IBM Corporation, 2012*).

4.4 Análisis de Citotoxicidad

Se tomaron muestras de eritrocitos humanos de tres donantes sanos sin terapia antibiótica o farmacológica previa, las muestras fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 2700 g por minuto, el sobrenadante fue descartado y se repitió el procedimiento tres veces, el pellet se resuspendió en PBS. Posteriormente, se tomaron 90 μL de cada muestra y se depositaron en un plato de ELISA de polipropileno de 96 pozos, a estos se adicionó 10 μl de la solución de péptido a las siguientes concentraciones 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 μM . Como controles positivo y negativo se usó Tritón x-100 al 0,1% y PBS, respectivamente. Las muestras se incubaron una hora a 37°C en agitación a 100 rpm; pasado el tiempo de incubación se procedió a centrifugarlas a 1000 g durante un minuto, finalmente se determinó la hemoglobina liberada midiendo la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro para microplacas Multiskan (*Thermo Fisher Scientific*). La concentración hemolítica mínima (CEM) es la concentración a la que los péptidos generaron 5% o más de hemolisis. El porcentaje de hemolisis se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{(\text{Abs mtras con péptido} - \text{Abs del control negativo})}{(\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo})}$$

4.5 Análisis por Espectroscopia Infrarroja

Los experimentos de transiciones de fase por espectroscopia infrarroja se realizaron en un equipo Tensor II de Bruker acoplado a una celda AquaSpec (*Bruker Optics, Alemania*) de fluoruro de calcio (CaF₂) con control de temperatura. El equipo estaba equipado con un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido y purga de aire 4.7 grado FID. Las muestras de los lípidos fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina (POPG:POPE); relación molar 30:70) se analizaron a una concentración de 30 mM. Para esto, se preparó una solución stock a 40 mM de los lípidos en 500 µL de cloroformo (CHCl₃), de esta solución se tomaron 50 µL y se le agregaron 25 µL de cloroformo, posteriormente el solvente se evaporará con nitrógeno gaseoso con el fin de formar una película de los lípidos a la pared del tubo. Seguido de esto, se agregaron 100 µL de Buffer HEPES 10 mM a pH 7.4 y se les añadió el péptido a diferentes concentraciones (1%, 5% y 10%). Finalmente, las muestras fueron sometidas a ciclos en calentamiento y enfriamiento así, se sonicaban e incubaban durante 45 minutos a 37°C, posterior a la sonicación se sometieron a enfriamiento a 4°C y este proceso se repitió tres veces. Las muestras fueron analizadas entre 3-37 °C, para cada grado de temperatura se registró un espectro con 64 scans y una resolución menor a 4 cm⁻¹. A todas las muestras se les realizó la substracción automática del *background* en el mismo rango de temperatura. Para el registro de los datos se analizó la vibración simétrica de la banda CH₂ en la ventana espectral de 2970–2820 cm⁻¹, para esto cada espectro fue cortado en este rango, se realizó una corrección de línea base y se asignó el máximo utilizando el programa OPUS (*Bruker*

Optics, Alemania). Los valores obtenidos de cada espectro se graficaron en función de la temperatura.

4.6 Ensayos de Permeabilidad de la Membrana Microbiana

Con el fin de determinar el daño causado en la membrana de las cepas de *E. coli* por acción de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ se empleó la técnica de microscopia de fluorescencia, utilizando el colorante SYTOX® Green que es internalizado en la bacteria cuando existe un daño en la membrana. Para esto se tomaron de tres a cinco colonias de cada cepa de *E. coli*, se resuspendieron en caldo tripticasa soya (*Merck Millipore*) y se dejaron en agitación durante 18 horas a 37 °C. Posteriormente, se tomaron 300 μL del inóculo bacteriano y se centrifugaron a 5000 g durante dos minutos, el sobrenadante fue descartado y se resuspendió en 300 μL de agua desionizada estéril. Seguido de esto, se agregaron 5 μL de la solución de SYTOX® Green (5 μM) y 20 μl de la solución de cada péptido a las siguientes concentraciones 1.25, 2,5 y 5 μM . las muestras se dejaron en la oscuridad y en incubación durante una hora. Finalmente, las muestras fueron observadas a través del microscopio de fluorescencia invertido (*Axio Observer A1, Carl Zeiss, Alemania*). La adquisición de las señales de fluorescencia se realizó con una lámpara de Mercurio (*HXP 120V, Carl Zeiss, Alemania*), la longitud de onda para estimular las células con el colorante se seleccionó empleando un juego de filtros para excitar el indicador entre 450 y 490 nm y recoger la emisión superior a 515 nm.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de la Actividad Antimicrobiana

Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima, definida como la mínima concentración evaluada de péptido capaz de inhibir el crecimiento visible de las diferentes cepas de *E. coli* a través de la técnica de microdilución en placa. La tabla 4, resume los resultados obtenidos con los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$, se puede observar que tienen actividad antimicrobiana a bajas concentraciones. $\Delta M3$ tiene una CIM de 2,5 μM , independiente de la cepa evaluada, por su parte $\Delta M4$ presenta una CIM de 5 μM para cuatro de las cepas evaluadas y un menor valor para la cepa sensible.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en cepas de *E coli* productoras de BLEE.

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (CMI) / μM	
	$\Delta M3$	$\Delta M4$
<i>E. coli</i> HD7	2,5	5
<i>E. coli</i> HD8	2,5	5
<i>E. coli</i> HD11	2,5	5
<i>E. coli</i> BK43028	2,5	5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,5	2

La CBM, definida como la mínima concentración de péptido evaluada capaz de matar el 99 % de las cepas de *E. coli*, fue de 10 μM para todas las cepas, cuatro y dos veces por encima del valor de la CIM. El control positivo usado fue el antibiótico betalactámico Meropenem, este al ser de tipo carbapenémico, tiene acción antimicrobiana *in vitro* sobre bacterias Gram negativas productoras de BLEE, el control negativo empleado fue PBS dado que en este se realizó la solución de los péptidos sintéticos.

En la figura 5 se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones más bajas de los péptidos (0.325, 0.625 y 1.25 μM) y las concentraciones más altas (2.5, 5, 10, 20, y 40 μM), lo que sugiere que la actividad de estos péptidos es dependiente de la concentración, ya que a bajas concentraciones los péptidos no inhiben el crecimiento de las bacterias. Al comparar el resultado del control negativo si se evidencia una reducción en el tamaño del inoculo. Los resultados muestran también que existe diferencia entre la actividad de los péptidos ΔM3 y ΔM4 , siendo el primero el péptido que mostró mayor actividad antimicrobiana en todas las cepas. Adicionalmente, no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la actividad de los péptidos sobre las diferentes cepas de *E. coli* evaluadas, lo que sugiere que el mecanismo de resistencia BLEE no afecta el mecanismo de acción de los péptidos.

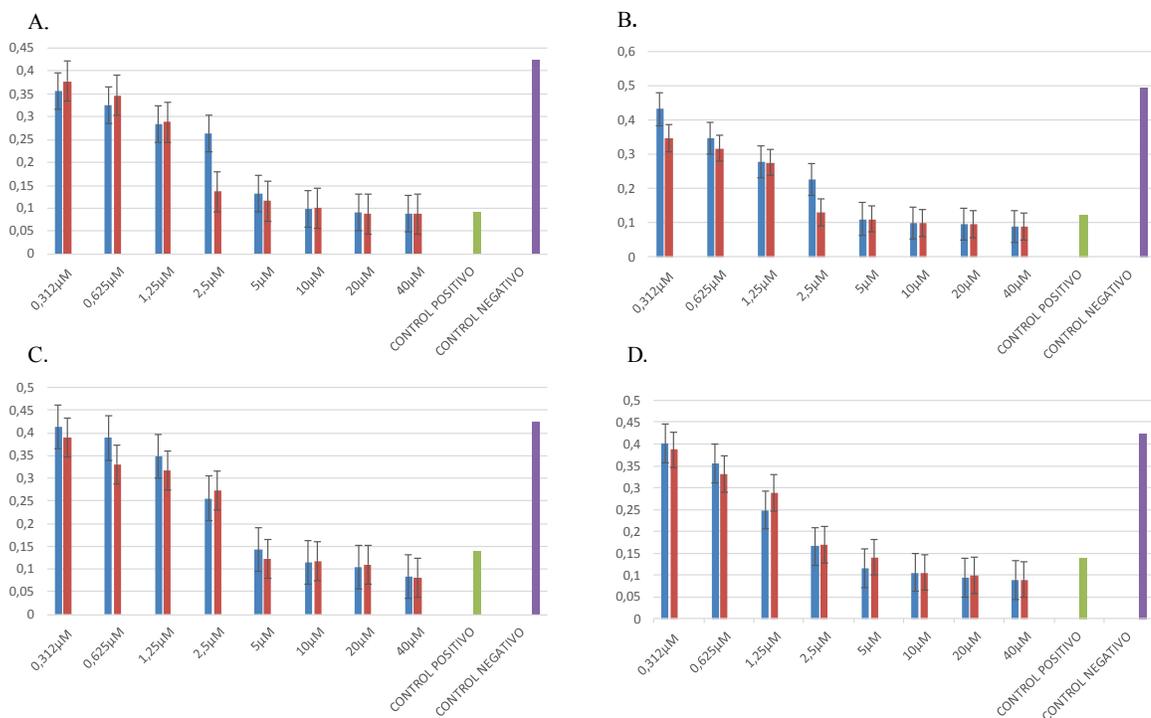


Figura 5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los PAMs ΔM3 y ΔM4 . A) *E. coli* HD7, B) *E. coli* HD8 C) *E. coli* HD11 y D) *E. coli* BK43028.

Se grafica absorbancia en DO vs las concentraciones evaluadas de péptido. La barra azul corresponde a $\Delta M4$, la barra roja a $\Delta M3$. La barra morada corresponde al control positivo (Meropenem) y la barra verde al control negativo (PBS).

5.2 Análisis de Citotoxicidad

Se determinó la actividad hemolítica de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en eritrocitos humanos a las mismas concentraciones utilizadas para determinar la CIM en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE. El porcentaje de hemólisis a la menor concentración evaluada de $\Delta M3$ (1,25 μM) fue de $0.2\% \pm 0.1$. Para la concentración equivalente a la CIM (2.5 μM) fue de $0.3\% \pm 0,1$ y a la máxima concentración (40 μM) fue de $12,3\% \pm 7$. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 5, donde se evidencia que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas del péptido $\Delta M3$. Estos resultados muestran que el péptido tiene un porcentaje de hemólisis bajo y que por tanto cumple con las condiciones para ser usado en estudios posteriores *in vivo*.

Tabla 5. Evaluación de la Actividad hemolítica de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ en eritrocitos humanos.

μM	% de Hemólisis $\Delta M3$	% de Hemólisis $\Delta M4$
40	12,3% (± 7)	76% (± 16)
20	5.0% ($\pm 2,5$)	47% (± 9)
10	2,1% ($\pm 1,3$)	18,2% (± 8)
5	0,4% ($\pm 0,1$)	7% ($\pm 0,3$)
2,5	0,3% ($\pm 0,1$)	3,1% ($\pm 1,8$)
1,25	0,2% ($\pm 0,1$)	2,1% ($\pm 1,1$)
Control positivo	98% ($\pm 0,1$)	98% ($\pm 0,1$)
Control negativo	0,2% ($\pm 0,1$)	0,2% ($\pm 0,1$)

Los resultados de la evaluación de la citotoxicidad para $\Delta M4$ se encuentran resumidos en la tabla 5. Los resultados evidencian que, aunque este péptido tiene potencial actividad

antimicrobiana, induce una mayor citotoxicidad en comparación con $\Delta M3$. El análisis de los resultados muestra que a la concentración más baja evaluada del péptido ($1,25 \mu\text{M}$) el porcentaje de hemólisis fue de $2,1\% \pm 1,1$. Para la concentración equivalente a la CIM fue de $7\% \pm 0,3$ y a la máxima concentración evaluada fue de $76\% \pm 16$. El análisis estadístico revela que existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de $\Delta M4$. El control positivo para estos experimentos fue Tritón X-100 al $0,1\%$. A esta concentración se indujo una actividad hemolítica equivalente al 100% . Como control negativo se usó PBS, durante los experimentos este indujo un $0,2\%$ de hemólisis espontánea debida a la manipulación de las muestras.

5.3 Análisis por Espectroscopia Infrarroja

El análisis de la vibración simétrica de la banda $\nu_s\text{CH}_2$ en función de la temperatura, es un reconocido parámetro asociado al orden y empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los liposomas (Mantsch & McElhaney, 1991). El máximo de la vibración simétrica CH_2 tiene valores diferentes en función de la temperatura. En la fase gel (baja temperatura) la banda $\nu_s\text{CH}_2$ tiene un máximo a 2850 cm^{-1} y en la fase de cristal-líquido (por encima de la temperatura de transición) tiene un máximo en $2852\text{-}2853 \text{ cm}^{-1}$. La temperatura de transición (T_m) de cada fosfolípido depende de la longitud de las cadenas acílicas (Gauger et al., 2001) y de la estructura del cabeza polar del lípido (Domingo et al., 1994).

La figura 6, muestra la dependencia del número de onda de los grupos metilenos en función de la temperatura para el sistema lipídico representativo de la membrana de *E. coli* POPG:POPE y para las mezclas de POPG:POPE en presencia de diferentes proporciones

molares del péptido $\Delta M3$. Para el caso de los lípidos puros POPE y POPG las T_m son de 25 y -2°C , respectivamente. Sin embargo, cuando los lípidos están en una proporción 70:30, representativo de la membrana de *E. coli*, la mezcla tiene una T_m de 13.5°C . Este valor corresponde al punto de inflexión de la curva obtenido del análisis de la transición de fase en ausencia de péptido.

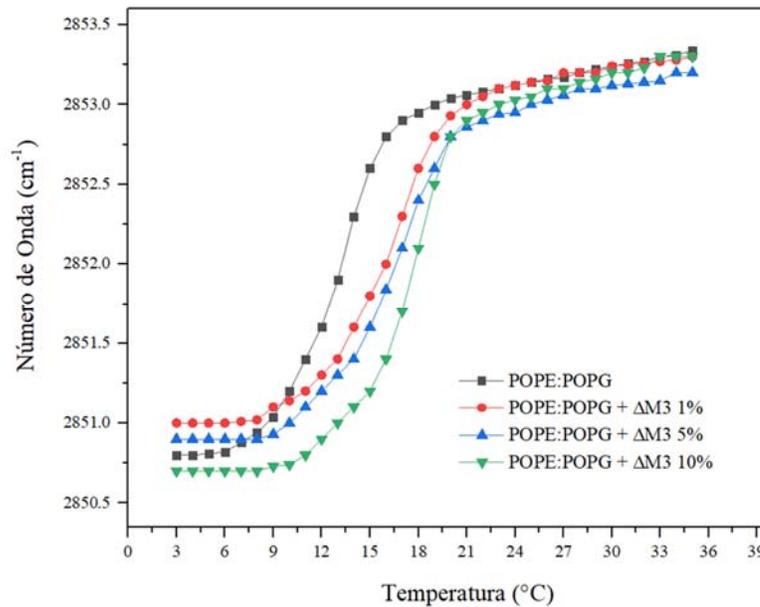


Figura 6. Cambio de transición de fase de los lípidos más representativo de *E. coli* con el péptido $\Delta M3$.

El análisis de los resultados muestra que a medida que incrementa la concentración del péptido $\Delta M3$, se induce un aumento de la temperatura de transición de los liposomas. A la proporción más baja de $\Delta M3$ (1%) se da un corrimiento de 3°C en la temperatura de transición, a proporciones superiores de 5 y 10% del péptido se observa una T_m de 16°C y 17°C , respectivamente. Para el caso de $\Delta M4$ los resultados no fueron reproducibles y por lo tanto no fueron concluyentes.

5.4 Permeabilidad de la Membrana Microbiana

Con el fin de determinar si los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$, ejercen un efecto permeabilizante sobre la membrana bacteriana; se sometieron las cepas de *E. coli* productoras de BLEE a diferentes concentraciones de péptido en las que se evidenció actividad bactericida. Para lograr este objetivo se seleccionó el colorante SYTOX® Green, este colorante tiene la capacidad de unirse al DNA de las células bacterianas y emitir fluorescencia al ser excitado a la longitud de onda adecuada (color verde entre 450 y 490 nm) siempre y cuando exista una disrupción en la membrana bacteriana; de lo contrario no se registra fluorescencia.

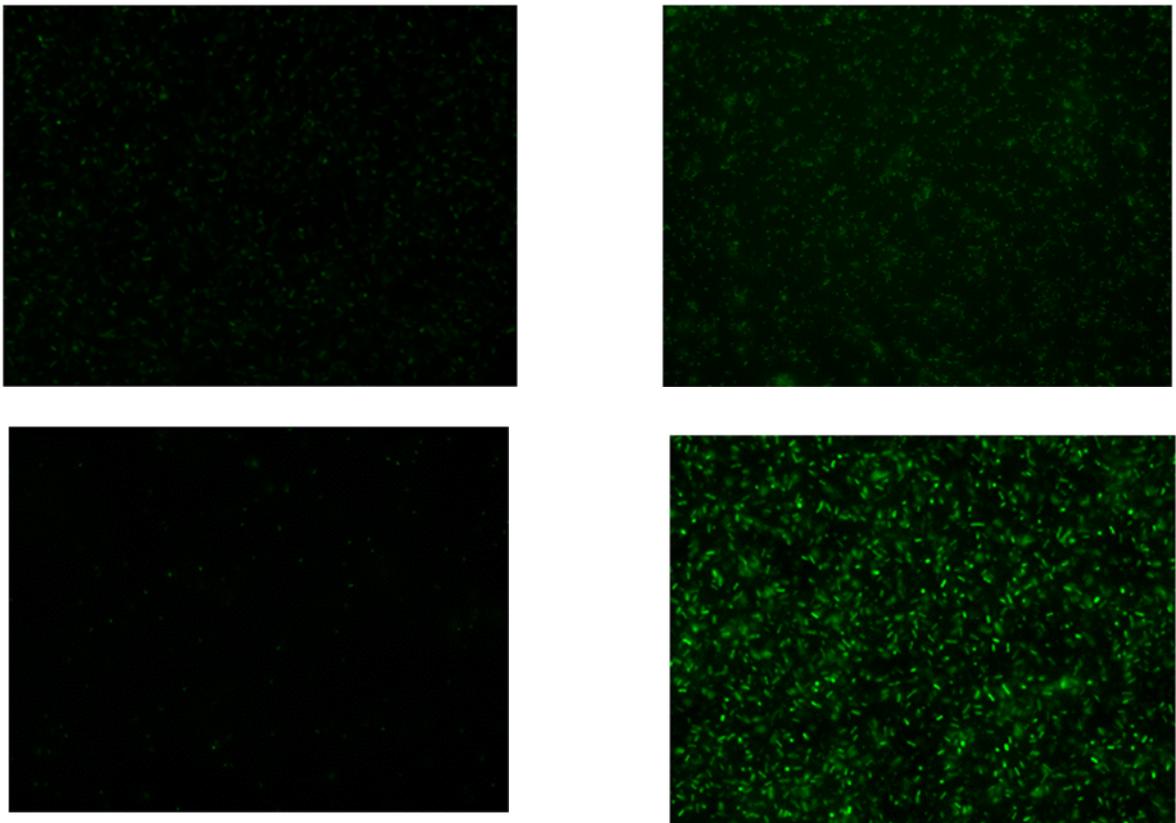


Figura 7. Microscopia de fluorescencia en E. coli BLEE con SYTOX Green, se observa la acción del péptido $\Delta M3$ sobre la membrana bacteriana en 1,25 μM (arriba izquierda), 2,5 μM (arriba derecha), 5 μM (abajo derecha) y el control negativo (abajo izquierda)

El daño en la membrana bacteriana de todas las cepas de *E. coli* BLEE evaluadas en este ensayo por acción de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ logró evidenciarse de forma cualitativa a través de esta técnica. Las figuras 7 y 8 muestran la fluorescencia registrada a las diferentes concentraciones de péptido evaluadas en una resolución de 40 x, en comparación con el control negativo. Los dos péptidos mostraron resultados similares a las mismas concentraciones, lo que sugiere que ambos péptidos ejercen su actividad antibacteriana a nivel de la membrana de la bacteria.

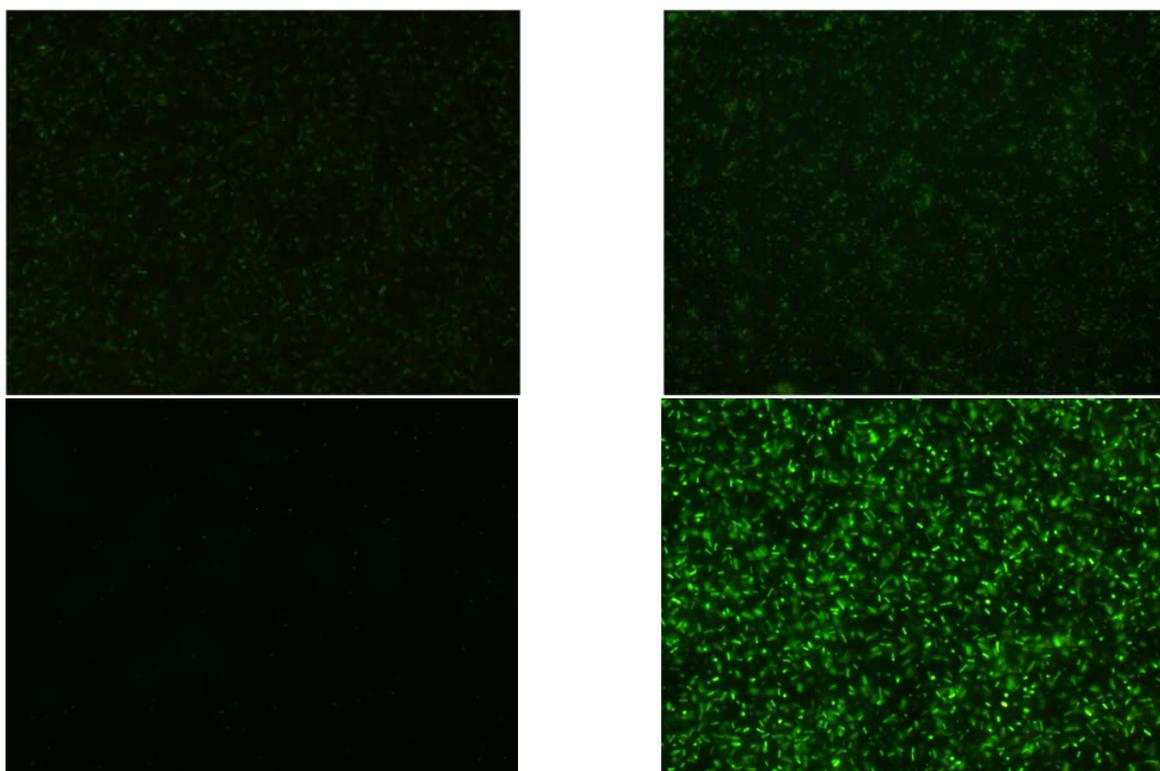


Figura 8. Microscopia de fluorescencia en E. coli BLEE con SYTOX Green en 40x, se observa la acción del péptido $\Delta M4$ sobre la membrana bacteriana en 1,25 μM (arriba izquierda), 2,5 μM (arriba derecha), 5 μM (abajo derecha) y el control negativo (abajo izquierda)

6. DISCUSIÓN

En la última década se ha acentuado la proliferación de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos betalactámicos, esta problemática viene asociada a una reducción en la evaluación y aprobación para el uso clínico de nuevos antibióticos. Se prevé que en un futuro cercano, la combinación de estos dos factores conlleve tanto a una crisis intra como extra hospitalaria, no solo en Colombia sino también a nivel mundial (Jindal et al., 2015). La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos ha centrado su atención en los PAMs, debido a que estas moléculas ejercen su actividad antibacteriana a través de un mecanismo de acción que compromete la estabilidad de la membrana de los patógenos (Jindal et al., 2015).

Diferentes compañías farmacéuticas han desarrollado medicamentos a partir de investigaciones con péptidos modificados, lo que demuestra el potencial de estos compuestos. Algunos de estos péptidos han llegado a fase II y III de estudios clínicos, con el objetivo de ser utilizados de forma tópica o intravenosa para el tratamiento de infecciones localizadas o sistémicas. Este es el caso del hLF-1-11(AM-Pharma), péptido derivado de la lactoferrina utilizado para tratar las infecciones asociadas a los trasplantes; el PAC113, es un péptido basado en la histatina 5 (PacGen) de la saliva humana y utilizado para el tratamiento de la candidiasis oral y el péptido Mersacidina (Novacta Biosystems Ltd) derivada de la bacteriocina y utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas. Incluso a nivel de cáncer, uno de los ejemplos más exitosos es el péptido sintético LTX-315 (Lytix Biopharma), conocido por su nombre comercial como Oncopore™. Este péptido ha demostrado ser eficaz en la eliminación de células tumorales (melanoma humano) y presenta una baja citotoxicidad en eritrocitos humanos. Los resultados de los experimentos

in vivo han demostrado que el 80% de los animales tratados con LTX-315, presentan una regresión en el tamaño del tumor tratado (Camilio et al., 2017), actualmente se considera un tratamiento alternativo para el melanoma.

Uno de los casos más importantes de PAMs de uso clínico contra bacterias Gram positivas lo constituye la Daptomicina, antibiótico de última generación y de gran efectividad aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA). Este péptido antimicrobiano se emplea actualmente como última alternativa en el tratamiento de infecciones complejas de la piel causadas por microorganismos como *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus dysgalactiae* subespecies *Equismillis* y *Enterococcus faecalis* (sólo cepas resistentes a vancomicina) (González et al., 2011).

La realización de este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar dos nuevos péptidos sintéticos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ y determinar su potencial biológico en cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Este microorganismo está asociado a infecciones comunitarias y nosocomiales graves causando millones de muertes y enfermedades en todo el mundo (Iredell et al., 2016). Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los dos nuevos péptidos, demuestran que son activos frente a cepas de *E. coli* productoras de BLEE; con una CIM de 2,5 y 5 μM para $\Delta M3$ y $\Delta M4$, respectivamente. Desde el punto de vista estructural los dos péptidos tienen el mismo tamaño, pero difieren en los parámetros de carga e hidrofobicidad. El péptido $\Delta M3$ tiene una carga de +8 con una hidrofobicidad del 45%, mientras que $\Delta M4$ tiene una carga de +7 y un porcentaje de hidrofobicidad del 50%.

Numerosos estudios han demostrado que la presencia de cargas positivas y una porción considerable de residuos hidrofóbicos son dos factores relacionados con péptidos biológicamente activos, permitiendo una adecuada interacción electrostática entre el péptido y los grupos cargados negativamente de la membrana bacteriana (Datta et al., 2016). También se ha demostrado, que el incremento gradual de la carga de los péptidos está asociado en algunos casos a un incremento de la actividad antibacteriana contra los patógenos Gram negativos y Gram positivos (Travkova et al., 2017, Dathe et al., 2001).

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana muestran que el péptido $\Delta M3$ con carga +8 es más activo que el péptido $\Delta M4$ de carga +7. Si bien el análisis estadístico no arroja diferencias significativas entre las CIM de los péptidos, es evidente que se necesita la mitad de la concentración de $\Delta M3$ para inhibir el crecimiento de las bacterias de *E. coli* a comparación de $\Delta M4$. Adicionalmente, el hecho más relevante es que los péptidos tengan el mismo valor de CIM independiente de la cepa evaluada. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Ebbensgaard et al., 2015 en el que se concluyó que algunos de sus péptidos evaluados (Cap11-1, Cecropin B, e Indolicin) con cargas entre +3 y +9 mostraron la misma CIM (16 $\mu\text{g/ml}$), en diferentes cepas de *E. coli*. Así mismo, Fields et al., 2018 evaluó varios péptidos sintéticos (90, 91, 94 y 96) derivados del péptido Syn-safencin; con actividad antimicrobiana en cepas de *E. coli*, obteniendo para todos estos una CIM de 2 μM .

Así mismo, se ha descrito que en algunos péptidos valores de hidrofobicidad cercanos o superiores al 50% están relacionados con actividades hemolíticas altas y una pérdida de actividad antimicrobiana (Travkova et al., 2017, Dathe et al., 2001). En los resultados

obtenidos de la evaluación de la actividad hemolítica de los péptidos, se puede observar que el péptido con un mayor porcentaje de hidrofobicidad fue el más hemolítico ($\Delta M4$). La diferencia de los porcentajes de hemólisis observados, a diferencia de las CIM, son aproximadamente diez veces más para $\Delta M4$ en comparación con $\Delta M3$.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se emplean en la práctica clínica algunos antibióticos de tipo peptídico como la Polimixina B, usado como última opción en tratamientos de infecciones causadas por patógenos Gram negativos multiresistentes, pero con notables efectos colaterales para los pacientes (Simar, et al., 2017). Este antibiótico al igual que la mayoría de PAMs comparten el mismo mecanismo de acción, causando alteración en la membrana y posteriormente la lisis del microorganismo (Travkova et al., 2017). Según el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) la Polimixina B tiene una CIM de 2 $\mu\text{g/ml}$ (CLSI M100-21, 2015). Teniendo en cuenta estos datos, los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ obtuvieron en este estudio unas CIMs (6 $\mu\text{g/ml}$ y 12 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) mayores a la reportada para este antibiótico. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, el péptido $\Delta M3$ mostró mejores características de eficacia y seguridad, ya que la CEM fue de 5 μM lo que lo cataloga como un péptido con potenciales características terapéuticas y óptimo para ensayos futuros en animales y posteriormente en ensayos clínicos controlados. Esto significa que el péptido $\Delta M3$ podría a futuro convertirse en una potencial alternativa terapéutica viable que permita contrarrestar el efecto de la resistencia en bacterias Gram negativas principalmente.

No obstante, el péptido $\Delta M4$ obtuvo de una CEM de 20 μM , esto podría estar relacionado con el hecho de que este péptido tiene un porcentaje de hidrofobicidad mayor al de $\Delta M3$.

Varios estudios han descrito que la hidrofobicidad es un factor relacionado directamente con la citotoxicidad (van der Weide et al., 2017, Travkova et al., 2017), debido a que es una característica indispensable para que el PAM pueda permeabilizar la membrana de forma efectiva al interactuar los residuos hidrofóbicos del péptido con la región hidrofóbica de la membrana; por lo tanto, en la medida que se aumenta el porcentaje de hidrofobicidad también se aumenta la afinidad por las células eucariotas, aumentando así la toxicidad celular (Yeaman & Yount, 2003).

En un estudio realizado por Wieprecht et al., 1997, al modificar el porcentaje de hidrofobicidad de varios PAMs derivados de la Magainina, se observó que el péptido más hidrofóbico tuvo una actividad 60 veces más permeabilizante en liposomas compuestos por PC:PG (fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol) en comparación con el PAM menos hidrofóbico.

Teniendo en cuenta los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos mencionados en la introducción (Tang et al., 2014), es importante resaltar que las cepas utilizadas en este trabajo de investigación tienen un mecanismo de resistencia enzimático (BLEE) que las hace resistentes a penicilinas y cefalosporinas hasta de cuarta generación. Dicho mecanismo se basa en la capacidad inducir la ruptura del anillo betalactámico de estos antibióticos, esto podría estar relacionado con el hecho de que no hubo diferencias significativas entre los resultados de las CIMs de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ con las cepas productoras de BLEE y la cepa ATCC de control. En un estudio realizado en el 2016 por Chou y colaboradores, se evaluaron diferentes péptidos catiónicos, en cepas de bacterias Gram negativas y Gram positivas como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* MRSA, con diferentes perfiles de resistencia (BLEE y MRSA), concluyendo que no hay diferencias

significativas en cuanto a la actividad antimicrobiana, mostrando CIMs similares (entre 2 y 4 μM). Esta evidencia sugiere, que el mecanismo de acción por el cual los péptidos ejercen su actividad antimicrobiana, no es afectado por el mecanismo de resistencia expresado en estas cepas y que, por lo tanto, las enzimas BLEE no tienen la capacidad de hidrolizar los PAMs. Dichos resultados permiten catalogar de forma preliminar a ΔM3 y ΔM4 como una estrategia promisorio futura en el tratamiento de las infecciones causadas no solo por *E. coli*, sino también por numerosos microorganismos multidrogosresistentes y potencialmente peligrosos.

De acuerdo a esto, es importante mencionar que se han descrito algunos mecanismos de resistencia a los PAMs, donde la bacteria a través de la adquisición de genes de resistencia es capaz de modificar la carga y la fluidez de la membrana evitando así que los PAMs puedan unirse a la misma; así como la producción de proteasas como y algunos transportadores transmembranas capaces de bombear el péptido fuera de la bacteria (Nizet, 2006). Diferentes investigaciones demuestran cómo estas proteasas extracelulares son mediadores claves en la virulencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus* (Kolar et al., 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que este no es el caso, ya que para los péptidos evaluados se obtuvieron valores de CIM bajos, lo que sugiere que las cepas de *E. coli* evaluadas en este trabajo son inhibidas en presencia de estos péptidos.

En cuanto al mecanismo de acción de los PAMs cabe resaltar, que de los actualmente descritos en la literatura, muchos comparten como etapa inicial, la interacción electrostática entre los aminoácidos cargados positivamente de los péptidos y los grupos aniónicos presentes en la región hidrofílica de la membrana polianiónica de las bacterias (Mahlapuu et

al., 2016). En estas membranas los fosfolípidos tienen grupos fosfato cargados negativamente que pueden formar puentes salinos con cationes divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} , lo que da como resultado una red electrostática (Nikaido, 2003). Esta región electrostática sirve como una barrera primaria para la mayoría de los antibióticos hidrofóbicos, lo que resulta en una baja permeabilidad de la membrana bacteriana (Ahn et al., 2006). Sin embargo, es importante tener en cuenta que se ha demostrado que los PAMs tienen mecanismos moleculares relacionados con la inhibición de la síntesis de DNA y proteínas, así como la inhibición de chaperonas y alteración mitocondrial (Li et al., 2017). En este sentido, los resultados obtenidos con la técnica de microscopia de fluorescencia demuestran que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE evaluadas tuvieron alteración de la membrana celular al ser sometidas a diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos ΔM3 y ΔM4 . Esto se evidencia en el sentido de que el colorante Sytox® GREEN es interiorizado en la bacteria únicamente cuando existe una disrupción en la membrana, uniéndose posteriormente al DNA. En los ensayos realizados de permeabilidad de la membrana bacteriana se comprobó, que los péptidos ΔM3 y ΔM4 inducen la interiorización del colorante fluorescente Sytox GREEN desde el momento que entraron en contacto con las células bacterianas. Esto demuestra una alta y rápida eficacia en la actividad antimicrobiana, que les confiere una ventaja adicional, ya que los péptidos están menos tiempo en el espacio extracelular y por lo tanto menos expuestos a la acción de las proteasas. No obstante, la emisión de fluorescencia es más evidente en las cepas sometidas a la acción del péptido ΔM3 , lo que se correlaciona con los resultados obtenidos al determinar la CIM, donde ΔM3 mostró una mayor actividad. Así mismo, es importante resaltar que esta técnica es cualitativa, por lo que no es posible determinar de forma cuantitativa los efectos de ΔM3 y ΔM4 . Sin embargo, aunque la

afectación a la membrana es evidente no se puede describir con exactitud los mecanismos por los cuales los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ ejercen su acción antimicrobiana, ya que es no posible dilucidar si aparte de la alteración en la membrana bacteriana, se presentan otros mecanismos asociados. Para esto, sería necesario aplicar técnicas moleculares en estudios posteriores que permitan dilucidar las interacciones de los péptidos y de esta forma entender ampliamente sus mecanismos de acción intracelulares.

Por otro lado, con la técnica de espectroscopia infrarroja se realizó un seguimiento de la interacción de los péptidos con los sistemas lipídicos representativos de la membrana de *E. coli*, en donde es posible monitorear los cambios vibracionales de la banda νCH_2 de los lípidos dentro de la región hidrófoba en función de la temperatura, simulando una membrana bacteriana. La transición de fase de gel a líquido cristalino es un parámetro asociado al orden y empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Mantsch & McElhaney, 1991). Los resultados de este estudio sugieren que el péptido $\Delta M3$ induce cambios en la transición de fase del modelo de membrana sintético, ya que se provoca un cambio en la temperatura de transición (3°C), lo cual coincide con los mecanismos de acción que se han descrito para los PAMs. Varios estudios han utilizado técnicas de espectroscopia infrarroja para investigar el efecto de los PAMs sobre las membranas, demostrando que debido a la interacción de los PAMs con los lípidos de la membrana, se induce un cambio estructural de la bicapa fosfolipídica (Mantsch & McElhaney, 1991). Estos resultados apoyan los resultados obtenidos en este trabajo y se relacionan directamente con los resultados alcanzados con la técnica de microscopia de fluorescencia en donde se logra evidenciar a

través de la emisión de fluorescencia, una alteración considerable de la membrana bacteriana de las cepas de *E. coli* BLEE por acción de los péptidos.

En los últimos años se han realizado varios intentos para desarrollar PAMs como antimicrobianos innovadores y eficaces en el tratamiento de numerosas infecciones. Sin embargo, diseñarlos adecuadamente y sintetizarlos es un proceso difícil y costoso, que requiere la intervención de diferentes actores. Estos factores dificultan el proceso de producción, la realización de ensayos clínicos para su posterior implementación (Gordon et al., 2005), sin dejar de lado las exigentes regulaciones hechas por las autoridades correspondientes, ya que es necesario cumplir con los criterios de calidad y seguridad mínimos para ser llevados a estudios en humanos (Reddy et al., 2004).

Aunque los PAMs prometedores han progresado a los estadios preclínicos y clínicos del desarrollo como alternativas terapéuticas, se requieren más estudios para identificar nuevos PAMs naturales y sintéticos, así como nuevos enfoques para mejorar su actividad y estabilidad para aumentar el rango de actividad. Esta última, es una característica indispensable desde el punto de vista clínico para aplicaciones más amplias en el futuro (Yeaman & Yount, 2003). También se necesitan con urgencia estudios de sinergia con otros antibióticos para descubrir combinaciones exitosas de medicamentos con el fin de garantizar los efectos secundarios mínimos de estos antimicrobianos en cuanto a toxicidad celular. Las plataformas de producción a escala comercial para sintetizar PAMs también son urgentemente necesarias para superar el alto costo de producción, que sigue siendo el principal obstáculo por superar (Pane et al., 2017).

Finalmente, algunas consideraciones acerca de las perspectivas futuras de esta investigación incluyen la posterior evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido $\Delta M3$ en otros microorganismos con diferentes mecanismos de resistencia con el fin de determinar el espectro de acción del mismo. Así mismo es importante avanzar en la determinación exacta de los diferentes mecanismos asociados a la actividad de los PAMs, a través de técnicas moleculares. Así como continuar con el análisis de citotoxicidad en otras líneas celulares que permitan garantizar los criterios de seguridad de los péptidos. En este sentido, se podrían iniciar ensayos *in vivo* con modelos animales y de esta forma evaluar la farmacocinética y farmacodinamia, esto con el fin de iniciar una investigación con estudios de ensayos clínicos posteriores.

Así entonces, los PAMs podrían entrar a la terapéutica por medio de varias estrategias: como monoterapia, para el tratamiento de infecciones o en combinación con los antibióticos convencionales, con el fin de promover un efecto sinérgico o aditivo a estos últimos; como agentes inmunomoduladores que incrementen la inmunidad innata natural, y como agentes neutralizantes de las endotoxinas, con el fin de prevenir complicaciones fatales asociadas con los factores de virulencia que causan el choque séptico en infecciones asociadas principalmente a microorganismo multirresistentes (Téllez & Castaño, 2010).

7. CONCLUSIONES

1. Los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ tienen acción antimicrobiana en cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Sin embargo, su acción antimicrobiana varía en el tiempo debido al tamaño del inóculo bacteriano y a la concentración de péptido usada.
2. El análisis de citotoxicidad permitió determinar que la actividad hemolítica de $\Delta M4$ es mucho mayor que la de $\Delta M3$, lo que sugiere que este último péptido tiene características potenciales para emplearse en ensayos posteriores de estudios *in vivo*.
3. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$ sugieren que la actividad de estos péptidos no está asociado al mecanismo de resistencia reportado para estas cepas, lo que indica que los péptidos ejercen su actividad a través de la interacción con la membrana.
4. El análisis por microscopía de fluorescencia permitió evidenciar el daño en la integridad de la membrana de las cepas de *E. coli* causadas por los péptidos $\Delta M3$ y $\Delta M4$, demostrando así el mecanismo de acción basado en la alteración de la membrana bacteriana.
5. Finalmente, con la técnica de espectroscopia infrarroja se logra evidenciar la interacción del péptido $\Delta M3$ con los lípidos del modelo representativo de la membrana de *E. coli* (fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina), debido a la alteración de la temperatura de transición del sistema sintético.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, hermanos y tío por su apoyo incondicional.

A la profesora Marcela Manrique Moreno Ph, D., por darme la oportunidad de aprender y trabajar en este proyecto.

Al Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas del Instituto de Química de la Universidad de Antioquia por permitirme hacer parte de él.

Al CODI por la financiación del proyecto de investigación titulado Diseño y Evaluación de Péptidos Sintéticos en Cepas de *Escherichia coli* Resistentes a β -Lactámicos (2015-7669).

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, H., Cho, W., Kang, S.-H., Ko, S.-S., Park, M.-S., Cho, H., & Lee, K.-H. (2006). Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of α helical domain of Tenecin 1, an insect defensin protein, and structure–activity relationship study. *Peptides*, 27(4), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.08.016>
- Avitabile, C., D'Andrea, L. D., Saviano, M., Olivieri, M., Cimmino, A., & Romanelli, A. (2016). Binding studies of antimicrobial peptides to Escherichia coli cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.077>
- Bessalle, R., Haas, H., Gorla, A., Shalit, I., & Fridkin, M. (1992). Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(2), 313–317. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.2.313>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Bradley, J., Guidos, R. J., Jones, R. N., ... Gilbert, D. (2013). 10 × '20 progress - Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12), 1685–1694. <https://doi.org/10.1093/cid/cit152>
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antibacterial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23, 329–344.
- Bush, K. (2010). Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.006>
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). LA RESISTENCIA DE BACTERIAS A ANTIBIÓTICOS, ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES UNA MANIFESTACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA Y ADAPTACIÓN Colombia Médica, abril-junio, año/vol. 38, número 002 Universidad del Valle. *Colombia Médica*, 38(2), 149–158.
- Camilio, K. A., Rekdal, Ø., & Sveinbjörnsson, B. (2017). A short synthetic anticancer peptide and novel immunotherapeutic agent LTX-315 (Oncopore™). 315(May), 7–9. <https://doi.org/10.4161/onci.29181>
- Cavalier, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., ... Spiegel, C. A. (2005). MIC Testing. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, 32(2), 53–62.
- Chan, Y.-H. M., & Boxer, S. G. (2008). *Model Membrane Systems and Their Applications State of the field*. 11(6), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.09.020>
- Chung, P. Y., & Khanum, R. (2017). Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
- CLSI M100-21. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement This. In *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research* (Vol. 15). <https://doi.org/10.1586/14737167.2015.1087317>
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02648-5)
- Datta, A., Kundu, P., & Bhunia, A. (2016). Designing potent antimicrobial peptides by disulphide linked dimerization and N-terminal lipidation to increase antimicrobial activity and membrane perturbation: Structural insights into lipopolysaccharide binding. *Journal of Colloid and Interface Science*, 461, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.036>
- David Tafur, J., Andrés Torres, J., & Virginia Villegas, M. (2008). *Volumen 12 No 3-Septiembre de*

- 2008 *Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria*. (2), 217–226.
- Dias, S. A., Freire, J. M., Pérez-Peinado, C., Domingues, M. M., Gaspar, D., Vale, N., ... Veiga, A. S. (2017). New potent membrane-targeting antibacterial peptides from viral capsid proteins. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00775>
- Domingo, J. C., Mora, M., & Africa de Madariaga, M. (1994). Role of headgroup structure in the phase behaviour of N-acylethanolamine phospholipids: hydrogen-bonding ability and headgroup size. *Chemistry and Physics of Lipids*, 69(3), 229–240. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90004-3)
- Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2015). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic Bacteria. *PLoS ONE*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144611>
- Eisenberg, D. (1984). Three-Dimensional Structure of Membrane and Surface Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 595–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.53.1.595>
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, (6), 25–64. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>
- Fernández-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A. S., & White, S. H. (2007). Folding Amphipathic Helices Into Membranes: Amphiphilicity Trumps Hydrophobicity. *Journal of Molecular Biology*, 370(3), 459–470. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.016>
- Fields, F. R., Carothers, K. E., Balsara, R. D., Ploplis, V. A., Castellino, F. J., & Lee, S. W. (2018). Rational design of syn-safencin, a novel linear antimicrobial peptide derived from the circular bacteriocin safencin AS-48. *Journal of Antibiotics*, 71(6), 592–600. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0032-4>
- García-hernández, A. M., García-vázquez, E., Hernández-torres, A., Ruiz, J., & Yagüe, G. (2011). Bacteriemias por E. coli BLEA: significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57–66. <https://doi.org/garcia> [pii]
- García, M. G., San, I. J., Galán, J., & Ernesto, I. I. F. (2018). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, Vol 69, No 2 Péptidos antimicrobianos : potencialidades terapéuticas Antimicrobial peptides : their therapeutic potential. 69(2), 1–12.
- Gauger, D. R., Selle, C., Fritzsche, H., & Pohle, W. (2001). Chain-length dependence of the hydration properties of saturated phosphatidylcholines as revealed by FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 565–566, 25–29. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00777-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00777-8)
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. In *Central European Journal of Biology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>
- Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., & McDermott, A. M. (2005). Mini review: A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research*, 30(7), 505–515. <https://doi.org/10.1080/02713680590968637>
- Håvard Jenssen, Pamela Hamill, and R. E. W. H. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 8(4), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Hincapié, O., Giraldo, P., & Orduz, S. (2018). In silico design of polycationic antimicrobial peptides active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(10), 1871–1882. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1080-2>
- Holfeld, L., Knappe, D., & Hoffmann, R. (2018). Proline-rich antimicrobial peptides show a long-lasting post-antibiotic effect on Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 933–941. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx482>
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms

- and clinical implications. *BMJ (Online)*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- Jindal, B. A. K., Pandya, M. K., & Khan, M. I. D. (2015). Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(2), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.04.011>
- Kolar, S. L., Antonio Ibarra, J., Rivera, F. E., Mootz, J. M., Davenport, J. E., Stevens, S. M., ... Shaw, L. N. (2013). Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *MicrobiologyOpen*, 2(1), 18–34. <https://doi.org/10.1002/mbo3.55>
- Lee, J., & Lee, D. G. (2014). Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: Membrane disruption and apoptosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11058>
- Lee, S., Yang, S., Park, E. J., Lee, D. G., Lee, M. K., Eom, S. H., ... Hahm, K. (2001). *and hemolytic activities of α -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs*. 504–514.
- Leite, N. B., Aufderhorst-Roberts, A., Palma, M. S., Connell, S. D., Neto, J. R., & Beales, P. A. (2015). PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. *Biophysical Journal*, 109(5), 936–947. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.07.033>
- Lemos Luengas E, S. C. (2001). Defensinas : una nueva perspectiva en antibiotocoterapia. *Universidad Nacional De Colombia*, 4, 207–209.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. *Frontiers in Neuroscience*, 11(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00073>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mantsch, H. H., & McElhaney, R. N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57(2–3), 213–226. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(91\)90077-O](https://doi.org/10.1016/0009-3084(91)90077-O)
- Marshall, S. H., & Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 96–109. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-1>
- Martín, S., Farmacéutico, C., Farmacia, E., M^a, H., Martín, T., Farmacéutico, C., ... Jefe De Servicio, R. (n.d.). *TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)*.
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 2), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70027-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70027-6)
- Moisés Morejón García. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280.
- Mukerji, S., O’Dea, M., Barton, M., Kirkwood, R., Lee, T., & Abraham, S. (2017). Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. *Essays In Biochemistry*, 61(1), 23–35. <https://doi.org/10.1042/EBC20160055>
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... Kristensen, H.-H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975–980. <https://doi.org/10.1038/nature04051>
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Human Bacterial Pathogens. *Curr Issues Mol Biol*, 8(1), 11–26. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16450883>

- Nowotarska, S. W., Nowotarski, K. J., Friedman, M., & Situ, C. (2014). Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers. *Molecules*, *19*(6), 7497–7515. <https://doi.org/10.3390/molecules19067497>
- Nuding, S., Frasc, T., Schaller, M., Stange, E. F., & Zabel, L. T. (2014). Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides and Antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(10), 5719–5725. <https://doi.org/10.1128/aac.02542-14>
- Oñate-garzón, J. F., Manrique-moreno, M., & Gonzalez, E. P. (2017). DISEÑADOS A PARTIR DE UN PÉPTIDO NEUTRO Antimicrobial Activity of Cationic Peptides Designed from Neutral Peptide. *Acta Biológica Colombiana*, *22*(2), 157–164.
- Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., ... Notomista, E. (2017). Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *Journal of Theoretical Biology*, *419*(January), 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended spectrum beta-lactamases : a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657>
- Pozo Navas, B., Lohner, K., Deutsch, G., Sevcsik, E., Riske, K. A., Dimova, R., ... Pabst, G. (2005). Composition dependence of vesicle morphology and mixing properties in a bacterial model membrane system. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1716*(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.08.003>
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, *2013*(Table 1). <https://doi.org/10.1155/2013/675391>
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *24*(6), 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
- Sanchez, M. del P. (2015). *Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas de clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué , Colombia Resumen Introducción*.
- Shang, D., Zhang, Q., Dong, W., Liang, H., & Bi, X. (2016). The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria and endotoxin neutralization. *Acta Biomaterialia*, *33*, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.019>
- Simar, S., Sibley, D., Ashcraft, D., & Pankey, G. (2017). Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. *The Ochsner Journal*, *17*(3), 239–242. <https://doi.org/10.1043/1524-5012-17.3.239>
- Sivieri, K., Bassan, J., Peixoto, G., & Monti, R. (2017). Gut microbiota and antimicrobial peptides. *Current Opinion in Food Science*, *13*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.010>
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., ... Butaye, P. (2008). Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(4), 1238–1243. <https://doi.org/10.1128/AAC.01285-07>
- Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *78*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.003>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, *51*(2), 149–177.

- <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Télez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, *14*(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
- Tornimbene, B., Eremin, S., Escher, M., Griskeviciene, J., Manglani, S., & Pessoa-Silva, C. L. (2018). WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System early implementation 2016-17. In *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30060-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30060-4)
- Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *247*(June), 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.001>
- van der Weide, H., Brunetti, J., Pini, A., Bracci, L., Ambrosini, C., Lupetti, P., ... Falciani, C. (2017). Investigations into the killing activity of an antimicrobial peptide active against extensively antibiotic-resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1859*(10), 1796–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.001>
- Vignoli, R., & Seija, V. (n.d.). *Principales mecanismos de resistencia antibiotica*. 649–662.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M. (1997). Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, *36*(20), 6124–6132. <https://doi.org/10.1021/bi9619987>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). *Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance*. *57*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2.27>
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(15), 5449–5453.
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides-Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1758*(9), 1436–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.021>
- Zhang, L., & Falla, T. J. (2006). Review: Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin. Pharmacother*, *7*(6), 653–663. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.6.653>