



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL PÉPTIDO
LfcinB (20-25)₄ CONTRA AISLADOS CLÍNICOS
MULTIRRESISTENTES DE *E. coli* Y *S. aureus***

Laura Daniela Bonilla Velásquez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología

Bogotá D.C., Colombia

2021

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL PÉPTIDO LfcinB
(20-25)₄ CONTRA AISLADOS CLÍNICOS
MULTIRRESISTENTES DE *E. coli* Y *S. aureus***

Laura Daniela Bonilla Velásquez

Director:

Zuly Jenny Rivera Monroy Ph.D.

Departamento de Química - Universidad Nacional de Colombia

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Co-Director:

Claudia Marcela Parra Giraldo Ph.D.

Departamento de Ciencias – Pontificia Universidad Javeriana

Grupo de Investigación:

Unidad de investigación en proteómica y micosis humanas (PUJ)



Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C, Colombia

«El aspecto más triste de la vida en este preciso momento es que la ciencia reúne el conocimiento más rápido de lo que la sociedad reúne la sabiduría».

Isaac Asimov

Agradecimiento

A Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia; a mis padres, hermano y sobrinos por el apoyo incondicional durante el desarrollo de todo este proyecto y por demostrarme lo hermosa que es la vida y lo justa que puede llegar a ser.

A mis directoras Zuly Jenny Rivera y Claudia Marcela Parra por su aprendizaje, su paciencia, sus consejos y sabiduría, quienes fueron una guía primordial para llevar a cabo esta tesis de maestría: No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes hemos logrado ver la meta de otra manera.

Al profesor Javier Eduardo García por su orientación y atención durante todo el camino de esta maestría.

A la Doctora Aura Lucía Leal por brindarnos parte fundamental de nuestro proyecto y por la confianza para trabajar en su espacio del laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina.

A los integrantes del grupo de investigación Síntesis y aplicación de moléculas peptídicas, quienes siempre con sus aportes, consejos y su experiencia me ayudaron a culminar este proyecto.

A la profesora Martha Raquel Fontanilla quien ha sido parte fundamental de mi desarrollo personal y profesional, quien me ha acompañado durante este camino y me ha guiado con sus mejores consejos y experiencias de vida. Muchas gracias por permitirme crecer y vivir una experiencia tan importante e inolvidable de mi formación.

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias y programa Maestría en Ciencias – Microbiología, por la financiación dentro de la Beca Auxiliar Docente.

A MINCIENCIAS (COLCIENCIAS) por la financiación del proyecto (CONTRATO RC 846 – 2019): Diseño y obtención de nuevos agentes antibacterianos basados en dendrímero péptido – resorcinareno: Una alternativa para combatir la resistencia bacteriana.

Resumen

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) constituyen una alternativa terapéutica para el desarrollo de tratamientos de enfermedades infecciosas, que podrían contrarrestar el ascendente número de microorganismos resistentes a antibióticos que han incrementado el problema de salud pública a nivel mundial. La OMS en el año 2018, reportó la aparición de cepas resistentes y multirresistentes, bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*, han desarrollado mecanismos de resistencia frente a los antibióticos de primera línea, evidenciando la ineficacia de los fármacos utilizados comúnmente. Como una estrategia para ampliar las alternativas terapéuticas los péptidos derivados de la Lactoferricina Bovina (LfcinB), que contienen el motivo mínimo de actividad antimicrobiana RRWQWR, han sido evaluados contra cepas de referencia Gram positivas y Gram negativas, esta investigación ha permitido enfocar el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ con actividad antibacteriana promisorio. Dando continuidad a esta investigación, en el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de LfcinB (20-25)₄ contra aislados clínicos de *S. aureus* y *E. coli* los cuales presentan diferentes perfiles de resistencia. Se determinó que el péptido tetramérico presenta actividad contra los aislados clínicos evaluados, con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) en el rango de 11 µM a 22 µM para bacterias Gram positivas y 5 µM a 22 µM para Gram negativas; estos resultados muestran que este péptido LfcinB (20-25)₄ con actividad

antibacteriana, tanto en cepas de referencia como en aislados clínicos, es una alternativa viable para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Palabras claves: Lactoferricina Bovina, actividad antibacteriana, aislados clínicos multirresistentes, péptidos antimicrobianos.

Abstract

Antimicrobial peptides (PAMs) are an alternative to the development of new antibacterial therapies, which could counteract the ascending number of antibiotic-resistant microorganisms that have increased the global public health problem. In the latest WHO reports in 2018, it indicates that bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*, exhibit resistance against first-line antibiotics and are classified as resistant and multidrug-resistant strains, demonstrating the inefficiency of drugs worldwide. Within this context, peptides derived from Lactoferricin Bovina (LfcinB) containing the minimum motif, have been evaluated against Gram-positive and Gram-negative reference strains. In this work, the tetrameric peptide LfcinB (20-25)₄ was evaluated against clinical isolates of *S. aureus* and *E. coli* that have been classified as multidrug-resistant by the Institute of Cancerology of Bogota, with a new identification through MALDI TOF. The activity of this peptide was demonstrated against the clinical isolates evaluated, having a minimal inhibitory concentration (MIC) within the range of 11 – 22 μ M for Gram-positive bacteria and 5 – 22 μ M for Gram negatives. In addition, the activity in combination with ciprofloxacin was evaluated for one of the isolates with higher percentages of antibiotic resistance, resulting in an additive effect that maintained the concentration of the peptide. All these results show that the tetrameric peptide LfcinB (20-25)₄ with

antibacterial activity, is a viable alternative for the development of new therapeutic agents.

Key words: Bovine lactoferricin, antibacterial activity, clinical isolates, antimicrobial peptides.

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Término	Abreviatura	Siglas
Acetiltransferasas	AAC	
Agar Mueller Hinton		AMH
Alanina	Ala	A
American Type Culture Collection		ATCC
Amikacina	AK	
Aminohexanoico		Ahx
Ampicilina	AM	
Ampicilina/Sulbactam	SAM	
Betalactamasas	Bla	
Betalactamasas de espectro extendido		BLEE
Cefalotina	CEF	
Cefatzidina	CAZ	
Cefepime	CPE	
Cefotaxina	CTX	
Ceftriaxona	CAX	
Cefuroxima	CXM	
Cefuroxima axetilo	CXM AX	
Ciprofloxacino	CIP	
Cisteína	Cys	C
Clindamicina	CLI	
Clinical & Laboratory Standards Institute		CLSI
Concentración mínima bactericida		CMB
Concentración mínima inhibitoria		CMI
Concentración Inhibitoria Fraccionada		CIF
Control de Crecimiento		CC
Control negativo		C-
Control positivo		C+
Control técnico		CT
Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa		RP-HPLC
Daptomicina	DAP	
<i>E. coli</i> difusamente adherente		DEAEC
<i>E. coli</i> enteroagregante		EAEC
<i>E. coli</i> enterohemorrágica		EHEC

<i>E. coli</i> enteroinvasiva		EIEC
<i>E. coli</i> enteropatogénica		EPEC
<i>E. coli</i> enterotoxigénica		ETEC
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	
Eritromicina	ERY	
Ertapenem	ETP	
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	
Espectrometría de masas		EM
Extracción en fase sólida		SPE
Fosfotransferasas	APH	
Gentamicina	GEN	
Grados Centígrados		°C
Horas	H	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	
Lactoferricina	Lfcin	
Lactoferricina Bovina	LfcinB	
Lactoferricina Humana	LfcinH	
Lactoferrina	LF	
Lactoferrina Bovina	LFB	
Linezolid	LZD	
Lipopolisacáridos	LPS	
Meropenem		
Microgramo	MER	
Micromolar		µg
Mililitro		uM
Nitrofurantoina		mL
Norfloxacino	NIT	
Nucleotidiltransferasas	NOR	
Organización mundial de la Salud	ANT	
Oxacilina		OMS
Penicillin Binding Protein	OXA	
Penicilina		PBP
Péptidos antimicrobianos	P	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PAMs
Resistencia a los antibióticos	<i>P. aeruginosa</i>	
Resistente		RA
Rifampicina	R	
<i>Salmonella enteritidis</i>	RIF	

Sensible	<i>S. enteritidis</i>	
Síntesis de Péptidos en Fase Sólida	S	
Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas		SPPS
<i>Staphylococcus aureus</i>		SAMP
<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilicina	<i>S. aureus</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		MRSA
Tampón fosfato salino	<i>S. maltophilia</i>	
Teicoplanina		PBS
Tetraciclina	TEC	
Trimetoprim/sulfametoxazol	TET	
Triptófano	STX	
Unidad de cuidados intensivos	Trp	W
Unidades formadoras de colonia		UCI
Ultravioleta		UFC
Unidades Formadoras de Colonias		UV
Vancomicina		UFC
	VAN	

Tabla de contenido

Resumen.....	V
Abstract	VII
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1. Péptidos antimicrobianos	8
1.2. Lactoferricina Bovina	9
1.3. Péptido tetramérico derivado de LfcinB	10
1.4. Microorganismos	15
1.4.1. Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.4.2. Mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i>	16
1.4.3. Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	21
1.4.4. Mecanismos de resistencia de <i>E. coli</i>	22
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. Diseño metodológico.....	29
5.2. Aislados clínicos bacterianos	30
5.3. Análisis de los aislados clínicos por técnicas microbiológicas.....	30

5.4.	Caracterización de los aislados clínicos por espectrometría de masas MALDI-TOF	31
5.5.	Péptido LfcinB (21-25) ₄	32
5.6.	Actividad antibacteriana	33
5.6.1.	Concentración mínima inhibitoria	33
5.6.2.	Concentración mínima bactericida	34
5.6.3.	Ensayo de interacción entre LfcinB (20-25) ₄ y ciprofloxacina	35
5.6.4.	Curvas de letalidad	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1.	ETAPA 1 – Caracterización microbiológica.....	37
6.2.	ETAPA 2 – Actividad antibacteriana.....	47
6.2.1.	Actividad antibacteriana de LfcinB (20-25) ₄ contra los aislados clínicos de <i>S. aureus</i>	48
6.2.2.	Actividad antibacteriana de LfcinB (20-25) ₄ contra los aislados clínicos de <i>E. coli</i>	51
6.2.3.	Determinación del efecto bacteriostático y bactericida de LfcinB (20-25) ₄ contra aislados clínicos de <i>E. coli</i> con fenotipo atípico.....	57
6.2.4.	Ensayo de interacción entre LfcinB (20-25) ₄ y ciprofloxacina	59
7.	Conclusiones	63
8.	Perspectivas	64
9.	Bibliografía.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la LfcinB.....	10
Figura 2. Estructura del tetrámero LfcinB (20-25) ₄	11
Figura 3. Curva de letalidad del Péptido LfcinB (20-25) ₄ contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923	12
Figura 4. Mecanismos de resistencia frente a antibióticos encontrados en <i>S. aureus</i>	20
Figura 5. Mecanismos de resistencia frente a antibióticos encontrados en <i>E. coli</i>	23
Figura 6. Diseño metodológico. Etapas de la investigación desarrollada.....	29
Figura 7. Siembra de la muestra para análisis MALDI-TOF de los aislados	31
Figura 8. Distribución del plato multipozos para determinar la CMI.....	33
Figura 9. Plantilla de la caja de petri.....	35
Figura 11. Fermentación de lactosa en algunos aislados clínicos de <i>E. coli</i> en agar MacConkey.....	40
Figura 12. Clasificación de los aislados clínicos de (A) <i>S. aureus</i> y (B) <i>E. coli</i>	41
Figura 13. Dendrograma obtenido del análisis MALDI-TOF de los aislados identificados como <i>S. aureus</i>	45
Figura 14. Dendrograma obtenido del análisis MALDI-TOF de los aislados identificados como <i>E. coli</i>	46
Figura 15. Concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) de LfcinB (20-25) ₄ contra a los aislados de <i>S. aureus</i>	49
Figura 16. Concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) de LfcinB (20-25) ₄ contra a los aislados de <i>E. coli</i>	52
Figura 17. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de LfcinB (20-25) ₄ contra el aislado <i>E. coli</i> 301755	54
Figura 19-A. Determinación de la competencia entre LfcinB (20-25) ₄ y ciprofloxacina para el aislado 303818.	61
Figura 19-B. Determinación de la competencia entre LfcinB (20-25) ₄ y ciprofloxacina para el aislado 301755.	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antibacteriana del péptido tetramérico LfcinB (20-25) ₄	13
Tabla 2. Clasificación del puntaje (score) obtenido por MALDI-TOF	32
Tabla 3. Tabla de conversión de unidades de entre $\mu\text{g/mL}$ y μM del péptido lfcinb (20-25) ₄	34
Tabla 4. Clasificación de los aislados clínicos	42
Tabla 5. Puntaje de identificación por MALDI-TOF MS obtenido para los aislados clínicos	44

INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado la resistencia antimicrobiana como uno de los problemas de salud pública más difícil de controlar debido al uso indiscriminado de los antibióticos, no solo a nivel humano sino en campos como la veterinaria y la agricultura, lo que ha provocado que diferentes microorganismos generen resistencia a las opciones terapéuticas disponibles actualmente (1). En 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de microorganismos resistentes que representan una amenaza para la salud humana y para los cuales existe una necesidad prioritaria de desarrollar nuevos antibióticos. Para la construcción de este documento se emplearon criterios como mortalidad, prevalencia de resistencia y transmisibilidad (2), uno de los objetivos de la lista publicada por la OMS es guiar las estrategias de investigación para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, la lista se dividió en tres niveles de necesidad de desarrollo de antibióticos: crítico, alto y medio. El grupo crítico está compuesto por bacterias Gram-negativas, específicamente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (2). En los últimos años, los expertos han advertido sobre la dificultad de combatir las bacterias Gram negativas (3)(4) . Las autoridades sanitarias de todo el mundo están buscando soluciones a esta crisis y enfatizan que necesitamos desarrollar urgentemente nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes (5)(6). La OMS en el año 2018, indicó que bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentan resistencia frente a los antibióticos de primera línea y son clasificados como cepas

multirresistentes evidenciando la ineficacia de los antibióticos a nivel global (7). En Colombia para el año 2018, el Ministerio de salud reportó la tasa de resistencia a los antibióticos para *S. aureus* entre 35% al 71% en aislamientos de pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI) en 34 hospitales de Bogotá (8)(9). En Gram negativos se registró resistencia con un porcentaje alto en carbapenémicos y en *E. coli* se ha medido primordialmente la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas (10).

Para superar esta problemática mundial, se han estudiado diferentes alternativas para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, siendo una fuente importante de moléculas promisorias los Péptidos Antimicrobianos (PAMs), los cuales, son oligopéptidos con un número variable de aminoácidos y se encuentran en procariotas y eucariotas. Los PAMs hacen parte de la respuesta inmune innata por lo que desempeñan un papel importante en la resolución de la mayoría de las infecciones causadas por virus, bacterias, parásitos y hongos. También, presentan mecanismos de acción que generan menos resistencia que los fármacos convencionales, no producen reacciones adversas debido a que hacen parte del sistema inmune, son menos susceptibles a las proteasas del hospedero y se ha reportado que presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (11) (12).

La Lactoferrina (LF) es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa perteneciente a la familia de las transferrinas por su unión al hierro, que ha presentado acción antimicrobiana, antifúngica, antiviral y anticancerígena (13), esta proteína se encuentra principalmente en la leche, lágrimas, saliva y otros fluidos corporales

exocrinos. La Lactoferricina bovina (LfcinB) es un péptido antimicrobiano de 25 residuos (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹), que se produce por la hidrólisis de la Lactoferrina Bovina (LFB) generada por la pepsina gástrica (14)(15). Este péptido ha presentado actividad antibacteriana tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, también presenta actividad contra hongos, parásitos, virus y células tumorales (16)(17)(18). La LfcinB y fragmentos más cortos derivados de este péptido han presentado igual o mayor actividad antibacteriana que la LFB; adicionalmente, se ha logrado identificar el motivo mínimo de actividad antibacteriano, LfcinB (20-25), el cual corresponde a la secuencia ²⁰RRWQWR²⁵ (19).

En 2015, el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) estudió la actividad antibacteriana de 20 péptidos cortos derivados de LfcinB que contenían la secuencia RWQWR. Los péptidos fueron diseñados para establecer si la actividad antibacteriana podría verse afectada por introducción de aminoácidos no naturales, sustituciones puntuales de aminoácidos, secuencias truncadas, y / o presentación de varias copias del residuo mínimo, específicamente una secuencia palindrómica y una tetramérica. La actividad antibacteriana fue probada contra cepas de referencia, entre estas *E. coli* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 29212; se encontró que el péptido tetramérico, LfcinB (20-25)₄, presentó la mayor actividad antibacteriana para las dos cepas evaluadas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 5 y 11 µM, respectivamente. Este resultado sugirió que múltiples copias de la secuencia RRWQWR, motivo mínimo de actividad de la LfcinB, podrían mejorar la actividad antibacteriana (20). Los estudios realizados por el grupo SAMP mostraron que este tetrámero presenta actividad contra bacterias Gram negativas, *E. coli* (ATCC 11775, ATCC 25922, ATCC 43827), *S. maltophilia*

(ATCC 13636), *S. enteritidis* (ATCC 13076) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y contra Gram positivas, *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. faecalis* (ATCC 29212) (21)(22)(23). En estos trabajos se encontró que el tetrámero LfcinB (20-25)₄: (i) es un péptido de amplio espectro de acción con valores de CMI entre 5 y 44 μ M; (ii) presenta actividad bacteriostática para bacterias Gram positivas y Gram negativas; (iii) posee un efecto sinérgico con ciprofloxacina y vancomicina (*E. coli* y *S. aureus*), haciendo que estos antibióticos presentaran una disminución en sus CMIs de 20 y 60 veces respectivamente.

Teniendo en cuenta lo descrito y que no existen muchos estudios que determinen la actividad de péptidos derivados de la Lactoferricina Bovina frente aislados clínicos, en este estudio se evaluó sí el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ tenía actividad antimicrobiana frente a cepas clínicas con fenotipos multirresistentes, obtenidos del Instituto Nacional de Cancerología.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Péptidos antimicrobianos

El surgimiento cada vez más frecuente de poblaciones microbianas resistentes a antibióticos y a los nuevos fármacos utilizados en la terapia moderna, es considerado como un problema de salud pública (24). La resistencia bacteriana no se considera solamente un problema puntual en pacientes que asisten a un centro médico, sino un problema global, ya que ha generado infecciones bacterianas con niveles altos de resistencia a antibióticos y esto ha aumentado los porcentajes de mortalidad en el mundo (25)(26). El estudio de diferentes alternativas para combatir esta problemática se ha convertido en un reto para la humanidad, en las últimas décadas ha surgido interés por los PAMs debido a sus múltiples mecanismos de acción, su amplio espectro de actividad y su baja toxicidad ya que hacen parte del sistema inmunológico innato (15)(27). Los PAMs son péptidos que contienen entre 8 a 50 residuos de aminoácidos, los cuales han sido aislados en bacterias, hongos, insectos, plantas, humanos y animales, y son la primera línea de defensa (28) de los organismos. Sus características más relevantes son: moléculas anfipáticas con múltiples residuos hidrófobos y con amplio espectro antimicrobiano (15). Dentro de los PAMs existen (i) péptidos aniónicos, (ii) catiónicos, (iii) aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro, y (iv) péptidos aniónicos y catiónicos de proteínas con actividades antimicrobiana como la LfcinB (24).

1.2. Lactoferricina Bovina

La Lactoferricina Bovina se obtiene como producto de la hidrólisis de la proteína Lactoferrina Bovina, este péptido ha sido identificado en diferentes secreciones como las lágrimas, la saliva, la leche y el suero (29). En 1992 se reportó que péptidos derivados de la LfcinH (Lactoferricina humana) y péptidos derivados de la LfcinB presentaron actividad antibacteriana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas (30). Desde finales de los años 90 se ha estudiado el mecanismo de acción de los péptidos derivados de la Lfcin, en un principio se creía que el efecto quelante de los péptidos sobre el hierro afectaba el metabolismo bacteriano, luego se propuso que la actividad de la LfcinB se debe a la interacción electrostática de los residuos catiónicos del péptido y las cargas negativas de la membrana bacteriana (31)(32).

Posteriormente, se reportan evaluaciones de la actividad antibacteriana de la Lactoferricina bovina, humana, caprina y murina, siendo la LfcinB la que mostró mayor actividad contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, con valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10 μ M (17). Vorland y colaboradores en 1999 reportaron el efecto sinérgico parcial entre la LfcinB con antibióticos como la penicilina, vancomicina y gentamicina contra cepas de *E.coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, concluyendo que este péptido antimicrobiano puede facilitar la absorción de antibióticos a través tanto de la pared como de la membrana celular (33). La LfcinB, adicionalmente ha mostrado actividad contra hongos, parásitos y virus (34), y se ha reportado que posee actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares derivadas de cáncer (22).

La LfcinB contiene 25 aminoácidos (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹), es una estructura cíclica (bucle) ya que forma un puente disulfuro gracias a los dos residuos de cisteína que posee (Figura 1) (35). La secuencia RRWQWR, residuos 20 al 25, se ha identificado como el motivo mínimo con actividad antibacteriana (20)(36) (37). El mecanismo asociado a la actividad antibacteriana de la LfcinB se basa en la interacción electrostática de las cargas positivas del péptido con las cargas negativas de la pared y membrana bacteriana, específicamente en bacterias Gram positivas con el ácido teicoico y en Gram negativas con los lipopolisacáridos (38), posterior a esto los residuos hidrofóbicos (triptófano) causan disrupción de la bicapa lipídica causando lisis celular (23)(39).

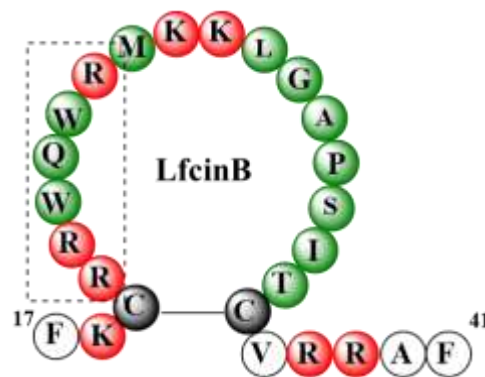


Figura 1. Estructura de la LfcinB. La LfcinB presenta una estructura de bucle unido por puentes de disulfuro, la numeración corresponde a la posición en la proteína original (LFB), el motivo mínimo de actividad se muestra en el cuadro punteado, en rojo se muestran los residuos con carga positiva, adaptado de Farnaud et al. 2003 (40).

1.3. Péptido tetramérico derivado de LfcinB

LfcinB (20-25)₄: ((RRWQWR)₂K-Ahx-C)₂ es un péptido que contiene cuatro copias del motivo mínimo de actividad reportado para la LfcinB (Figura 2). Para la obtención de esta molécula se sintetiza en fase sólida un dímero que contiene una cisteína en el extremo C-terminal, un espaciador ácido 6-aminohexanoico (Ahx), y

una lisina que gracias a sus grupos NH₂, en las posiciones α y ε, permite construir simultáneamente dos copias de la secuencia RRWQWR. El dímero es purificado y luego mediante una oxidación se genera una única especie tetramérica (23).

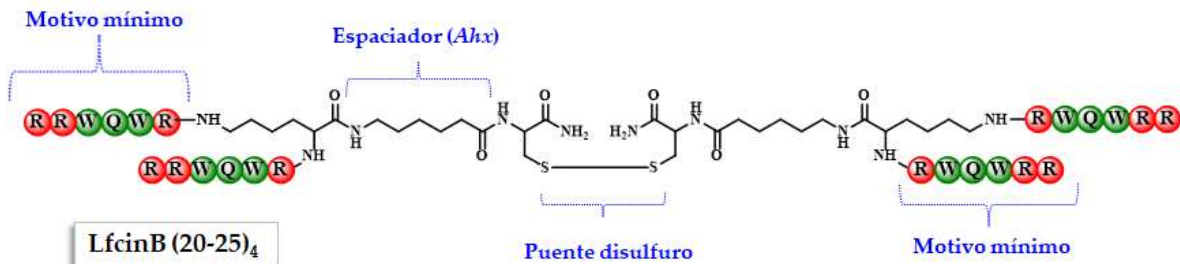


Figura 2. Estructura del tetrámero LfcinB (20-25)₄. La estructura del LfcinB (20-25)₄ contiene cuatro copias del motivo mínimo de actividad. En rojo se representan los aminoácidos de carga positiva, adaptado de León M. et al 2015 (20).

En el 2015 se reportó la síntesis del tetrámero y el efecto antibacteriano de esta molécula contra *E. coli* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 29212 que presentó una CMI de 5 y 27 μM respectivamente (20), este resultado sugirió que la polivalencia de la secuencia potenciaba la actividad. Posterior a este trabajo, se evaluaron contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, péptidos lineales derivados de la secuencia LfcinB 17–31 (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGA³¹) y tres péptidos polivalentes (un dímero, un tetrámero y un palíndromo) que contienen la secuencia RWQWR. Los péptidos polivalentes presentaron la mayor actividad antibacteriana contra las dos cepas; el tetrámero LfcinB (20-25)₄, exhibió CMIs de 6,25 μM y 25 μM (Tabla 1), este trabajo permitió corroborar que la polivalencia es una buena estrategia para potenciar la actividad antibacteriana; en el mismo año, Huertas y colaboradores (36) evaluaron la actividad antibacteriana de LfcinB (20-25)₄ contra *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13636, *E. coli* ATCC 11775 y *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, encontrando CMIs de 5, 22 y 44 μM, respectivamente. Vargas

y colaboradores (22) evaluaron LfcinB (20-25)₄ contra dos cepas ATCC de *E. coli* (11775 y 25922), obteniendo valores de CMIs de 22 μ M para ambas cepas; y en el 2019 los mismos autores evaluaron este péptido contra *E. coli* ATCC 43827, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 25923, obteniendo CMIs de 5, 11, 44 y 22 μ M, respectivamente. Adicionalmente, se realizaron curvas de letalidad (efecto durante 48 horas) del tetrámero contra *P. aeruginosa* ATCC 47853 y *S. aureus* ATCC 25923, según esto, el péptido presentó actividad bacteriostática (*P. aeruginosa* ATCC 47853: 11 μ M y *S. aureus* ATCC 25923: 22 μ M) y bactericida (22 y 44 μ M respectivamente). En la Figura 3, se muestra un ejemplo de la curva de letalidad para *S. aureus* ATCC 25923. En este trabajo, se evidenció también que LfcinB (20-25)₄, presenta efecto sinérgico con Ciprofloxacina a una concentración de 3,1 μ g/mL contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 y de igual manera efecto sinérgico con Vancomicina a 3,1 μ g/ mL contra *S. aureus* ATCC 25923, mejorando la actividad de los antibióticos entre 20 y 60 veces.

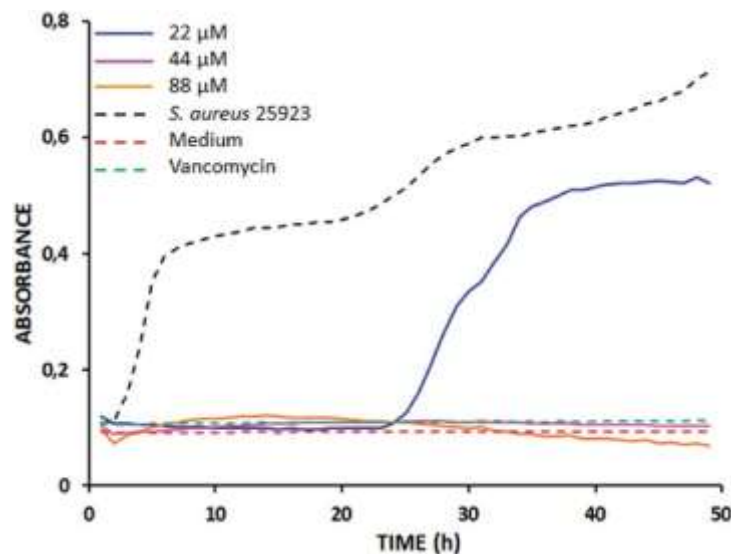


Figura 3. Curva de letalidad del Péptido LfcinB (20-25)₄ contra *S. aureus* ATCC 25923. El péptido se probó a concentraciones correspondientes a valores de la CMI (línea azul), 2 CMI (línea rosa) y 4 CMI (línea naranja), tomado de Vargas Y. et al 2019 (23).

Tabla 1. Actividad antibacteriana del péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄

CEPA	CÓDIGO	FENOTIPO	CMI (μM)	CMB (μM)	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	S	4,4	4,4	León M. <i>et al.</i> 2015 (20)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	S	10,9	10,9	
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	S	6,25	12,5	Huertas N. <i>et al.</i> 2017 (21)
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	S	25	25	
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	S	5,5	5,5	Huertas N. <i>et al.</i> 2017 (36)
<i>S. maltophilia</i>	ATCC 13636	S	44	44	
<i>S. enteritidis</i>	ATCC 13076	S	22	44	
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	S	3,1	25	Vega S. <i>et al.</i> 2018 (41)
	ATCC 51575	R	>200	>200	
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 10145	S	18,1	50	
	ATCC 27853	R	21,7	50	
<i>E. faecium</i>	550	R	>100	12,5	
	1,040	R	>100	>100	
	1,225	R	>100	12,5	
	1,461	R	>100	12,5	
<i>S. aureus</i>	1,462	R	>100	12,5	
	52,013	S	6,7	12,5	
	43,062	R	6,7	12,5	
	43,337	R	6,3	12,5	
<i>K. pneumoniae</i>	48,575	R	9,2	12,5	
	48,577	R	6,3	100	
	49,644	R	ND	ND	
	50,181	R	5,5	100	
	50,424	R	7,8	100	
	51,048	R	5,2	50	
<i>P. aeruginosa</i>	51,009	R	1,6	25	
	47,661	R	7,5	25	
	48,220	S	12,6	25	
	48,221	R	11,9	50	
	48,458	R	72,8	>100	
48,526	S	24,9	>100		
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	S	6,25	12,5	Vega S. <i>et al.</i> 2018 (42)
	ATCC 33591	R	12,5	12,5	
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	S	6,25	25	
	ATCC 700603	R	12,5	25	
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	S	22	44	Vargas Y. <i>et al.</i> 2017 (22)
	ATCC 25922	S	22	22	
<i>E. coli</i>	ATCC 43827	R	5	44	Vargas Y. <i>et al.</i> 2019 (23)
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	S	11	22	
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	S	44	>44	
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	S	22	22	

S: Sensible, R: resistente a antibióticos, ND: No determinado.

En 2018, fue evaluada la actividad de LfcinB (20-25)₄ contra cepas de referencia sensibles y resistentes (41) entre ellas: *E. faecalis* (ATCC 29212 y ATCC 51575), *P. aeruginosa* (ATCC 10145 y ATCC 27853) y aislados clínicos de dos bacterias Gram positivas (*E. faecium* y *S. aureus*) y dos bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*). Para las cepas de referencia, el péptido LfcinB (20-25)₄ presentó valores de CMI en un rango de 3,1 a > 200 µM y para los aislados clínicos CMI entre 1,6 a > 100 µM (Tabla 1). Por otro lado, también encontraron que, este péptido presentó una concentración máxima hemolítica a 100 µM (49.1%). Adicionalmente este grupo (42), evaluó la acción del tetrámero, contra cepas bacterianas causantes de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria, entre ellas, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, los resultados obtenidos fueron CMI entre 6,25 y 12,5 µM para las 4 cepas evaluadas. (Tabla 1). En este estudio realizaron microscopía electrónica de barrido para evidenciar el efecto del péptido sobre las bacterias, en *S. aureus* ATCC 25923 el péptido tetramérico indujo agregados de varios tamaños esféricos y se formaron protuberancias en la superficie bacteriana y para *S. aureus* ATCC 33591 se observan formas y agregaciones celulares anormales, junto con cambios en la superficie, además en ambos casos se observó pérdida de contenido celular. En el caso de *K. pneumoniae* ATCC 13883, el tetrámero indujo la pérdida total de la forma típica de los bacilos y la formación de agregados de varias formas y tamaños y en *K. pneumoniae* ATCC 700603 se observaron cambios en la superficie y la agregación de células de diferentes formas, en ambos casos se ve pérdida de contenido celular.

Teniendo en cuenta la situación actual de cepas patógenas multirresistentes y los estudios que se han llevado a cabo de la actividad antibacteriana de péptidos de la LfcinB en el grupo de investigación, el enfoque de este proyecto fue la evaluación de

la actividad antibacteriana del péptido promisorio LfcinB (20-25)₄ contra aislados clínicos con perfiles de resistencia a antibióticos, así determinar si este péptido presenta igual o mayor actividad antibacteriana a la observada contra cepas de referencia y de esta manera contribuir al desarrollo de una posible terapia alternativa para infecciones bacterianas.

1.4. Microorganismos

1.4.1. Generalidades de *Staphylococcus aureus*

Microorganismo que pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, se destaca por ser uno de los patógenos humanos más importantes, su morfología corresponde a cocos inmóviles acoplados en racimos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa, DNAsa y coagulasa positiva. Se encuentra como microbiota habitual en piel y mucosas, pero en algunos casos están asociados con infecciones severas, dentro de ellas heridas quirúrgicas, bacteremia, endocarditis, síndrome del shock tóxico e intoxicaciones (43).

S. aureus es un microorganismo oportunista y su colonización está asociada a ambientes hospitalarios, causando infecciones en pacientes con diabetes, lesiones cutáneas, pacientes sometidos a diálisis, entre otros (44). Los factores de colonización y virulencia permiten que este patógeno evada el sistema inmunológico, factores como la adhesión implicados en la colonización de fosas nasales, enzimas extracelulares permitiendo la sobrevivencia en factores desfavorables y la producción de toxinas que actúan conllevando al síndrome del shock tóxico, toxinas

exfoliativas o hemolisinas, causan que este microorganismo sea capaz de producir infecciones severas y en algunos casos la muerte (43).

El inicio de la resistencia a antibióticos se evidenció desde 1942, cuando fue descrito uno de los primeros fármacos para tratar infecciones por *S. aureus*, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming y previa identificación de las penicilinasas bacterianas. Desde entonces y hasta la actualidad, este microorganismo ha encabezado la lista de bacterias resistentes a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud en el año 2018 (45).

El Boletín informativo GREBO reporta a *S. aureus* como el segundo microorganismo más comúnmente aislado en los servicios de los hospitales colombianos, seguido de *E. coli*. Dentro de los antibióticos con mayores porcentajes de resistencia, se encontraron oxacilina en primer lugar con un 31%, en segundo puesto la tetraciclina con 17% y posteriormente eritromicina con 14% (46).

1.4.2. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*

Antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

Betalactámicos: constituyen el grupo más numeroso y diverso de todos los antibióticos, las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, en su estructura poseen un anillo betalactámico para su actividad antimicrobiana (47). Esta estructura corresponde a un análogo de los dos últimos aminoácidos de las cadenas peptídicas, D-Ala D-Ala, esto conlleva a que el sitio activo de las transpeptidasas o PBP's (Penicillin Binding Protein) se anclen a él y se una irreversiblemente evitando la síntesis de la pared bacteriana (48).

Dentro de los mecanismos de resistencia a los betalactámicos encontramos:

- **Producción de betalactamasas (Figura 4-a):** Las betalactamasas (Bla) son enzimas que logran hidrolizar el anillo betalactámico, lo que permite perder la actividad del antibiótico. Estas están codificadas por el gen *blaZ*, que en ausencia del antibiótico es inhibido por el represor *BlaI*. Una vez el microorganismo es expuesto al tratamiento con betalactámicos, se activa la producción de una proteína antirrepresora *BlaR1*, la cual degrada a *BlaI* (47).
- **Modificación del sitio diana. Síntesis de las PBP's modificadas (Figura 4-b):** Mecanismo de resistencia característico en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) que consiste en la síntesis de PBP's con baja afinidad para los betalactámicos. Los estafilococos producen al menos 4 diferentes proteínas que logran ser inhibidas por estos antibióticos (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4), sin embargo, los fenotipos MRSA expresan genes como *mecA* que codifican la proteína PBP2a, que tiene baja afinidad frente a estos fármacos (48).

Glicopéptidos: La vancomicina es un antibiótico que pertenece al grupo de los glicopéptidos y ha sido utilizado en el tratamiento de primera línea para infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*. Su mecanismo de acción conlleva a la inhibición de la síntesis de la pared uniéndose a la cadena peptídica específicamente en su último aminoácido (D-Ala).

Dentro de los mecanismos de resistencia a Vancomicina encontramos:

- **Modificación del sitio diana (Figura 4-b):** La resistencia a vancomicina la confiere el operón *vanA* que está compuesto por genes *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY*, y *vanZ*, el objetivo es sustituir los dos últimos residuos de

la cadena peptídica (D-Ala- D-Ala) por un depsipéptido D-Ala-D-Lac que son sintetizados por *vanA* y *vanH*, esta sustitución da como resultado la alteración de la pared celular, impidiendo la afinidad del fármaco con el aminoácido. Su funcionamiento es ligado por un sistema sensor-regulador (*vanS* y *vanR*) que tienen la capacidad de detectar el antibiótico y activar la transcripción del operón (49).

Antibióticos que actúan sobre la membrana celular

Daptomicina: Es un antibiótico utilizado para bacterias Gram positivas, su estructura es cíclica con un extremo hidrofóbico que le permite incorporarse en la membrana celular, donde se polimeriza y forma canales iónicos, alterando el potencial de membrana (50).

Dentro de los mecanismos de resistencia a daptomicina encontramos:

- **Modificación del sitio diana (Figura 4-b):** La resistencia a la daptomicina por *S. aureus* es mediada por el gen *mprF* que codifica una lisil-fosfatidilglicerol sintetasa. Esta enzima transfiere moléculas de lisina cargadas positivamente, el aumento de estas cargas da como resultado una fuerza de repulsión electrostática y disminuye la afinidad del lipopéptido con la membrana bacteriana (51).

Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas

Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas: Estos tres grupos son diferentes estructuralmente, pero comparten el mecanismo de acción al inhibir la síntesis proteica uniéndose a la subunidad 50S.

Dentro de los mecanismos de resistencia encontramos:

- **Modificación del sitio diana (Figura 4-b):** La activación de genes como *erm* que codifican enzimas metilasas, son uno de los principales mecanismos de resistencia para estos fármacos. Estas metiltransferasas utilizan la S-adenosil metionina para modificar una adenosina en el RNAr y conferir resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (52).
- **Bombas de eflujo (Figura 4-e):** El segundo mecanismo que *S. aureus* utiliza para resistir la actividad de estos fármacos, son bombas de eflujo que permite la eliminación del antibiótico al exterior de la célula (53).

Aminoglucósidos: Antibióticos de amplio espectro, que aumentan la tasa de error en la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esto conlleva a una finalización prematura de la proteína naciente, incorporación de aminoácido incorrecto o bloquear el inicio de la síntesis proteica.

Mecanismos de resistencia:

- **Modificación enzimática del antibiótico (Figura 4-c):** Mecanismo de resistencia que más se ha encontrado en *S. aureus* es la modificación enzimática por O-fosforilación, N-acetilación u O-nucleotidilación catalizada por fosfotransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) y nucleotidiltransferasas (ANT) (54).

Tetraciclinas: Inhibidores de la síntesis de proteínas, se unen a la subunidad 50S impidiendo la acomodación del ARNt-aminoacilo al sitio A del ribosoma.

Mecanismos de resistencia

- **Modificación del sitio diana (Figura 4-b):** El principal mecanismo de resistencia frente a este antibiótico en *S. aureus* es la protección ribosómica mediada por los genes *tetM* o *tetO* que codifican proteínas modificadoras de sitio diana mediante la protección del ribosoma (55).
- **Bombas de flujo (Figura 4-e):** Proteínas codificadas por genes *tetK* y *tetL* favorecen la expulsión activa del antibiótico al exterior de la célula, este sistema ha sido identificado como Tet38. Su regulación es mediada por el represor *MgrA* que actúa directa e indirectamente, ya que también regula algunos factores de virulencia, en la expresión de la multiplicidad en los transportadores de eflujo (56).

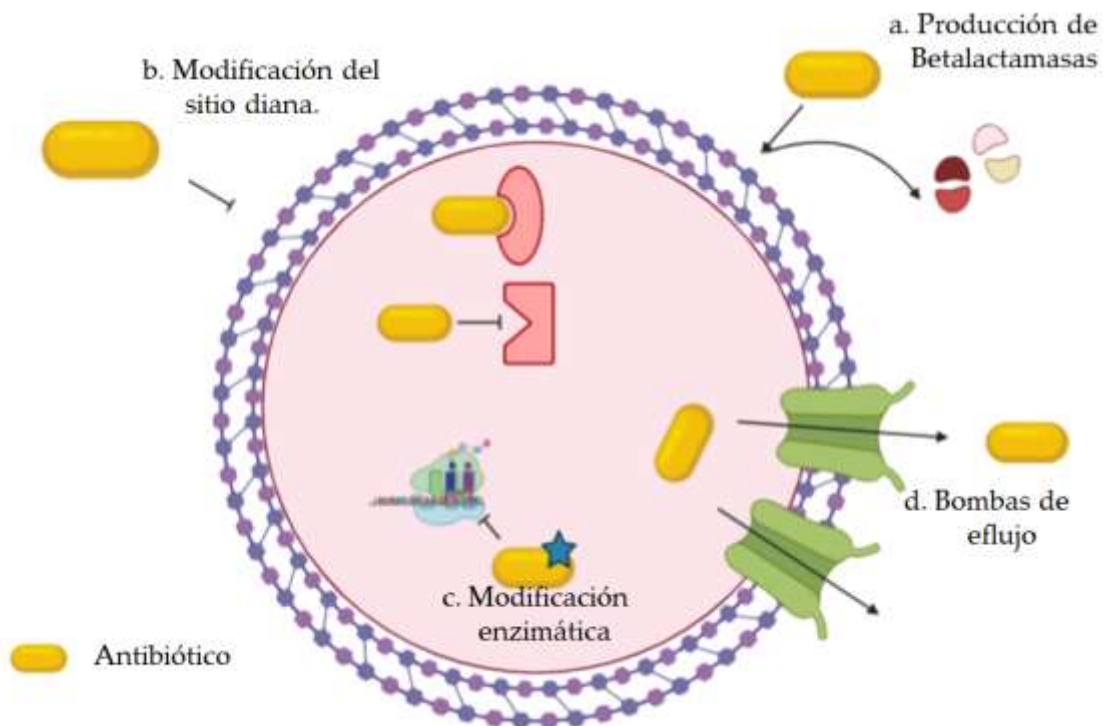


Figura 4. Mecanismos de resistencia frente a antibióticos encontrados en *S. aureus*

1.4.3. Generalidades de *Escherichia coli*

Este microorganismo Gram negativo, es un patógeno común en infecciones principalmente del tracto urinario y gastrointestinal. Esta bacteria tiene un tamaño aproximado de 1,1 – 1,5 μm de ancho y de 2,0 – 6,0 μm de largo, anaerobio facultativo, la presencia de flagelos les permite movilidad, y como característica importante es capaz de fermentar lactosa (57). Hace parte de la familia *Enterobacteriaceae* y es uno de los microorganismos que habitan como microbiota normal en el intestino de los seres humanos y animales (58), interviniendo en la contribución de absorción de nutrientes, por esta razón cuando son excretados al medio ambiente se considera un indicador de contaminación fecal. Existen diferentes serotipos de *E. coli* que han adquirido factores de virulencia y dependiendo del estado inmunológico del hospedero, pueden causar desde infección urinaria hasta sepsis y meningitis, dentro de ellos encontramos *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregante (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (59)(60).

En los últimos años se ha reportado esta bacteria como uno de los patógenos más resistentes a nivel mundial (7), especialmente en terapias antimicrobianas con ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina, entre otros (57). Según un informe publicado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en el año 2018, los continentes con mayores niveles de resistencia a los antibióticos son América y Europa, donde los fármacos que encabezan la lista, con porcentajes más altos son penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas (9). Según Theuretzbacher 2013, en América del norte los fenotipos de cepas

multirresistentes de *E. coli* que tienen la capacidad de producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE) pueden alcanzar tasas del 80% (25).

Un estudio en América Latina reporta que de 1.517 aislados de *E. coli* de diferentes países presentan porcentajes elevados de resistencia a antibióticos, como ciprofloxacina (40%), cefuroxima (24%) y ceftriaxona (24%), además bacterias productoras de BLEE alcanzaron porcentajes del 49% (61).

En Colombia, en el último boletín reportado por la Doctora Aura Lucía Leal, directora del grupo GREBO, *E. coli* es una de las bacterias más frecuentemente aisladas en los servicios de la red de hospitales; de 3.328 aislamientos de *E. coli*, el 15% son bacterias productoras de BLEE, el 37% resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim, 32% a ampicilina sulbactam y 22% a ciprofloxacina (46).

1.4.4. Mecanismos de resistencia de *E. coli*

Antibióticos Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

Betalactámicos: mecanismos de resistencia

- **Producción de betalactamasas (Figura 5-a):** Estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico de este grupo de antibióticos. Para *E. coli* se han identificados numerosas enzimas que le confieren resistencia. TEM-1 fue la primera penicilinasa encontrada con baja actividad frente a cefalosporinas. Posterior a esto se desarrollaron más betalactamasas a partir de una serie de mutaciones que afectan su centro activo (62). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) inactivan aminopenicilinas,

carboxipenicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de cualquier generación, en la actualidad *E. coli* se convirtió en la principal portadora de BLEE, especialmente CTX-M. (63)

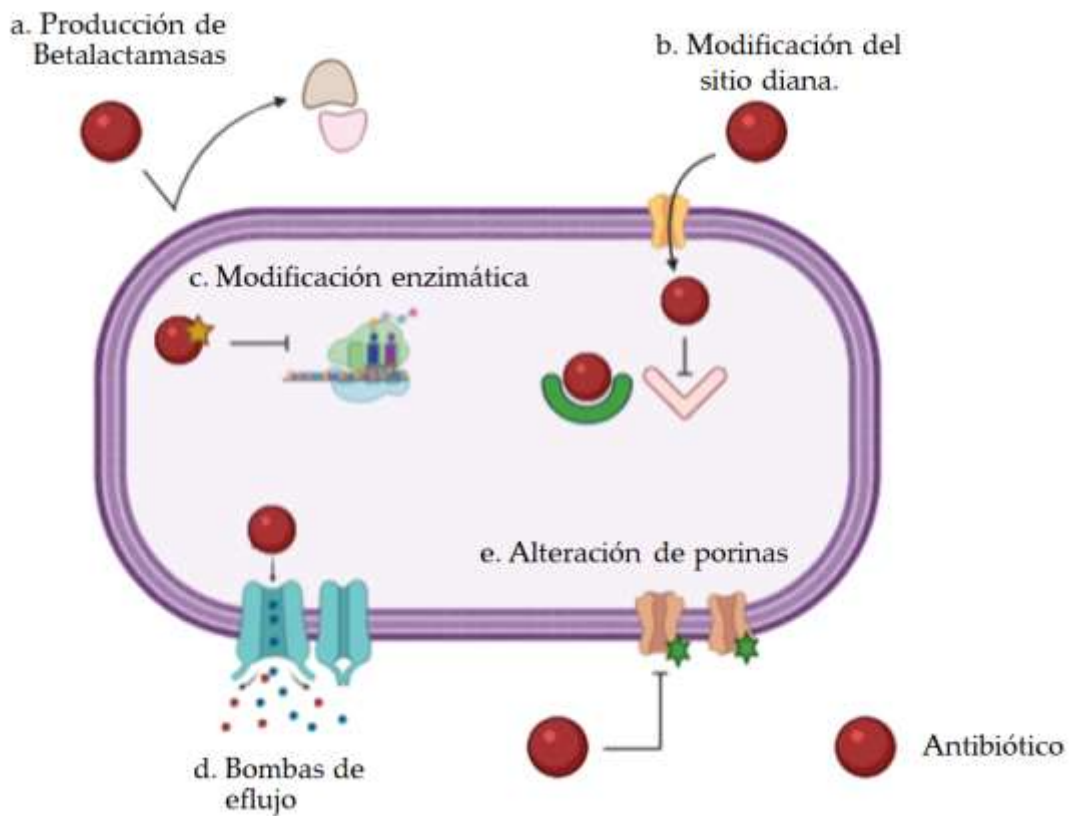


Figura 5. Mecanismos de resistencia frente a antibióticos encontrados en *E. coli*

Antibióticos con efecto sobre ácidos nucleicos

Quinolonas: Este fármaco inhibe la actividad de la DNA girasa que se encarga del superenrollamiento del DNA para el empaquetamiento dentro de la célula. Esta acción es mediada por la concentración en el citosol bacteriano, en *E. coli* su transporte es por medio de porinas que atraviesan la envoltura.

Mecanismos de resistencia:

- **Modificación del sitio diana (Figura 5-b):** Mecanismo identificado en *E. coli*, se basa en la expresión del gen *qnr* que codifican proteínas con pentapéptidos repetitivos posicionados en la estructura de la DNA girasa, impidiendo la interacción con la quinolona. (64)
- **Bombas de eflujo (Figura 5-d 5-e):** La sobreexpresión de proteínas que permitan la salida activa del antibiótico, es otro mecanismo encontrado en *E. coli*. El sistema AcrAB-TolC es característico en la familia de enterobacterias. Además, la disminución de la permeabilidad celular, generando mutaciones que alteren las porinas para la permeabilidad de la membrana externa, es un mecanismo común que acompaña las bombas de eflujo (65).

Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas

Aminoglucósidos: mecanismos de resistencia

- **Modificación del sitio diana (Figura 5-b):** Existen dos mecanismos que le permiten conferir resistencia modificando el sitio blanco, por un lado, mutaciones puntuales en el ribosoma y por otro la metilación ribosomal en la posición G1405 debido a la presencia de genes *armA*, *rmtA* y *rmtB*.
- **Modificación enzimática del antibiótico (Figura 5-c):** Son el mecanismo más frecuente de resistencia de los aminoglucósidos. La modificación del antibiótico mediado por enzimas (AAC-APH-ANT) catalizan reacciones que conllevan a la pérdida de la actividad del antibiótico. (66)

Antibióticos inhibidores de la síntesis del folato

Sulfonamidas y trimetoprim: Compuestos sintéticos que actúan sobre la ruta metabólica de la síntesis del folato. Las sulfonamidas son análogos del anillo p-aminobenzoico y su actividad se basa en la competencia por la enzima dihidropteorato sintetasa. El Trimetoprim tiene la capacidad de unirse a otra enzima, la dihidrofolato reductasa, e impiden la oxidación del ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico.

Mecanismos de resistencia:

- **Modificación del sitio diana (Figura 5-b):** La resistencia a estos fármacos se basa en la expresión de genes *sul1*, *sul2* y *sul3* que codifican la enzima mutante de dihidropteorato sintetasa que no pueden ser secuestrada por el antibiótico. Además, adquieren variedad de genes *dfr* que codifican diferentes formas de la enzima dihidrofolato reductasa (65)

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El efecto antibacteriano del péptido **LfcinB (20-25)**₄ en aislados clínicos multirresistentes será igual o mayor al reportado en cepas de referencia ATCC?

3. HIPÓTESIS

El péptido **LfcinB (20-25)₄** presentará actividad antibacteriana contra aislados clínicos multirresistentes.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana del péptido **LfcinB (20-25)₄** contra aislados clínicos multirresistentes de *S. aureus* y *E. coli*.

Objetivos específicos

- I. Caracterizar microbiológicamente los aislados clínicos de *E. coli* y *S. aureus*.
- II. Determinar la concentración mínima inhibitoria del péptido LfcinB (20-25)₄ en los aislados clínicos multirresistentes.
- III. Determinar la concentración mínima bactericida del péptido LfcinB (20-25)₄ en los aislados clínicos multirresistentes.
- IV. Determinar si existe interacción del antibiótico ciprofloxacina y el péptido LfcinB (20-25)₄ en los aislados clínicos multirresistentes seleccionados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño metodológico

Para dar cumplimiento a los objetivos de este proyecto se planteó el diseño metodológico que se muestra en la Figura 6.

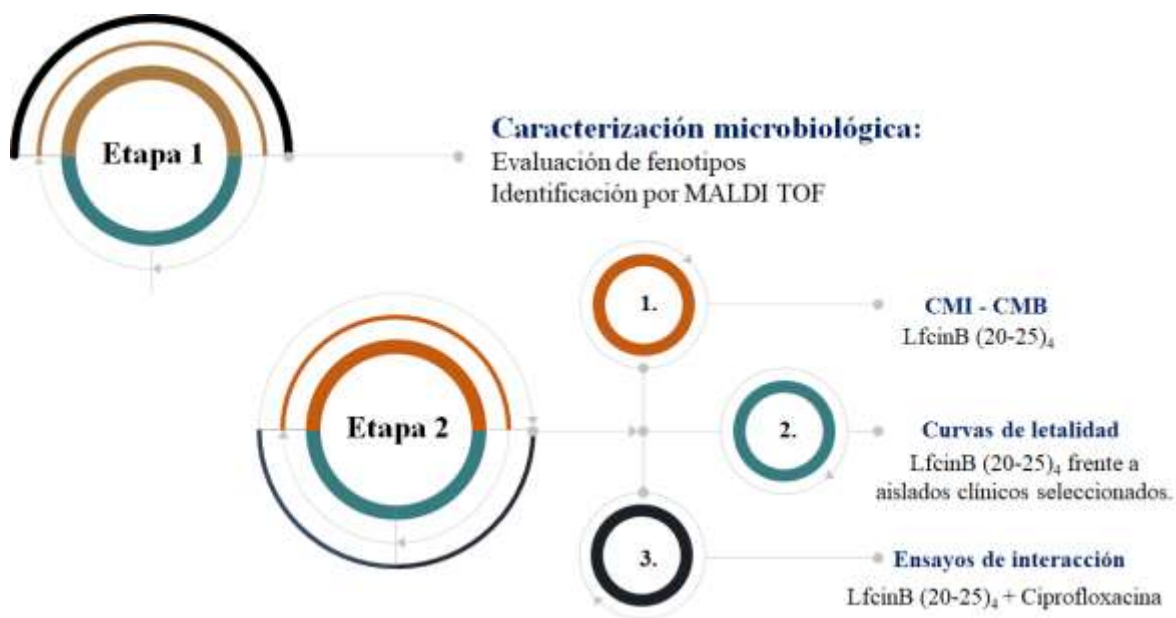


Figura 6. Diseño metodológico. Etapas de la investigación desarrollada.

Este diseño metodológico contempló dos grandes etapas: en la primera se llevaron a cabo pruebas de identificación y caracterización de perfiles de resistencia corroborando la viabilidad, pureza e identificación de especie de los aislados clínicos. En la segunda etapa se determinó la actividad antibacteriana del tetrámero LfcinB (20-25)₄ frente a los aislados clínicos, esta etapa involucró la evaluación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) del péptido frente a todos los aislados clínicos ya identificados y clasificados. Adicionalmente se realizaron ensayos de interacción del péptido y un antibiótico, para esta prueba se

seleccionaron aislados sensibles al péptido y resistentes al antibiótico. Finalmente, en esta etapa se construyeron curvas de letalidad, para los aislados multirresistentes seleccionados. A continuación, se describen los métodos empleados durante el desarrollo de este proyecto

5.2. Aislados clínicos bacterianos

Se recibieron treinta y cuatro aislados clínicos de *S. aureus* y *E. coli* en medio de cultivo Skim Milk congelados, estos se obtuvieron del Instituto Nacional de Cancerología por medio de la Doctora Aura Lucía Leal, con previa identificación microbiológica y estudio de antibiograma que los clasificaba como resistentes a diferentes antibióticos. Para dar inicio al presente proyecto se corroboró el perfil de resistencia para todos los aislados, mediante el método de VITEK, análisis que fue realizado en un laboratorio clínico de referencia (IDIME). Los aislados se clasificaron como sensibles, resistentes y multidrogoresistentes, teniendo en cuenta los datos suministrados.

5.3. Análisis de los aislados clínicos por técnicas microbiológicas

Para la totalidad de los aislados clínicos se confirmó la pureza, viabilidad e identificación, para ello se sembraron en los siguientes medios de cultivo y se incubaron a 37° C por 24 h:

- Agar nutritivo que es un medio de cultivo no selectivo y que aporta los nutrientes suficientes para el crecimiento de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos.

- Agar Sangre para los aislados Gram positivos observando su reacción de hemólisis.
- Agar McConkey para Gram negativos, corroborando la fermentación de lactosa.

5.4. Caracterización de los aislados clínicos por espectrometría de masas

MALDI-TOF

La identificación de los aislados clínicos se realizó por medio de MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo), que permite generar un espectro de masas característico de cada especie microbiana. Una pequeña cantidad de colonia del pre-inóculo, se depositó uniformemente sobre la placa de acero dejando secar a temperatura ambiente, posterior a esto se agregó 1 μ L de matriz, ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (solución saturada), Figura 7. (67)



Figura 7. Siembra de la muestra para análisis MALDI-TOF de los aislados (67)

La placa (portamuestras) se colocó dentro de la cámara del equipo MALDI-TOF Biotyper y mediante disparos por el láser de nitrógeno, se ionizó la muestra, arrojando un espectro de masas que es comparado con la base de datos FlexAnalysis (68). Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta el puntaje (*score*)

donde valores entre 2,300 a 3,000 representan alta probabilidad de identificación de especie, de 2,000 a 2,299 identificación segura del género y probable de la especie, de 1,700 a 1,999 identificación probable del género y 0,0 a 1,699 identificación no confiable (Tabla 2). Estos valores son obtenidos de la proporción de señales (*m/z*) adquiridas en el espectro de masas de los aislados, comparando con los espectros de la base de datos (69). Los espectros obtenidos para cada aislado son analizados por el software biotyper 3.1 y comparados, como resultado de este análisis, se generan gráficos, dendrogramas, que describen el agrupamiento aproximado de cepas por similitud de las proteínas ribosómicas (70).

Tabla 2. Clasificación del puntaje (score) obtenido por MALDI-TOF (67)

Puntaje (rango)	Descripción	Símbolos	Color
2,300 ... 3,000	Identificación de especie: Altamente probable	(+++)	Verde
2,000 ... 2,299	Identificación del género: segura	(++)	Verde
	Identificación de especie: Probable		
1,700 ... 1,999	Identificación del género: Probable	(+)	Amarillo
0,000 ... 1,699	Identificación no confiable	(-)	Rojo

5.5. Péptido LfcinB (21-25)₄

El péptido tetramérico LfcinB (21-25)₄ fue sintetizado por el grupo de investigación SAMP utilizando la metodología de síntesis en fase sólida (SPPS) y la estrategia Fmoc/tBu. El péptido fue purificado por cromatografía en columna, RP-SPE y caracterizado por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría

de masas MALDI-TOF. Esta molécula fue proporcionada por el grupo SAMP para la presente investigación.

5.6. Actividad antibacteriana

5.6.1. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue evaluada según CLSI por medio de microdilución en caldo con una placa de 96 pocillos (71). Se inició ajustando un pre-inóculo bacteriano sembrado en Agar Tripticasa Soya e incubando a 37° C por 24 h, se suspendieron dos o tres colonias en solución salina estéril a 0,95% para ajustar la turbidez espectrofotométricamente a una escala de 0,5 McFarland y luego se diluyó a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL en agua peptonada (72). Se dispensaron 90 μ L de caldo Mueller Hinton (MH) y 90 μ L del péptido, los cuales fueron diluidos en soluciones seriadas desde 200 hasta 6,2 μ g/mL (n=2) como lo indica la Figura 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
A1	B	200	100	50	25	12,5	6,2		CC			C-
	C								C+			CE
A2	D	200	100	50	25	12,5	6,2		CC			CE
	E								C+			CE
A3	F	200	100	50	25	12,5	6,2		CC			C-
	G								C+			CE
	H											

Figura 8. Distribución del plato multipozos para determinar la CMI. **A1:** Aislado #1 – **A2:** Aislado #2 – **A3:** Aislado #3

En los reportes de actividad antibacteriana es ideal que los resultados de CMI y CMB se encuentren en unidades μM , para tener en cuenta la masa del péptido tetramérico (4594,64). A continuación se presenta una tabla con las conversiones de $\mu\text{g}/\text{mL}$ y μM del péptido tetramérico.

Tabla 3. Tabla de conversión de unidades de entre $\mu\text{g}/\text{mL}$ y μM del péptido LfcinB (20-25)₄

$\mu\text{g}/\text{mL}$	μM
200	44
100	22
50	11
25	5
12,5	2,5
6,25	1,25

Para los controles se utilizaron, caldo MH con el inóculo bacteriano para corroborar el crecimiento de cada aislado (CC), con agua destilada como control negativo (C-), control del péptido con cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (C+) y un control de esterilidad evaluando el agua destilada, agua peptonada y el caldo MH (CE). A continuación, se incubó a 37° C por 24 h, transcurrido este tiempo se realiza la lectura de crecimiento con densidad óptica de 620 nm. La CMI se define como la última concentración donde el péptido inhibe el crecimiento o desarrollo bacteriano (23).

5.6.2. Concentración mínima bactericida

La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la mínima concentración donde se reduce el crecimiento bacteriano en un 99,9% y para determinarla, se

transfirió una pequeña parte del cultivo de la 2×CMI, CMI, y 0,5×CMI (Figura 9) de la placa de 96 pocillos en agar MH, se incubó a 37° C por 24 h.

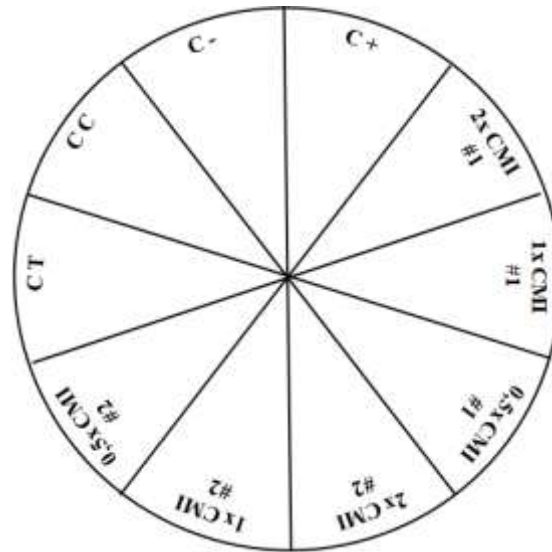


Figura 9. Plantilla de la caja de petri. Distribución de la CMB teniendo en cuenta la CMI del péptido y sus controles.

5.6.3. Ensayo de interacción entre LfcinB (20-25)₄ y ciprofloxacina

El ensayo de interacción entre el antibiótico y el péptido tetramérico, se realizó por medio del método de tablero de ajedrez, el cual consiste en dispensar 25 µL de antibiótico y 25 µL de péptido a concentraciones de 2×CMI, 1×CMI, 0,5×CMI, 0,25×CMI, 0,12×CMI y 0,06×CMI para cada uno (Figura 10), se adiciona 50 µL del inóculo bacteriano ajustado a la escala de 0,5 McFarland como se describió anteriormente. Posteriormente se realizó la primer lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a la hora 0 y a la hora 24 posterior a la incubación por 37° C (73). Para los controles se utilizaron los mismos parámetros que el método de microdilución en caldo.

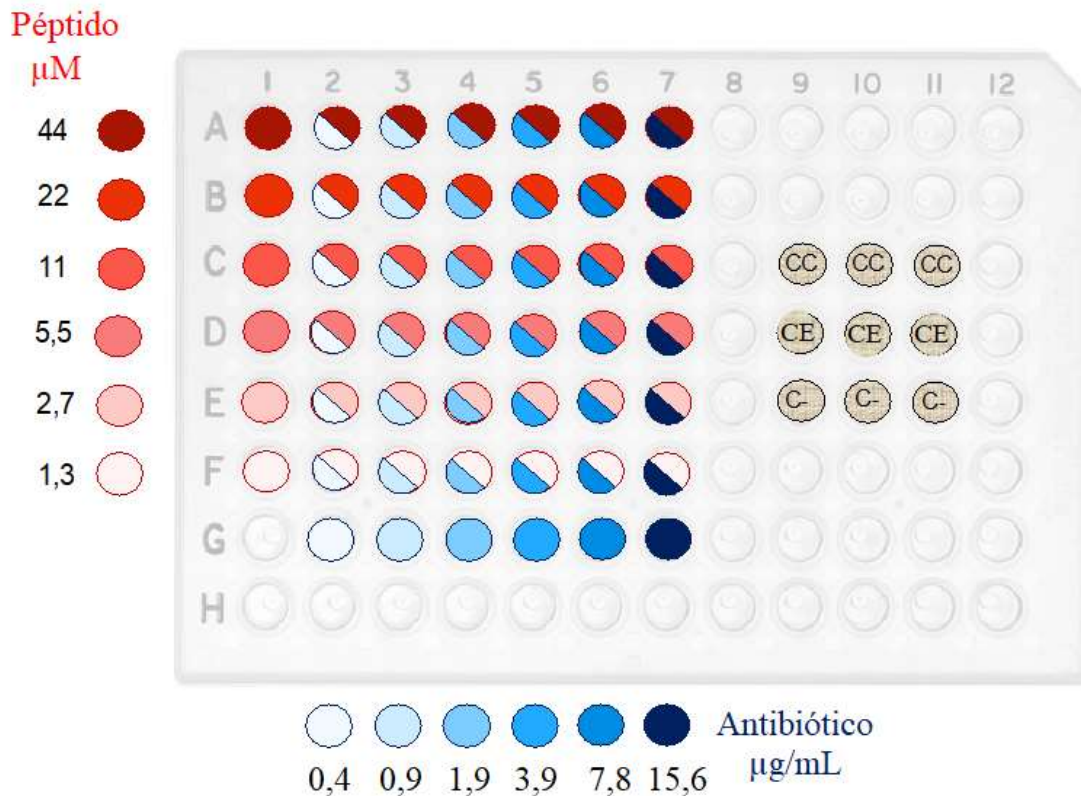


Figura 10. Distribución de la placa en el método de tablero de ajedrez

5.6.4. Curvas de letalidad

Se realizaron curvas de letalidad a los aislados clínicos seleccionados, siguiendo el protocolo para determinar la actividad bactericida de agentes antimicrobianos con algunas modificaciones. En la placa multipozos, se adicionó 50μL del péptido tetramérico a concentraciones de 2×CMI, 1×CMI, 0,5×CMI, 0,25×CMI, 0,12×CMI y 0,6×CMI en caldo MH. Posterior a esto, se dispensaron 50μL de inóculo bacteriano a una concentración de 5×10⁵ UFC/mL. Se incubó a 37° C por 24h en el equipo Bioscreen a 600nm programado para una lectura cada hora (74). Se tuvieron en cuenta: el control de crecimiento, control de esterilidad y control positivo descritos anteriormente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ETAPA 1 – Caracterización microbiológica

Para el desarrollo de este proyecto se recibieron treinta y cuatro aislados clínicos en medio de cultivo de conservación Skim Milk, dieciocho aislados clínicos rotulados como *Escherichia coli* y dieciséis aislados clínicos como *Staphylococcus aureus*. Para caracterizar las cepas bacterianas recibidas, se sembraron los aislados Gram positivos en agar Sangre (48) y los Gram negativos en agar MacConkey, que permite determinar la capacidad que tienen estos microorganismos para fermentar carbohidratos.

Para el 100% de los aislados de *S. aureus* en la coloración de Gram, se evidenciaron cocos Gram positivos, agrupados en racimos, además, se observó crecimiento óptimo en agar nutritivo y en agar sangre, las colonias presentaron una coloración marrón, redondas y cremosas, lo que es una característica esencial en esta especie.

Para los aislados clínicos Gram negativos se observó un crecimiento significativo en todos los casos una vez sembrado en agar nutritivo; en dieciséis de los cultivos se observaron colonias aisladas, medianas y circulares, con coloración rosada (Figura 11A), lo cual indicó que las bacterias son fermentadoras de lactosa, característica común dentro de la clasificación de *E. coli*. En dos aislados, se observaron colonias con una coloración amarilla, lo que nos permite definirlos como microorganismos no fermentadores de lactosa (Figura 11B). *E. coli* es un

microorganismo comensal, que se caracteriza por las múltiples variaciones biológicas presentando cepas inocuas y otras altamente patógenas. El proceso de identificación se realiza mediante pruebas bioquímicas y dentro de las cuales se encuentra la fermentación de lactosa y la descomposición de triptófano en indol (75), esto lo hace diferente de otros microorganismos asociados con infecciones del tracto urinario (76). Desde una perspectiva clínica, es importante obtener una identificación microbiológica correcta para llevar a cabo un tratamiento óptimo y no contribuir con el desarrollo de cepas resistentes; en este caso, el hecho que nos enfrentemos a cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa nos permite pensar en que esta clasificación bioquímica puede llevar a errores y muestra quizás la posibilidad biológica de este microorganismo de presentar estos cambios, faltan estudios que describan la prevalencia de estos fenotipos atípicos de *E.coli*. Teniendo en cuenta esto, se realizó la identificación por medio del equipo MALDI-TOF MS ya que su metodología es basada en un sistema de identificación de proteínas (77) (independientemente de la fermentación de lactosa) y así aclarar cualquier discrepancia que se tuviera en su identificación.

A continuación, se presentan algunos estudios disponibles que evalúan la prevalencia de cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa (*Lac-*). En el año 1995 se reportaron los primeros casos de *E. coli Lac-* (atípicas), allí se informa una prevalencia del 12,4% de 210 aislados clínicos de pacientes en un hospital de la India, además concuerdan con fenotipos de bacterias resistentes a antibióticos principalmente frente a ampicilina (78) Un estudio del año 2003 detectó el 6,3% de *E. coli Lac-* de 220 aislados clínicos urinarios (79); en el 2010, de 1440 aislados clínicos de un Hospital de la India se informó el 9% de fenotipos atípicos, donde los

porcentajes más altos de resistencia antimicrobiana en estas cepas se encontraban frente a betalactámicos (89%), quinolonas y fluoroquinolonas específicamente a ofloxacina (85%) y ciprofloxacina (79%) respectivamente (80) y en el año 2016 de 110 aislamientos identificados como *E. coli* el 3,6% pertenecían a microorganismos atípicos en muestras de orina (81).

Otros estudios con entornos similares, reportan porcentajes cercanos a los anteriormente descritos, en el año 2017 evalúan la prevalencia de *E. coli Lac* – y su resistencia a antibióticos en mujeres embarazadas y recién nacidos, reportan porcentajes más altos de resistencia a betalactámicos como ticarcilina con ácido clavulánico (19%) y Sulfonamidas (10%) (82). La mayor prevalencia de no fermentadores se observó en el estudio de Chang y colaboradores en el año 2014, de 166 cepas aisladas el 19,7% eran fenotipos atípicos, además encontraron porcentajes altos de resistencia especialmente en estos microorganismos, prevaleciendo la resistencia a ciprofloxacina (66,7%) (83). En los resultados de nuestro estudio, el 12% de aislados clínicos Gram negativos se identificaron como *E. coli Lac*- y pertenecían a los microorganismos con fenotipos multirresistentes, fueron resistentes a betalactámicos y cefalosporinas (ampicilina, ampicilina sulbactam, ceftazidima, ceftriaxona), aminoglucósidos (gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino y norfloxacino) y sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim), estos resultados están relacionados con los estudios anteriormente descritos, el cual se asocia el fenotipo atípico con la resistencia antibióticos.

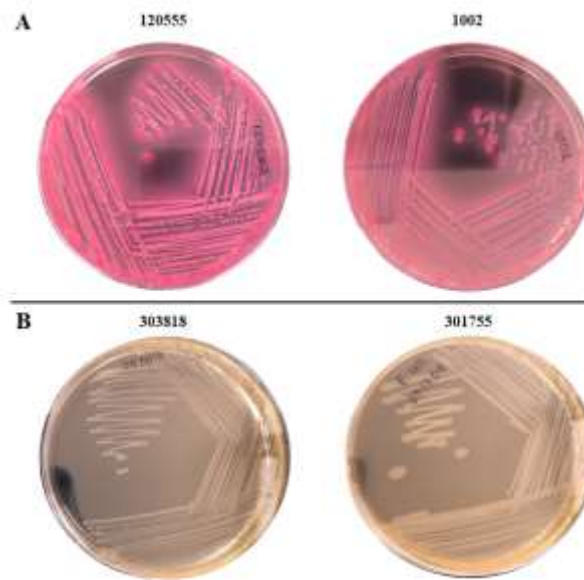


Figura 11. Fermentación de lactosa en algunos aislados clínicos de *E. coli* en agar MacConkey. Ejemplo de cultivos fermentadores (A) y no fermentadores (B) de lactosa.

Para todos los aislados se realizó una evaluación de los perfiles de resistencia por medio del método de VITEK. En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos, los cuales permitieron clasificar los aislados como: sensibles, resistentes, multidrogosresistentes.

El aumento más alarmante en la resistencia a los antibióticos en humanos en la última década, se ha relacionado con los mecanismos de resistencia de las bacterias que a menudo involucran la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, como β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (68)(84). Las β -lactamasas se describieron por primera vez en *Staphylococcus aureus* como factores que causan resistencia a la penicilina, dentro de este contexto, en la Figura 12-A, se puede evidenciar que todas las cepas bacterianas identificadas como *S. aureus* son productoras de betalactamasas y por consiguiente resistentes a la penicilina.

Tabla 4. Clasificación de los aislados clínicos

A.		B.	
Aislados de <i>S. aureus</i>		Aislados de <i>E.coli</i>	
Código	Resistencia a Clasificación	Código	Resistencia a Clasificación
1001	P	1004	0 Sensible
1007	P	118664	0
108751	P	220555	CEF Intermedio
109095	P	129783	SXT
122725	P	109637	AM
123629	P	1012	AM, SXT
124688	P Resistente	119681	AM, SXT
130720	P	130822	AM, SXT Resistente
109584	P, TET	219609	AM, SXT
113754	P, TET	117737	AM, SAM
117719	P, TET	1002	AM, SAM, SXT
118731	P, TET	129797	AM, CEF, SAM
120607	P, TET	201719	AM, CEF, SAM, SXT
129039	P, TET	1006	AM, CAX, CAZ, CPE, NOR, SAM
110635	P, ERY, TET Multirresistente	121807	AM, CEF, GEN, NOR, SAM, SXT
124653	P, ERY, TET	303818	AM, CAX, CIP, CPE, NOR, SXT
		1016	AM, CAX, CAZ, CPE, NOR, SAM, SXT
		301755	AM, CAX, CAZ, CIP, CPE, GEN, NIT, NOR, SAM, SXT

La clasificación de los aislados clínicos se resume en la Tabla 4. Nuestros resultados evidencian que los aislados de *E. coli* no fermentadores de lactosa, 301755 y 303818 son multirresistentes y son adicionalmente los únicos aislados que presentan resistencia a Ciprofloxacina (CIP). Este resultado concuerda con estudios previos que señalan que el comportamiento como bacterias no fermentadoras de lactosa en aislados de *E. coli* puede estar relacionado con la resistencia que han desarrollado los microorganismos frente a los antibióticos, específicamente en el estudio realizado en Corea donde identificaron alta resistencia a ciprofloxacino en *E. coli* Lac-, probablemente por la deficiencia de la permeasa de lactosa codificada por el gen *lacY*. A diferencia de la tasa de producción de BLEE que fue similar a los fermentadores de lactosa (83). Nuestros resultados concuerdan con los estudios a nivel nacional y mundial, donde se indican las altas tasas de resistencia a los antibióticos betalactámicos y la producción de betalactamasas de espectro extendido

(68). Por otro lado, como se observa en la Tabla 4B, los aislados de *E. coli* se clasificaron como sensibles (dos), intermedios (uno), resistentes (nueve) y multirresistente (seis).

En los últimos años, la espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF ha demostrado ser una opción sólida para la identificación microbiana a través de la comparación de los perfiles de espectros de masas de las proteínas citoplasmáticas. Esta técnica proporciona una identificación más rápida que los métodos moleculares tradicionales, y su utilidad ha sido evaluada en muchos grupos taxonómicos, y se ha demostrado la viabilidad del análisis por MALDI-TOF para identificar y diferenciar patógenos bacterianos a nivel de especie (68)(84)(85)(86)(87)(88). Dentro de este contexto, una vez se corroboró la viabilidad de los treinta y cuatro aislados clínicos y se clasificaron según su resistencia a los antibióticos, se decidió analizar los aislados por espectrometría de masas MALDI TOF para la identificación de la especie, se empleó un equipo MALDI TOF y software Biotyper de Bruker Daltonics™. El sistema empleó valores de puntuación para comprobar la confiabilidad de la identificación, según lo descrito en la Tabla 5 (67). El 100% de los aislados se lograron identificar con puntajes altos (*score*), que varió entre 2,061 y 2,459, indicando la alta probabilidad de identificación del género y la especie, en la Tabla 5 se presenta el puntaje obtenido para cada aislado, ordenados de menor a mayor.

Tabla 5. Puntaje de identificación por MALDI-TOF MS obtenido para los aislados clínicos

Puntaje	Aislado código	Símbolo	Microorganismo (Mejor ajuste)	Puntaje	Aislado código	Símbolo	Microorganismo (Mejor ajuste)
2,221	1007	(++)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,061	1016	(++)	<i>Escherichia coli</i>
2,258	1001	(++)		2,157	219606	(++)	
2,272	123629	(++)		2,168	120555	(++)	
2,292	124653	(++)		2,168	201719	(++)	
2,293	118731	(++)		2,910	109637	(++)	
2,329	130720	(+++)		2,253	1002	(++)	
2,339	129030	(+++)		2,256	121807	(++)	
2,358	110635	(+++)		2,262	117737	(++)	
2,358	129095	(+++)		2,311	303818	(+++)	
2,368	124653	(+++)		2,321	301755	(+++)	
2,376	120607	(+++)		2,325	130522	(+++)	
2,378	108751	(+++)		2,341	129797	(+++)	
2,384	109584	(+++)		2,349	1004	(+++)	
2,388	113754	(+++)		2,354	118664	(+++)	
2,417	122725	(+++)		2,374	1006	(+++)	
2,459	124688	(+++)	2,385	119681	(+++)		
			2,386	129783	(+++)		
			2,443	1012	(+++)		

Con los datos de los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF MS, para la identificación de los aislados, se realizó un análisis generando dendrogramas, que son representaciones gráficas que agrupan los datos (*en conglomerados*) en un diagrama en forma de árbol. Los datos se organizan en categorías según su similitud o diferencias entre los espectros de masas, entre más largo el cuadrado de similitud, mayores diferencias existen entre los datos (89). El objetivo de esto, era saber si existía una clonalidad dentro de nuestros aislados clínicos Gram positivos y Gram negativos, teniendo en cuenta que venían de una misma institución. Para la realización de este gráfico se recomienda tener en cuenta valores de puntuación mayores de 2,000 (90), requisito que cumplen todos los datos generados para los

aislados. En las Figuras 13 y 14 se presentan los dendrogramas obtenidos para los aislados de *S. aureus* y de *E. coli*, respectivamente.

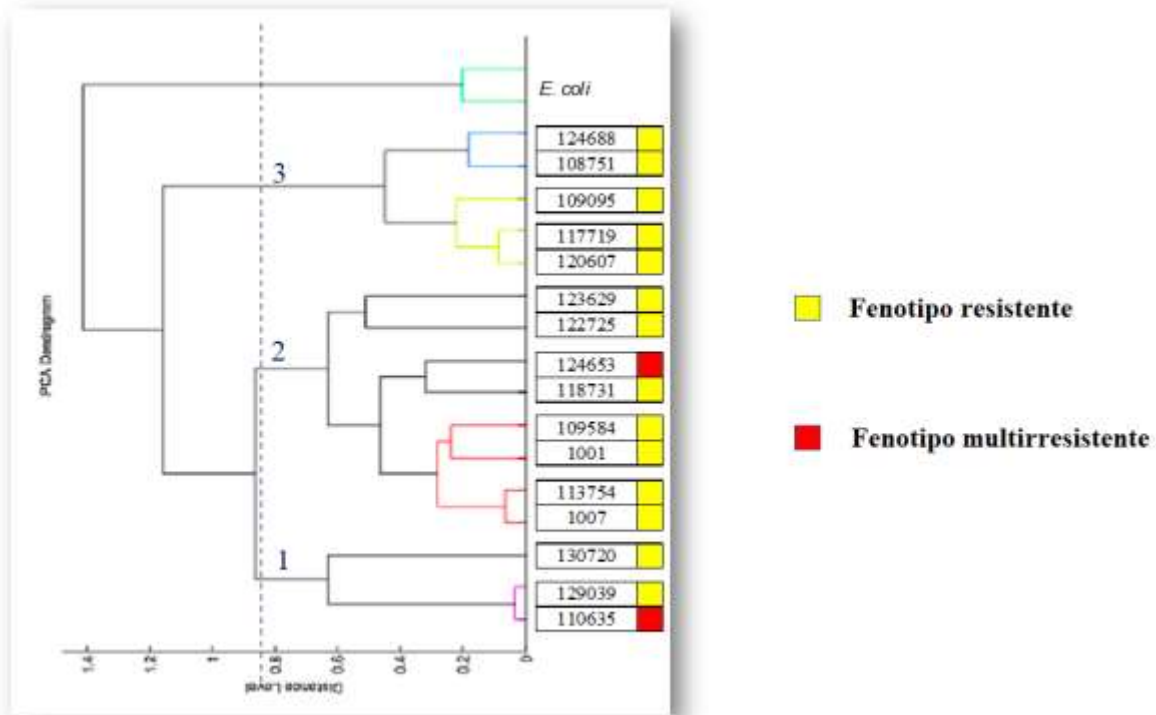


Figura 13. Dendrograma obtenido del análisis MALDI-TOF MS de los aislados identificados como *S. aureus*

En el dendrograma generado para los aislados identificados como *S. aureus* se puede evidenciar la agrupación de tres grandes conglomerados identificados con los números del 1 al 3 (Figura 13), estos están bien diferenciados de acuerdo con un corte arbitrario en el nivel de distancia 0,8; se empleó un grupo externo (*outgroup*) de *E. coli* que es el cuarto grupo con la distancia más alta, este se utiliza como un control de diferenciación.

En la Figura 14 se presenta el dendrograma generado para aislados de *E. coli*, donde se observan cuatro conglomerados (numerados de 1 a 4) usando el mismo nivel de distancia arbitrario de 0,8, además un grupo externo de *S. aureus* como control de diferenciación.

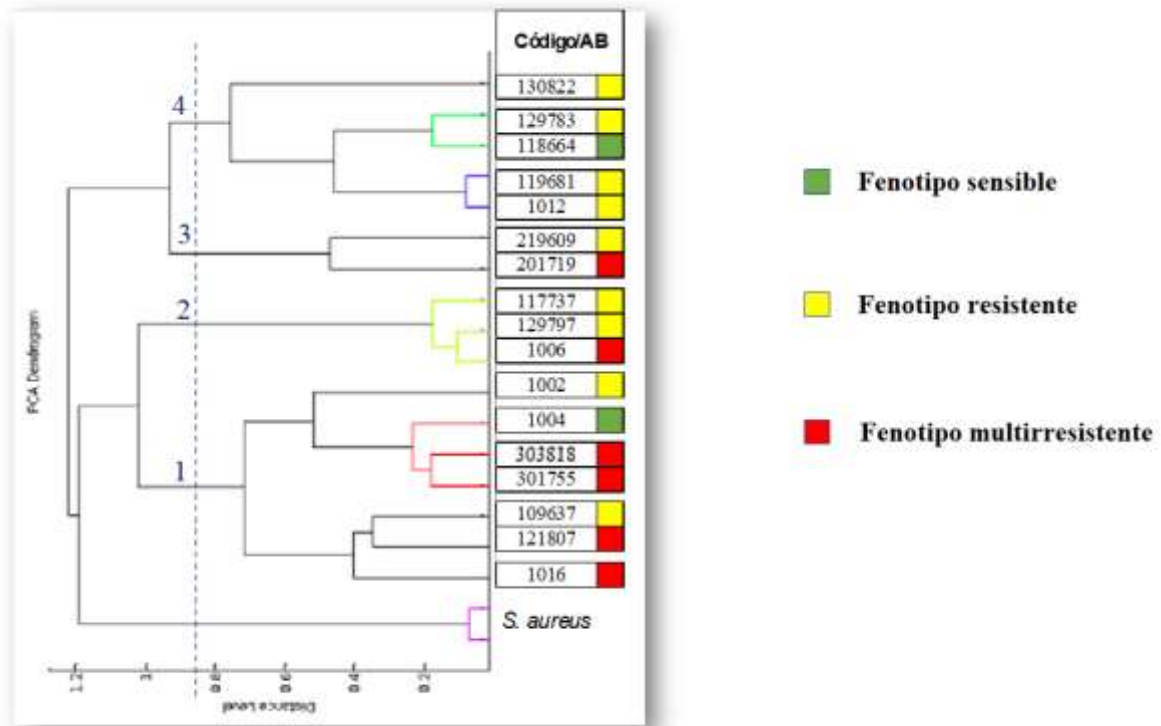


Figura 14. Dendrograma obtenido del análisis MALDI-TOF MS de los aislados identificados como *E. coli*, conglomerados numerados del 1 al 4.

Finalmente, los resultados del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de los aislados nos permiten corroborar que este método es muy eficaz para identificación bacteriana, determinando género y especie (91). Sin embargo, en ninguno de nuestros aislamientos Gram positivos, la asociación está relacionada netamente con los perfiles de susceptibilidad como se puede observar en la Figura 13. Para los resultados en *E. coli*, se logran identificar dos aislados clínicos (303818 –

301755) que comparten en su mayoría su fenotipo (perfil de susceptibilidad y la deficiencia de fermentar lactosa) y se logran agrupar en un subgrupo con distancias muy cortas de similitud (Figura 14). En los aislados restantes, aproximadamente 88,8% se logró observar asociaciones basadas en el perfil de susceptibilidad, es importante tener en cuenta otras características fenotípicas y genotípicas que los estén asociando con altas similitudes.

6.2. ETAPA 2 – Actividad antibacteriana

Desde 2015 el grupo de investigación SAMP ha venido evaluando la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB, dentro de esta línea de investigación el grupo encontró que la polivalencia aumenta la actividad de los péptidos y particularmente sobresale la actividad del tetrámero LfcinB (20-25)₄, que contiene en su estructura cuatro copias de la secuencia RRWQWR, reportada como motivo mínimo de actividad de LfcinB. Este péptido tetravalente o tetramérico ha presentado actividad bactericida y bacteriostática contra cepas de referencia Gram positivas y Gram negativas y ha presentado sinergia con algunos antibióticos (21)(36)(92)(22)(23). Adicionalmente, LfcinB (20-25)₄, presentó actividad frente a algunos aislados clínicos de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (41)(42). Dentro de este contexto, para este proyecto se evaluó la actividad antibacteriana de LfcinB (20-25)₄ contra los aislados de *S. aureus* y *E. coli* identificados y clasificados según su perfil de resistencia a antibióticos. Los resultados obtenidos de las CMI y CMB son tabulados y graficados en las Figuras 15 y 16.

6.2.1. Actividad antibacteriana de LfcinB (20-25)₄ contra los aislados clínicos de *S. aureus*

El tetrámero LfcinB (20-25)₄ presentó una alta actividad antibacteriana contra los aislados clínicos de *S. aureus*, resistentes y multirresistentes, con valores de CMI entre 11 y 22 μM (Figura 15). Se puede observar que algunos aislados clínicos con patrones de resistencia clasificados como resistentes, tienen mayor sensibilidad al péptido presentando CMI de 11 μM en comparación con la cepa de referencia ATCC 25923, casualmente aislados que son productores de betalactamasas han obtenido susceptibilidad a menores concentraciones del péptido que en comparación con otros; para el caso de cepas con resistencia a dos o más familias de antibióticos, entre ellas penicilinas, macrólidos y tetraciclinas, presentaron CMI de 22 μM como lo podemos observar en la figura 15, concentración que se mantiene al compararla con nuestra cepa de referencia.

Clasificación	Código	CMI	CMB
		$\mu\text{g/mL}$ (μM)	$\mu\text{g/mL}$ (μM)
Resistente	1001	50 (11)	200 (44)
	1007	50 (11)	>200 (44)
	108751	50 (11)	50 (11)
	109095	50 (11)	>200 (44)
	122725	50 (11)	200 (44)
	123629	50 (11)	200 (44)
	124688	50 (11)	100 (22)
	130720	50 (11)	200 (44)
	109584	100(22)	100 (22)
	113754	50 (11)	200 (44)
	117719	50 (11)	50 (11)
	118731	100(22)	200 (44)
	120607	50 (11)	200 (44)
	129039	50 (11)	200 (44)
Multirresistente	110635	100(22)	100 (22)
	124653	100(22)	200 (44)
Referencia	ATCC 25923	100(22)	100 (22)

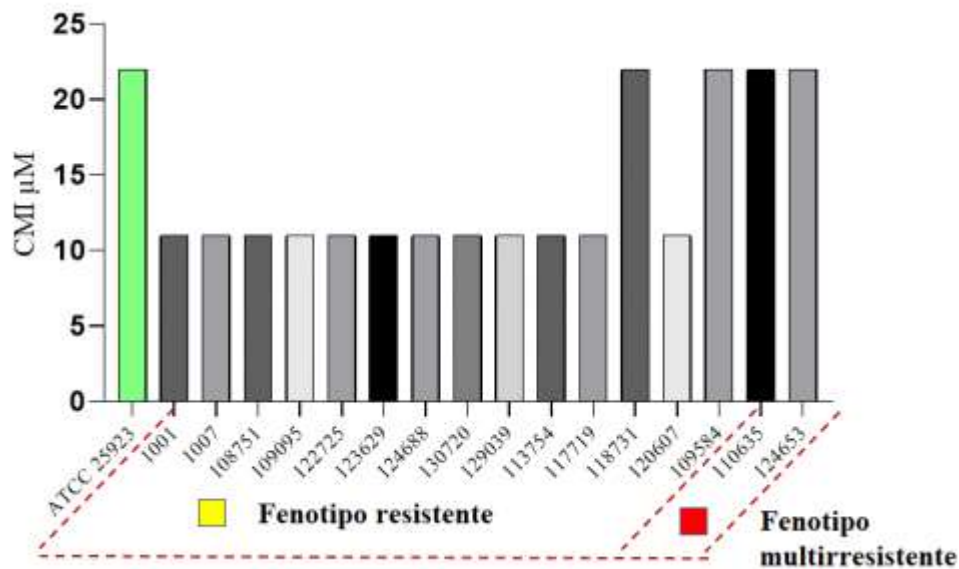


Figura 15. Concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) de LfcinB (20-25)₄ contra a los aislados de *S. aureus*.

Se puede observar que los aislados clínicos fueron sensibles al péptido a valores de CMI muy cercanos a la observada para la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 (21). Esto permite sugerir que los mecanismos empleados por las bacterias para generar resistencia a los antibióticos no están bloqueando el mecanismo de acción del tetrámero.

Los resultados de la determinación de la CMB, muestran que el tetrámero LfcinB (20-25)₄ presenta efecto bactericida para catorce de los dieciséis aislados de *S. aureus*, con valores que varían entre 11 y 44 µM. Se encontró que el 56% de los aislados clínicos presentan una CMB de 44 µM, el 19% un valor de 22 µM y el 12 % una CMB de 11µM; solo para los aislados clínicos 1007 y 109595, no se encontró efecto bactericida en la concentración máxima usada en el ensayo, 200 µg/mL (44 µM). En el caso de 109095, 117719, 109584 y 110635 se logró evidenciar que las

concentraciones inhibitorias lograban destruir la población bacteriana en un 99,9%, queriendo decir esto que conserva la CMI al tener un efecto bactericida. Los aislados 108751 y 117719, presentaron la mayor sensibilidad a LfcinB (20-25)₄, el primer aislado está clasificado como resistente a penicilina y el segundo como multirresistente (penicilina y tetraciclina), estos dos aislados están en el conglomerado o grupo 3 del dendrograma generado con los datos del análisis por MALDI-TOF MS (Figura 13).

La evaluación de la actividad del péptido tetramérico contra cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923) fue evaluada por Vargas y colaboradores (21)(23), y se determinaron los valores de CMB de 22 y 25 μM y la actividad bacteriostática del tetrámero fue de 22 μM y bactericida de 44 μM . Vega y colaboradores en el año 2018 determinaron la CMI: 5 μM y CMB: 44 μM del tetrámero frente a aislados resistentes de *S. aureus* (oxacilina y clindamicina) (41), en otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación evaluaron el péptido tetramérico frente a cepas de referencia de *S. aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591), se reportaron valores de CMI y CMB de 12,5 μM (42), valores cercanos a los resultados hallados en nuestro estudio, el cual los aislados clínicos con fenotipos sensibles, resistentes y multirresistentes son susceptibles a CMI y CMB que varía entre 11 μM y 44 μM .

En 2010, se hizo la evaluación de un péptido derivado de la Lactoferrina Bovina LfcinB (17-30): FKRRWQWRMKKLG frente aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), en este caso reportan una CMI de 40 μM , lo que nos permite sugerir que la polivalencia del péptido tetramérico hace un efecto

antibacteriano mayor frente a aislados clínicos con fenotipos resistentes y multirresistente que péptidos lineales (93)

6.2.2. Actividad antibacteriana de LfcinB (20-25)₄ contra los aislados clínicos de *E. coli*

El péptido LfcinB (20-25)₄ presentó alta actividad antibacteriana contra los aislados clínicos de *E. coli*, se obtuvieron CMIs entre 5 μ M y 22 μ M (Figura 15), específicamente, (i) para los aislados clasificados como fenotipos sensibles se encontraron valores de CMIs de 5 μ M y 22 μ M; (ii) para los aislados resistentes a familias de las penicilinas, cefalosporinas de I generación y a sulfonamidas, se hallaron valores de CMIs de 5 μ M a 22 μ M y (iii) todos los aislados multirresistentes fueron sensibles al péptido (CMIs = 11 μ M) teniendo mayor susceptibilidad que las cepas de referencia ATCC 25922 y 11775; (iv) en la Figura 15 se aprecia que tres (1004, 130822 y 109637) de dieciocho aislados obtuvieron la misma concentración inhibitoria que las cepas de referencia evaluadas, este resultado se asocia con el perfil de susceptibilidad para cada uno de ellos, pues nuestras dos cepas de referencia poseen características de sensibilidad a todos los antibióticos, lo que sucede con uno de los aislados; (v) aislados clínicos con fenotipos atípicos (No fermentación de lactosa) tienen mayor sensibilidad al péptido que cepas ATCC. No ha sido descrito en la literatura ningún comportamiento que asocie las características genotípicas o fenotípicas de aislados clínicos, con el hecho de ser más susceptibles a péptidos antimicrobianos como lo observamos en nuestros resultados, una de las hipótesis propuestas es el hecho que sean aislados clínicos y como factores de virulencia expresen estructuras que conlleven a una mejor atracción electrostática y por ende ser más susceptibles al péptido.

Clasificación	Código	CMI	CMB
		$\mu\text{g/mL}$ (μM)	$\mu\text{g/mL}$ (μM)
Sensible	1004	100 (22)	100 (22)
	118664	50 (11)	>200 (44)
Intermedio	220555	25 (5)	25 (5)
Resistente	129783	25 (5)	100 (22)
	109637	100 (22)	200 (44)
	1012	50 (11)	50 (11)
	119681	50 (11)	>200 (44)
	130822	100 (22)	200 (44)
	219609	50 (11)	100 (22)
	117737	25 (5)	100 (22)
	1002	50 (11)	200 (44)
Multirresistente	129797	25 (5)	25 (5)
	201719	50 (11)	50 (11)
	1006	50 (11)	200 (44)
	121807	50 (11)	200 (44)
	303818	50 (11)	200 (44)
	1016	25 (5)	50 (11)
Referencia	ATCC 25922	22 μM	22 μM
	ATCC 11775	22 μM	44 μM

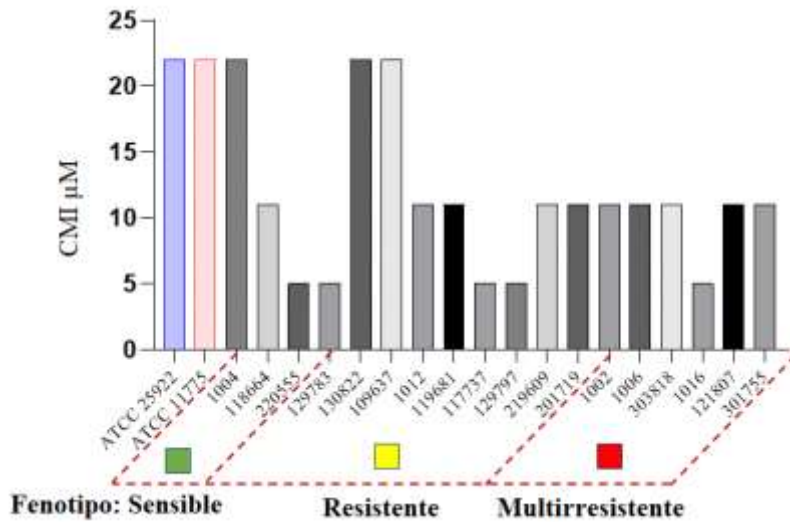


Figura 16. Concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) de LfcinB (20-25)₄ contra a los aislados de *E. coli*. Cepas de referencia, datos tomados de (22)(23).

Adicionalmente, se evidenciaron resultados muy particulares e interesantes, dentro del grupo de los aislados multirresistente el 1016 fue el más sensible al tetrámero (CMI = 5 μ M), este aislado presenta resistencia a familias de penicilinas, cefalosporinas de III y IV generación, betalactámicos, fluoroquinolonas y sulfonamidas. Los aislados clasificados como resistentes, que presentaron la mayor sensibilidad a LfcinB (20-25)₄ con CMI de 5 μ M fueron, 117737 y 129797 que son resistentes a la familia de penicilinas (AM y SAM) y se encuentran en el conglomerado 2 del dendrograma generado para los aislados de *E. coli*; 129797 y 129783 con resistencia a SXT: Trimetoprim /sulfametoxazol (Figura 14).

En los experimentos de determinación de la CMB para los aislados de *E. coli*, se encontró que el tetrámero presenta actividad bactericida para dieciséis de los dieciocho aislados, con valores entre 11 μ M y 44 μ M; solamente para los aislados 118664 y 119681 no fue posible determinar la CMB del péptido dentro de las concentraciones evaluadas. Para el análisis de los resultados de CMB se agruparon los valores de menor a mayor, y se pudo evidenciar que la actividad bactericida más alta la tuvo el péptido frente al aislado intermedio 220555 y el resistente 129797. El aislado resistente a familias de penicilinas y sulfonamidas fue sensible al efecto bactericida del péptido a concentraciones de 11 μ M (aislado 1012), a esta concentración también se tuvo un efecto bactericida para los aislados multirresistentes 1016 y 201719. El 44,4% de los aislados presentaron un valor de CMB de 22 μ M, tanto para cepas con características de sensibilidad (1004 y 220555), resistencia (129783, 117737, 129797, y 219609) y multirresistencia (201719 y 301755). Para el 33,3% de los aislados se encontró un efecto bactericida del tetrámero a concentraciones de 44 μ M, principalmente en cepas multirresistentes (1002, 1006,

303818, 121807). A manera de ejemplo se muestra el resultado obtenido para el aislado *E. coli* 301755, Figura 17.

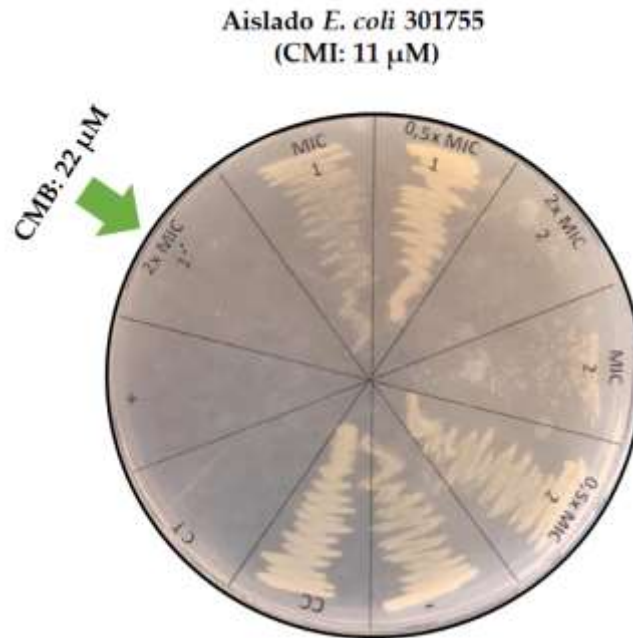


Figura 17. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de LfcinB (20-25)₄ contra el aislado *E. coli* 301755

En términos generales los aislados clínicos de *E. coli* presentaron mayor sensibilidad al tetrámero, que los de *S. aureus*, este resultado concuerda con reportes previos (Tabla 1) (20)(21)(23), donde se demostró que esta molécula presenta menor actividad antibacteriana contra cepas de referencia Gram positivas, como *S. aureus* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 29212 (92)(21)(23). Este comportamiento ha sido estudiado en algunos péptidos antimicrobianos, donde se menciona que sus cargas positivas tienen mejor afinidad frente a algunas cepas que otras, la posible razón es la carga negativa que aporta la composición lipídica de estos microorganismos, especialmente en los lipopolisacáridos (LPS) (40)(94).

Desde los años 90' se ha estudiado los posibles mecanismos que pueden desarrollar los péptidos antimicrobianos, en el año 1998 demuestran que los análogos del triptófano se unirían en la interfaz de las bicapas lipídicas(95) (96), teoría que concuerda con datos anteriores donde se sugiere que este tipo de aminoácidos tienen preferencia por la interfase de las membranas (97), esto hace pensar en el papel fundamental que desempeña el triptófano en la unión con esta envoltura. Schibli y colaboradores en el año 1999 indican que los residuos de triptófano están anclados en la región interfacial de la micela (19), mientras que los residuos de arginina sobresalen para interactuar con las cargas negativas de las mismas (98).

Otro reporte publicado en el año 2001, propone un mecanismo de acción intracelular identificando los sitios de unión iniciales (LPS y Ácidos teicoicos), en este caso se realiza el estudio con cepas de *E. coli* y *S. aureus* marcando el péptido de la Lactoferricina Bovina con anticuerpos policlonales, los datos demuestran la presencia del péptido en el citoplasma de las células bacteriana evaluadas, a lo largo del tiempo existió una disminución de la concentración citoplasmática, proponiendo mecanismos como la degradación enzimática o la activación de bombas de eflujo. (99)

En conclusión, no existen hallazgos puntuales que nos permita conocer el mecanismo de acción del péptido de la Lactoferricina Bovina frente a células bacterianas, esto nos permite crear nuevas expectativas investigativas que nos ayuden a esclarecer este tema que no está del todo descrito.

Por otro lado, este estudio confirma que el tetrámero tiene un amplio espectro de acción ya que presenta actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, hallazgo que había sido evidenciado en otros reportes (41)(42)(23). Además, se evidencia concordancia con los resultados reportados en el estudio de Vargas et al. 2019 (23), donde fue evaluada la cepa de *E. coli* ATCC 43827, que posee características similares a los aislados clínicos que expresa β -lactamasas quien le proporciona la resistencia a antibióticos betalactámicos y fenotipos atípicos como lactosa permeasa deficiente. Los resultados muestran una CMI: 5 μ M y CMB: 44 μ M, valores muy cercanos a los obtenidos con los aislados 303818 Y 301755. En el año 2010, Flores y colaboradores evalúan la actividad del péptido lineal LfcinB (17-30) frente a cepas de *E. coli* multirresistente reportando una CMB de 40 μ M (93), Vergis y colaboradores en el 2020 obtienen CMI y CMB de 32 μ M frente al mismo péptido (100). Esto reitera que la actividad de péptidos polivalentes como el tetrámero derivado de la Lactoferricina Bovina tiene mejor efecto inhibitorio en comparación con otros péptidos evaluados.

Adicionalmente se ha reportado que las cepas de referencia de *E. coli* (ATCC 25922 y 11775) presentan sensibilidad a este tetrámero con valores de CMI y CMB muy cercanos (5 μ M - 44 μ M) a los hallados para los demás aislados clínicos trabajados en esta investigación.

Nuestros resultados indican que LfcinB (20-25)₄ es un péptido promisorio con una actividad antibacteriana contra aislados clínicos tanto Gram positivos como Gram negativos, esta molécula presentó un efecto inhibitorio frente a cepas clínicas de *E. coli* y *S. aureus* con perfiles de resistencia, sensible, resistente y

multidrogorresistentes. Estos datos, nos permiten afirmar que el péptido **LfcinB (20-25)₄** presenta actividad antibacteriana contra aislados clínicos multirresistentes, obteniendo sensibilidad igual o mayor en comparación con las cepas ATCC, afirmación que corresponde a la hipótesis planteada en nuestro proyecto.

6.2.3. Determinación del efecto bacteriostático y bactericida de LfcinB (20-25)₄ contra aislados clínicos de *E. coli* con fenotipo atípico.

Para esta etapa se emplearon los aislados mutirresistentes de *E. coli* 303818 y 301755 y se evaluó la cinética de la actividad antibacteriana del tetrámero cada hora, por 24 horas. Se usaron diferentes concentraciones de LfcinB (20-25)₄ que variaron entre 0,25 y 4 veces la CMI, determinada previamente para cada aislado. Las curvas de letalidad se presentan en la Figura 18.

Para esta técnica se tuvieron en cuenta dos controles: (i) control de crecimiento, para los dos aislados se observa que presentaron claramente las fases de latencia, exponencial o logarítmica y la estacionaria; este control garantiza que las cepas bacterianas son viables y crecen de forma normal (curvas en color rojo), y (ii) control de esterilidad, donde no se observó crecimiento bacteriano (CT, curvas en verde) esto garantiza la esterilidad de la técnica. Además, se evaluó la curva del aislado clínico al estar en presencia con el antibiótico de ciprofloxacino y corroborar su resistencia.

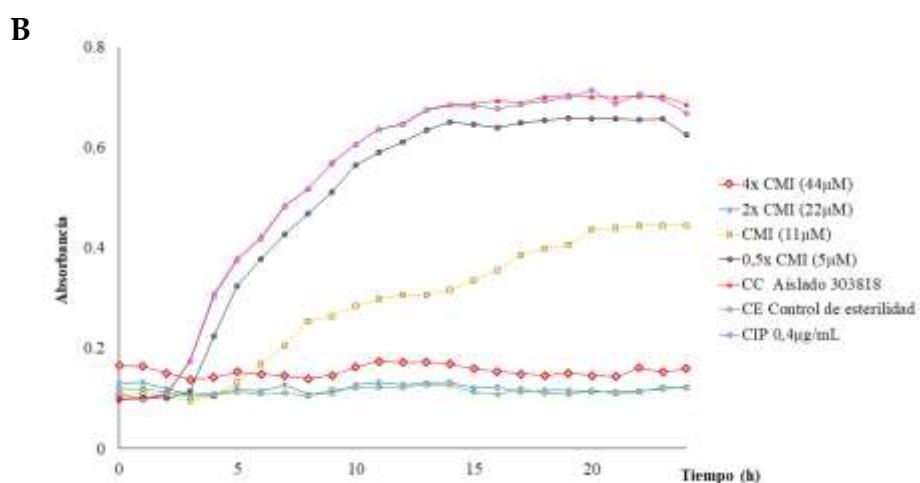
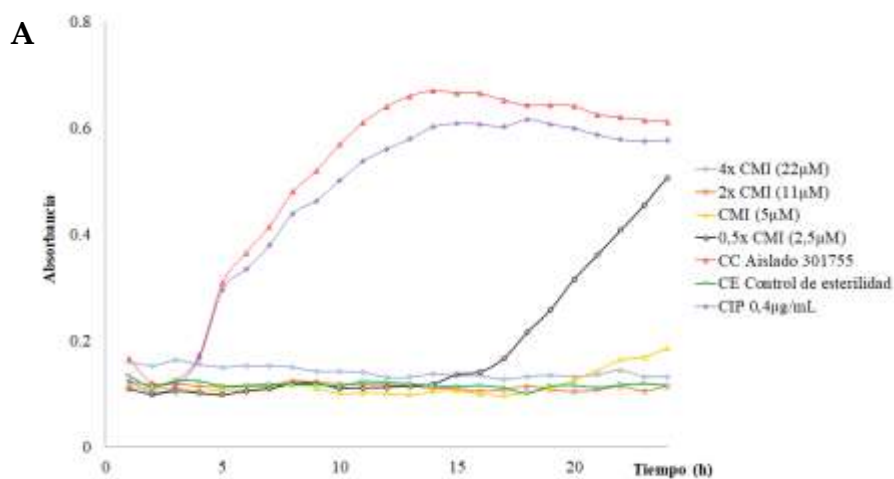


Figura 18. Curvas de letalidad. Péptido LfcinB (20-25)₄ contra el aislado *E. coli* 301755 (A) y contra el aislado *E. coli* 303818 (B).

Para el aislado *E. coli* 301755 (Figura 18A), el péptido a una concentración de 0,5 × CMI (2,5 μM, curva negra) logra inhibir la fase adaptativa hasta las 15 horas aproximadamente, posterior a este tiempo la cepa inicia su fase exponencial y las 24 horas logra disminuir la población bacteriana en comparación con el control de

crecimiento, este comportamiento indica que el péptido tiene un efecto bacteriostático a esas concentraciones. Para valores de concentraciones de la CMI ($11\mu\text{M}$) y $2\times\text{CMI}$ se observó un efecto bactericida (curvas naranja y amarilla), lo que concuerda con las pruebas de susceptibilidad.

Para la cepa de *E. coli* 303818 (Figura 18B), se encontró que el tetrámero tiene un efecto bacteriostático al emplear una concentración de $11\mu\text{M}$ (CMI, curva amarilla), haciendo que la fase adaptativa se inhiba las primeras 5 horas aproximadamente. A concentraciones de $2\times\text{CMI}$ y $4\times\text{CMI}$ el efecto es bactericida (curvas azul y roja).

Estas curvas de letalidad nos permiten afirmar que el péptido LfcinB (20-25)₄ contra el aislado *E. coli* 301755 presenta un efecto bacteriostático y bactericida a concentraciones de $2,5\mu\text{M}$ y $11\mu\text{M}$, respectivamente; este aislado fue el que presentó mayor multidrogorresistencia, específicamente a diez antibióticos de los probados. Para el aislado *E. coli* 303818 se encontró que el tetrámero tiene un efecto bacteriostático a concentración de $11\mu\text{M}$ y bactericida a $22\mu\text{M}$.

Por otro lado, en la evaluación con el antibiótico, pudimos evidenciar el crecimiento del aislado clínico a una concentración de $0,4\mu\text{g/mL}$, concentración reportada por la guía CLSI para la inhibición de microorganismos identificados como *E. coli*, esto nos afirma la resistencia que posee este aislado clínico.

6.2.4. Ensayo de interacción entre LfcinB (20-25)₄ y ciprofloxacina

Adicionalmente, se realizaron ensayos para conocer si estos microorganismos, una vez expuestos al antibiótico y expresando su mecanismo de resistencia, lograban

reducir la actividad del péptido LfcinB (20-25)₄, para este experimento se seleccionaron dos aislados de *E. coli*: el aislado 303818 que tiene un perfil de resistencia a AM, CPE, CAX, CIP, NOR, SXT y el 301755 resistente a AM, SAM, CPE, CAZ, CAX, CIP, GEN, NIT, NOR, SXT; ambos aislados obtuvieron fenotipos atípicos no fermentadores de lactosa y son los únicos resistentes a Ciprofloxacina (CIP). Para el ensayo se seleccionó como antibiótico el ciprofloxacino por dos razones, la primera es debido a los niveles altos de resistencia que se obtuvieron frente a este antibiótico y además, teniendo en cuenta la revisión bibliográfica, la posible asociación entre la resistencia a este antibiótico y la deficiencia del operón Lac (79) (82) (83).

Las pruebas se llevaron a cabo por medio del método de tablero de ajedrez y para la interpretación nos basamos en la metodología propuesta por Bonapace C. *et al* 2002 (101) donde CMI_p correspondía a la CMI del péptido y CMI_A a la del antibiótico evaluado.

Los resultados fueron evaluados a diferentes concentraciones del péptido y del antibiótico, teniendo en cuenta la CMI para cada uno. Para el aislado 303818 se determinó que la CMI_A es 7,8 µg/mL y para el aislado 301755 la CMI del antibiótico fue 62,5 µg/mL, concentraciones muy altas y alarmantes para este antibiótico; estos valores corroboran la resistencia a esta fluoroquinolona (Figura 19).

Por otro lado, y teniendo en cuenta que en estudios previos se reportó sinergia frente a cepas de referencia entre ciprofloxacino y el péptido tetramérico, se corroboró si se mantenía este comportamiento evaluando los aislados clínicos multirresistentes.

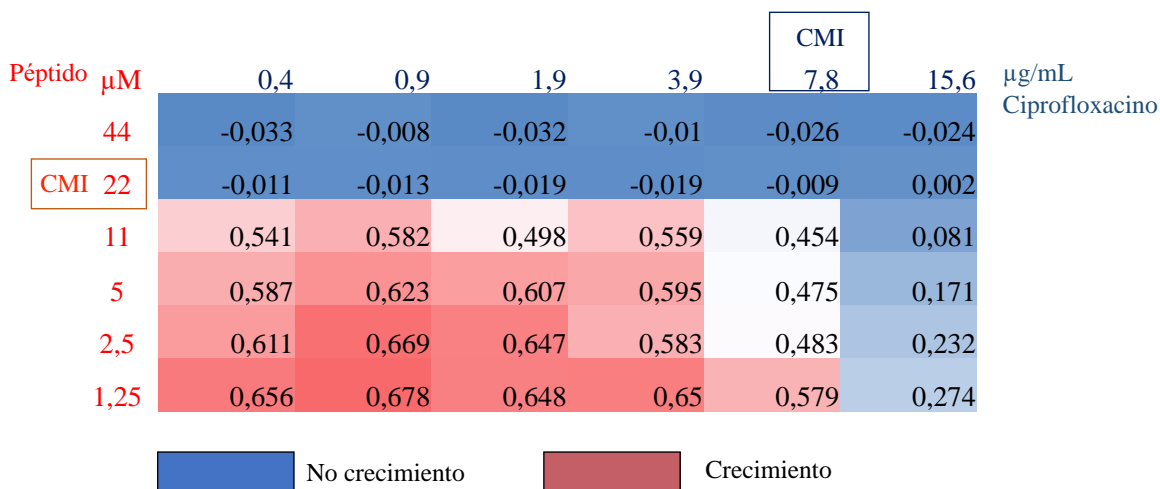


Figura 19-A. Determinación de la competencia entre LfcinB (20-25)₄ y ciprofloxacina para el aislado 303818.

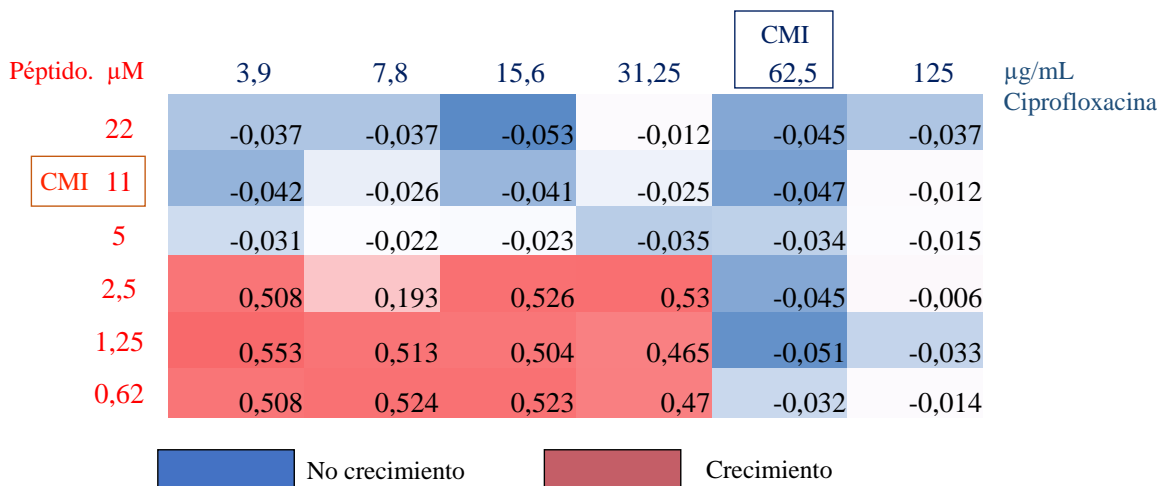


Figura 19-B. Determinación de la competencia entre LfcinB (20-25)₄ y ciprofloxacina para el aislado 301755.

Para los dos aislados evaluados no se observó que en presencia del antibiótico se afectara la actividad del péptido, además no se observaron efectos sinérgicos en esta combinación con CIF de 1,2 para el aislado clínico 301755 y CIF de 1,1 para la cepa 303818 (efecto indiferente), es también es importante resaltar que el antibiótico no

presenta efecto antagonista en combinación con el péptido, lo que permite sugerir que a futuro en una terapia se podría usar simultáneamente este antibiótico y el péptido, sin que la acción de este último se vea afectada por la ciprofloxacina.

Estudios previos, mostraron efecto sinérgico entre el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ y ciprofloxacino, frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 y de *S. aureus* ATCC 25923 (23), cabe resaltar que no existen estudios donde se evalúe la interacción del péptido con antibióticos en *E. coli*, ni estudios donde se determine la sinergia de péptidos derivados de la Lactoferricina bovina y antibióticos frente aislados clínicos. En los estudios a continuación, se ha evaluado el efecto de interacción de la LfcinB con antibióticos, esos datos mostraron un efecto sinérgico en combinación con ciprofloxacino y ceftazidima para cepas Gram negativas, con CIF entre 0,63 y 0,75, y un efecto indiferente en combinación con gentamicina. Para cepas Gram positivas, el resultado fue más variado, obteniendo efecto sinérgico en combinación con ciprofloxacino con una CIF de 0,75, y efecto indiferente en combinación de ceftazidima y gentamicina (58).

7. Conclusiones

Se observaron los altos niveles de resistencia a antibióticos para cepas de *E. coli* y *S. aureus*, con una mayor frecuencia a las familias de penicilinas, betalactámicos y sulfonamidas, lo cual mostraron una alta concordancia con los fenotipos de resistencia reportados por la OMS.

Los ensayos microbiológicos realizados permiten identificar el 12% de *E. coli* Lac- siendo estos aislados los que poseen mayores porcentajes de resistencia y los únicos resistentes a ciprofloxacino.

El péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ mostró actividad frente aislados clínicos sensibles, resistentes y multidrogosresistentes, de microorganismos bacterianos Gram positivos y Gram negativos, en concentraciones cercanas a las encontradas contra cepas de referencia. Lo que responde a nuestra pregunta de investigación y se encuentra en concordancia con la hipótesis.

El péptido tetramérico contra aislados seleccionados de *E. coli* (Nº 303818 – Nº 301755) mostraron efecto bactericida a concentraciones bajas a las 24 horas.

Al combinar la ciprofloxacina con el tetrámero, que probablemente este aislado logre ser estimulado y exhibir los mecanismos de resistencia, no se evidencia represión de la acción del péptido.

Este trabajo permitió demostrar que el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ es un posible candidato como tratamiento alternativo para infecciones causadas por microorganismos multirresistentes Gram positivos y Gram negativos.

8. Perspectivas

La rápida aparición de microorganismos multirresistentes y el acelerado aumento de mortalidad a nivel mundial, nos enfoca a profundizar en las posibles alternativas terapéuticas. Basados en los resultados obtenidos en este trabajo, donde se refleja que el tetrámero es un péptido promisorio para la actividad antimicrobiana de diferentes fenotipos en *S. aureus* y *E. coli* y teniendo en cuenta en la cantidad limitada de hallazgos disponibles en la literatura, nos permiten pensar en futuras investigaciones que incluyan i) el mecanismo del péptido tetramérico que nos permita esclarecer la mayor susceptibilidad de los aislados clínicos resistentes y multirresistentes frente a cepas ATCC, ii) Realizar ensayos de interacción con otros antibióticos y mayor cantidad de aislados clínicos resistentes y multirresistentes de estas y otras especies, iii) Evaluar *in vivo* la actividad del péptido tetravalente frente a aislados clínicos con diferentes fenotipos; y por último y no menos importante iv) Profundizar en la prevalencia de microorganismos con fenotipos atípicos para conocer su comportamiento y posible susceptibilidad frente a péptidos derivados de la Lactoferrina Bovina.

9. Bibliografía

1. Inoue H, Minghui R. Antimicrobial resistance: Translating political commitment into national action. *Bull World Health Organ.* 2017;95(4):242-242A.
2. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - J Med Soc.* 2018;32(1):76-7.
3. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control [Internet].* 2017;12:Doc05. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28451516>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5388835>
4. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature.* 2017;543(7643):15.
5. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010;1(DEC):1-7.
6. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol [Internet].* 2015;13(1):42-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>
7. OMS. Resistencia a los antimicrobianos Situación actual Resistencia de las bacterias [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
8. Grupo de Microbiología Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia

- (SLNR). Infecciones asociadas a la atención en salud. *Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud*. 2019.
9. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Nacional de Respuesta a la Resistencia a los Antimicrobianos - plan estratégico. 2018;66. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>
 10. Maldonado NA, Múnera MI, López JA, Sierra P, Robledo C, Robledo J, et al. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: Resultados de seis años de vigilancia. *Biomedica*. 2014;34(3):433–46.
 11. Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2017;50(4):405–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
 12. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1543–75.
 13. Rodríguez-Franco DA, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latinoam Microbiol*. 2005;47(3–4):102–11.
 14. Murata M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Abe F. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *J Dairy Sci* [Internet]. 2013;96(8):4891–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6612>
 15. L.Cheng-Foh FM, S.Shamala. Intracellular Targeting Mechanisms by antimicrobial peptides. 2017;61(4):1–16.
 16. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT. Antibacterial activity of

- lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun.* 1993;61(2):719–28.
17. Vorland LH, Ulvatne H, Andersen J, Haukland HH, Rekdal Ø, Svendsen JS, et al. Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scand J Infect Dis.* 1998;30(5):513–7.
 18. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *Int J Pept.* 2013;2013(February 2015).
 19. Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett.* 1999;446(2–3):213–7.
 20. León-Calvijo MA, Leal-Castro AL, Almanzar-Reina GA, Rosas-Pérez JE, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int.* 2015 Mar;2015:1–8.
 21. Huertas N de J, Monroy ZJR, Medina RF, Castañeda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules.* 2017;22(6).
 22. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra JA, Umaña Pérez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, García Castañeda JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules.* 2017;22(10):1–11.
 23. Vargas-Casanova Y, Rodríguez-Mayor AV, Cardenas KJ, Leal-Castro AL, Muñoz-Molina LC, Fierro-Medina R, et al. Synergistic bactericide and

antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Adv.* 2019;9(13):7239–45.

24. Alby K, Miller MB. Mechanisms and Detection of Antimicrobial Resistance [Internet]. Fifth Edit. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier Inc.; 2017. 1467-1478.e4 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00290-5>
25. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2013;1(2):63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.010>
26. Gómez Rubio A. Consumo de antibióticos en el ámbito hospitalario en Colombia, primer semestre de 2019. *Inst Nac Salud.* 2019;1–16.
27. Afacan NJ, Yeung ATY, Pena OM, Hancock REW. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012;18(6):807–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236127>
28. Germán Alberto Téllez¹, Jhon Carlos Castaño¹. Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides. 2010;14(1):55–67. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
29. Rana M, Chatterjee S, Kochhar S, Pereira BMJ. Antimicrobial Peptides: a New Dawn for Regulating Fertility and Reproductive Tract Infections. *J Endocrinol Reprod* [Internet]. 2006;2:88–95. Available from: <http://srbce.org/journal12b/002.pdf>
30. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-

- terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol.* 1992;73(6):472–9.
31. Schiffer M, Chang CH, Stevens FJ. The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng Des Sel.* 1992;5(3):213–4.
 32. De Jesus AJ, Allen TW. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2013;1828(2):864–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.009>
 33. Vorland LH, Osbakk SA, Perstølen T, Ulvatne H, Rekdal Ø, Svendsen JS, et al. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(2):173–7.
 34. Feng X jun, Wang J hua, Shan A shan, Teng D, Yang Y lin, Yao Y, et al. Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2006;47(1):110–7.
 35. Vargas Casanova Y. Evaluación De La Actividad Antibacteriana De Péptidos Diméricos Y Tetraméricos Derivados De Lactoferricina Bovina Contra Bacterias Gram Positivas Y Gram Negativas. Universidad Nacional de Colombia; 2018.
 36. Huertas Méndez NDJ, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi AK, Hernández E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules.* 2017;22(3):1–10.
 37. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional

- protein. *Int J Pept.* 2013;2013.
38. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2588–98.
 39. Ptaszyńska N, Olkiewicz K, Okońska J, Gucwa K, Łęgowska A, Gitlin-Domagalska A, et al. Peptide conjugates of lactoferricin analogues and antimicrobials—Design, chemical synthesis, and evaluation of antimicrobial activity and mammalian cytotoxicity. *Peptides* [Internet]. 2019;117(March):170079. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.006>
 40. Farnaud S, Spiller C, Moriarty LC, Patel A, Gant V, Odell EW, et al. Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;233(2):193–9.
 41. Vega SC, Martínez DA, Chalá M del S, Vargas HA, Rosas JE. Design, synthesis and evaluation of branched RRWQWR-based peptides as antibacterial agents against clinically relevant gram-positive and gram-negative pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9(MAR).
 42. Vega Chaparro SC, Valencia Salguero JT, Martínez Baquero DA, Rosas Pérez JE. Effect of Polyvalence on the Antibacterial Activity of a Synthetic Peptide Derived from Bovine Lactoferricin against Healthcare-Associated Infectious Pathogens. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
 43. Concepción Porrero Calonge. Detección y caracterización de *Staphylococcus aureus* procedentes de animales y aguas. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
 44. Borraz Ordás C. Epidemiología De La Resistencia a Meticilina [Internet].

Universidad de barcelona; 2003. Available from:
http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2513/CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf

45. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417–33.
46. Leal-Castro AL, Álvarez CA. Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana. 2019.
47. Lacueva Arnedo M. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual [Internet]. Universidad complutense; 2017. Available from: <https://eprints.ucm.es/54765/>
48. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science (80-)*. 2001;291(5510):1962–5.
49. Shajari G, Khorshidi A, Moosavi G. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *Arch Razi Inst.* 2017;90(54):107–10.
50. Araos R, García P, Chanqueo L, Labarca J. Daptomycin: Pharmacological characteristics and its role in the treatment of gram positive infections. *Rev Chil Infectología.* 2012;29(2):127–31.
51. Casanova, Natalia Gómez, María, Siller Ruiz JLMB. Mechanisms of resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Kamera* [Internet]. 2010;38(6):36–44. Available from: <http://seq.es/wp-content/uploads/2017/12/gomez25oct2017.pdf>
52. Velasco C de caceres. Evolución de la resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* . Universidad Complutense; 2016.
53. Ruiz Larrea F, Lantero M, Torres Gómez C, Portillo A, Zarazaga Chamorro M,

- Olarte I, et al. Resistencia a antibióticos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de "Streptococcus" spp. en La Rioja. *Zubía*. 2000;12(12):11–26.
54. McCallum N, Berger-Bächli B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(2–3):118–29.
 55. Benito Pascual D. Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*. Universidad de la Rioja; 2015.
 56. Truong-Bolduc QC, Dunman PM, Strahilevitz J, Projan SJ, Hooper DC. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005;187(7):2395–405.
 57. Romeu B. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. Repositorio de Tesis Universidad de La Habana. 2012.
 58. Grupo de evaluación de riesgos de inocuidad de Alimentos. Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco [Internet]. Instituto Nacional de Salud. 2015. Available from: http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
 59. Alonso CA. Epidemiología molecular en *Escherichia coli* procedente de fauna salvaje: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. Universidad de la Rioja; 2018.
 60. Vargas CRS. Elaboración y evaluación del material didáctico variedades

- enterovirulentas de *Escherichia coli* [Internet]. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; 2014. Available from: https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_salas_vargas.pdf
61. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;73(4):354–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
 62. García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA, et al. Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2011;24(2):57–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666996>
 63. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2012;87(2):198–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
 64. Serra A. QUINOLONAS. *Separata*. 2008;16.
 65. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Annu Rep Med Chem*. 2016;4(2):119–27.
 66. Grünbaum F. Resistencia a aminoglucósidos en ENTEROBACTERIACEAE [Internet]. Universidad autónoma de Barcelona; 2011. Available from: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/42291/fg1de1.pdf?sequence=1>
 67. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-

- TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22(1):35–45.
68. Demirev P, Sandrin T. Applications of mass spectrometry in microbiology. New York: Springer Cham Heidelberg; 2016. 1–336 p.
 69. Sampedro A, Ceballos Mendiola J, Aliaga Martínez L. MALDI-TOF Commercial Platforms for Bacterial Identification [Internet]. The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology. Elsevier Inc.; 2018. 47–57 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00003-4>
 70. Cramer R. Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry. *Adv MALDI Laser-Induced Soft Ioniz Mass Spectrom*. 2015;1–286.
 71. CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Vol. 8, *Journal of Services Marketing*. 2019. 27–39 p. Available from: <http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>
 72. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163–75.
 73. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4124–8.
 74. Vargas-Casanova Y. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS DIMÉRICOS Y TETRAMÉRICOS DERIVADOS DE LACTOFERRICINA BOVINA CONTRA BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS. Universidad nacional de Colombia; 2018.
 75. Toledo MRF, Trabulsi LR. Correlation between biochemical and serological

- characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. *J Clin Microbiol.* 1983;17(3):419–21.
76. Park JJ, Seo Y Bin, Lee J. Antimicrobial susceptibilities of Enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections during a 5-year period: A single hospital study in Korea. *Infect Chemother.* 2017;49(3):184–93.
 77. Ceballos-Garzón A, Cabrera E, Cortes-Fraile GC, León A, Aguirre-Guataqui K, Linares-Linares MY, et al. In-house protocol and performance of MALDI-TOF MS in the early diagnosis of bloodstream infections in a fourth-level hospital in Colombia: Jumping to full use of this technology. *Int J Infect Dis.* 2020;101:85–9.
 78. Bhat G, Bhat G. Atypical *Escherichia Coli* in Urinary Tract Infection. *Trop Doct.* 1995;25(3):127.
 79. Raksha R, Srinivasa H, Macaden RS. Occurrence and characterisation of Uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2003;21(2):102–7. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)03130-3](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)03130-3)
 80. T. R, M J. Prevalence of Atypical *E. coli* Causing Urinary Tract Infection in a Tertiary Care Hospital . *Australas Med J.* 2010;3(8):545–6.
 81. Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare G. Importance of identification of lactose nonfermenting *Escherichia coli* and their prevalence in urinary isolates. *CHRISMED J Heal Res.* 2016;3(4):288.
 82. Kaczmarek A, Skowron K, Budzyńska A, Grudlewska K, Gospodarek-Komkowska E. Virulence genes and antimicrobial susceptibility of lactose-negative and lactose-positive strains of *Escherichia coli* isolated from pregnant women and neonates. *Folia Microbiol (Praha).* 2017;62(5):363–71.

83. Chang J, Yu J, Lee H, Ryu H, Park K, Park YJ. Prevalence and characteristics of lactose non-fermenting *Escherichia coli* in urinary isolates. *J Infect Chemother* [Internet]. 2014;20(11):738–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.005>
84. Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):103–14.
85. Ceballos-Garzon A, Amado D, Vélez N, Jiménez-A MJ, Rodríguez C, Parra-Giraldo CM. Development and validation of an in-house library of colombian *Candida auris* strains with maldi-TOF MS to improve yeast identification. *J Fungi*. 2020;6(2):1–8.
86. Sanguinetti M, Posteraro B. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(10):965–77.
87. Kallow W, Erhard M, Shah H, Raptakis E, Welker M. MALDI - TOF MS for Microbial Identification : Years of Experimental Development to an. In: Shah H, Gharbia S, editors. *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. London; 2010. p. 255–76.
88. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med*. 2013;33(3):589–609.
89. Gil Gonzalo A. Espectrometría MALDI-TOF aplicada a levaduras enológicas: identificación. [Internet]. Universidad de Valladolid; 2014. Available from: <http://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/38124/TFG-G3567.pdf?sequence=1>.

90. Cipolla L, Rocca F, Armitano RI, Martinez C, Almuzara M, Faccione D, et al. Development and evaluation of an in-house database for quick identification of *Burkholderia contaminans* by MALDI-TOF MS. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2019;51(3):255–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.09.001>
91. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–8.
92. León-Calvijo MA, Leal-Castro AL, Almanzar-Reina GA, Rosas-Pérez JE, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 . *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–8.
93. Flores-Villaseñor H, Canizalez-Román A, Reyes-Lopez M, Nazmi K, De La Garza M, Zazueta-Beltrán J, et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *BioMetals*. 2010;23(3):569–78.
94. Pane K, Durante L, Crescenzi O, Cafaro V, Pizzo E, Varcamonti M, et al. Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *J Theor Biol* [Internet]. 2017;419(January):254–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>
95. Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*. 1998;37(42):14713–8.
96. Sun H, Greathouse D V., Andersen OS, Koeppe RE. The preference of tryptophan for membrane interfaces: Insights from N-methylation of

- tryptophans in gramicidin channels. *J Biol Chem*. 2008;283(32):22233–43.
97. Wimley WC, White SH. Membrane Partitioning: Distinguishing Bilayer Effects from the Hydrophobic Effect. *Biochemistry*. 1993;32(25):6307–12.
 98. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758(9):1184–202.
 99. Haukland HH, Ulvatne H, Sandvik K, Vorland LH. The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett*. 2001;508(3):389–93.
 100. Vergis J, Malik SS, Pathak R, Kumar M, Ramanjaneya S, Kurkure NV, et al. Exploiting Lactoferricin (17–30) as a Potential Antimicrobial and Antibiofilm Candidate Against Multi-Drug-Resistant Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2020;11(September):1–13.
 101. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich L V., White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44(4):363–6.