



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

**I.Q. JOHANA MARTINEZ PAULA**

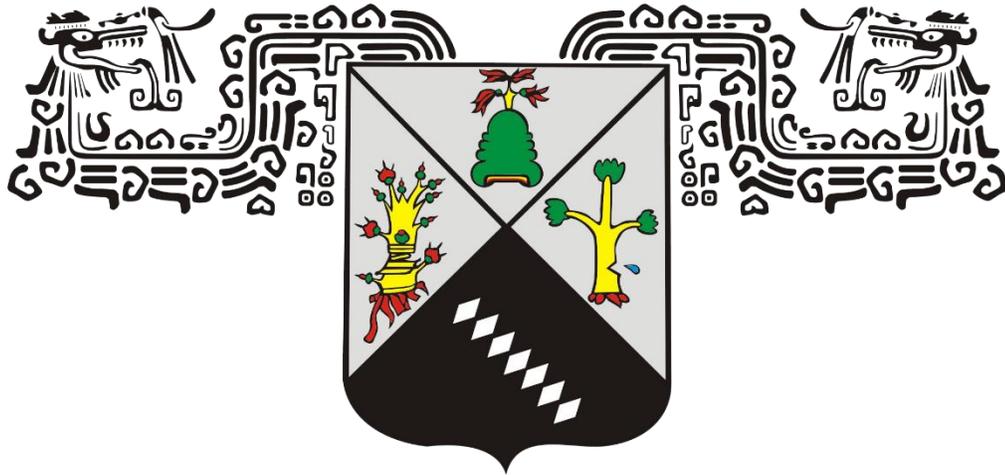
**DIRECTOR**

**DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**OCTUBRE, 2019**





# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.

CONTÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, A TRAVEZ DE LA BECA CON NUMERO DE **CVU 603027** DE POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA Y DEL PROYECTO “DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS BACTERICIDAS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS NOSOCOMIALES Y FITOPATÓGENAS DE CULTIVOS AGRÍCOLAS”, FINANCIADO POR PRODEP (PRODEP-39/REV-04), OTORGADO AL DR. ALEXIS J. RODRÍGUEZ SOLÍS (UAEMOR-PTC-367).

***“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”***

***(Isaac Newton)***

*Dedicada con amor y respeto:*

*A mis padres Juan David y Ma. Del Rosario, por su amor,  
trabajo, paciencia y sacrificios en todos estos años,  
gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy,  
son los mejores padres.*

*A mi esposo Ángel Eduardo, por su amor, confianza  
y por estar conmigo incluso en los momentos más turbulento.  
Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome  
hasta donde tus alcances lo permitían, gracias amor.*

*A mi hijo Jorge Emiliano, por ser mi motivo e inspiración de vida  
para seguir adelante y para quien ningún sacrificio es suficiente,  
te amo mi niño.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, quien no solo me ayudó y guió en la elaboración de la presente TESIS, sino también me motivó a la constancia, esfuerzo y esmero.

A los miembros del comité evaluador: Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete y Dr. Jesús Silva Sánchez, por su minuciosa revisión para hacer de este un mejor trabajo.

A los Doctores Elba Cristina Villegas Villareal (CEIB-UAEM) y Gerardo A. Corzo Burguete (IBt-UNAM) por las facilidades y por haberme otorgado un espacio en sus respectivos laboratorios para la realización experimental de esta TESIS.

Al Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP) por haberme orientado académicamente en la realización de los experimentos de esta TESIS. También por la donación de las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, que fueron de gran importancia para la realización experimental de esta TESIS.

A la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero (IBt-UNAM) y a la MB. Mariel Adame (CEIB-UAEM), por haberme brindado su apoyo académicamente.

A mis amigos Nalle, Moni, Dani, Liz, Fernando y José; por su amistad y por hacer más amena la estancia en el laboratorio.

## ÍNDICE

<b>I. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	VIII
<b>II. RESUMEN</b> .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Antibióticos</b> .....	1
<b>1.1.1. Clasificación de los antibióticos</b> .....	1
<b>1.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos</b> .....	6
<b>1.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana</b> .....	9
<b>1.2.2. Consecuencias de la resistencia bacteriana</b> .....	10
<b>1.3. Combinación de antibióticos</b> .....	13
<b>1.3.1. Combinaciones de antibióticos en México</b> .....	14
<b>1.3.2. Alternativas para el control de infecciones</b> .....	15
<b>1.4. Péptidos antimicrobianos</b> .....	15
<b>1.4.1. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>2.1. Diseño de péptidos antimicrobianos</b> .....	19
<b>2.2. Variantes cortas del péptido antimicrobiano C<sub>ss</sub>54</b> .....	20
<b>2.3. Combinaciones de péptidos antimicrobianos cortos con antibióticos comerciales</b> .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>5.1. General</b> .....	25
<b>5.2. Particulares</b> .....	25
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>6.1. Reactivos químicos y material biológico</b> .....	26
<b>6.1.1. Reactivos y solventes</b> .....	26
<b>6.1.2. Material biológico</b> .....	26
<b>6.1.3. Péptidos antimicrobianos</b> .....	26
<b>6.1.4. Antibióticos comerciales</b> .....	26
<b>6.2. Verificación de las cepas</b> .....	27
<b>6.2.1. Morfología colonial</b> .....	27
<b>6.2.2. Morfología microscópica</b> .....	28

6.2.3. Pruebas bioquímicas. ....	28
6.2.4. Métodos semiautomatizados.....	30
6.2.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano .....	31
6.3. Purificación de los péptidos antimicrobianos .....	31
6.3.1. Purificación mediante HPLC .....	31
6.3.2. Cuantificación de proteína .....	31
6.3.3. Determinación de la susceptibilidad de las bacterias <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	32
6.4. Determinación de concentración mínima inhibitoria de antibióticos comerciales y péptidos antimicrobianos .....	32
6.4.2. Método por dilución en medio líquido.....	32
6.5. Diseño de mezclas de antibiótico más péptido antimicrobiano .....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
7.1. Verificación de cepas.....	35
7.1.1.Morfología en colonia de <i>S. aureus</i> .....	35
7.1.2.Morfología microscópica de <i>S. aureus</i> .....	36
7.1.3.Pruebas Bioquímicas de <i>S. aureus</i> .....	37
7.1.4.Morfología en colonia de <i>E. coli</i> .....	38
7.1.5.Morfología microscópica de <i>E. coli</i> .....	41
7.1.6.Pruebas Bioquímicas de <i>E. coli</i> .....	42
7.2. Purificación de los péptidos antimicrobianos .....	43
7.2.1.Purificación mediante HPLC .....	43
7.2.2.Determinación de la susceptibilidad de las bacterias <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . .....	44
<i>S. aureus</i> .....	44
<i>E. coli</i> .....	46
7.3. Determinación de concentración mínima inhibitoria de antibióticos comerciales y péptidos antimicrobianos. ....	49

7.3.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria de los péptidos C <sub>ss</sub> 54[15E] <sup>+4</sup> y C <sub>ss</sub> 54[14] <sup>+5</sup> , en <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>E. coli</i> ATCC 25922 por el método por dilución en medio líquido.....	49
7.3.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria de Ampicilina en <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>E. coli</i> ATCC 25922 por el método por dilución en medio líquido. ....	53
7.3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las diferentes combinaciones de Ampicilina con los dos péptidos cortos.....	54
8. CONCLUSIONES .....	62
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. REFERENCIAS.....	65
11. ANEXOS.....	a
ANEXO A. Cuadros de ajedrez de las mezclas propuestas de PAM + AB.....	a
ANEXO B. Resultados obtenidos de la evaluación de las mezclas de PAM + AB. Usando la metodología de dilución en medio líquido.....	b
ANEXO C. Resultados experimentales de la determinación de susceptibilidad de las cepas de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , de ATCC y de aislados clínicos; a antibióticos comerciales. ....	c
ANEXO D. Gráficas de las combinaciones de las diferentes concentraciones de C <sub>ss</sub> 54[15E] <sup>+4</sup> y C <sub>ss</sub> 54[14] <sup>+5</sup> + ampicilina en <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	e
ANEXO E. Tablas de parámetros fisicoquímicos de PAMs que fueron evaluados en combinación con Ampicilina.....	h
ANEXO F. Comparaciones de los parámetros fisicoquímicos de los PAMs que se han combinado con Ampicilina y han obtenido efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos. ....	k

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de antibióticos clasificados con base en su mecanismo de acción (Calderón y Perdue-Sabundayo, 2007; Falconer et al., 2011; Kohanski et al., 2010; Molina-López, 2015).	2
<b>Tabla 2.</b> Clasificación química de los antibióticos, algunos ejemplos, modo de acción y espectro simplificados (Errecalde, 2004).	4
<b>Tabla 3.</b> Lista de las bacterias más peligrosas para la salud humana (WHO, 2017)	11
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de los péptidos antimicrobianos Pin2 y Css54.	20
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de las variantes cortas de Css54 propuestas.	20
<b>Tabla 6.</b> Efectos de mezclas de los PAMs y antibióticos comerciales (García et al., 2013).	23
<b>Tabla 7.</b> Cepas bacterianas	26
<b>Tabla 8.</b> Antibióticos comerciales y su respectivo blanco de acción (DRUGBANK, 2018; Errecalde, 2004).	27
<b>Tabla 9.</b> Metodología de purificación de péptido antimicrobiano (Martínez-Paula, 2017).	31
<b>Tabla 10.</b> Diseño tipo ajedrez para determinar la actividad antimicrobiana de dos compuestos en combinación (Jiménez-Sánchez, 2015).	34
<b>Tabla 11.</b> Resultados teóricos y experimentales de <i>S. aureus</i> , en los diferentes medios de cultivo (CHROMagar, 2015; Britania, 2015; Aryal, 2015).	36
<b>Tabla 12.</b> Resultado teórico y experimental de la tinción de Gram de <i>S. aureus</i> (Tracey & Chandrashekar, 2018; Arteaga et al., 2012).	37
<b>Tabla 13.</b> Resultados teóricos y experimentales de las pruebas bioquímicas de <i>S. aureus</i> (Arteaga et al., 2012; Tracey & Chandrashekar, 2018).	37
<b>Tabla 14.</b> Resultados teóricos y experimentales de <i>E. coli</i> , en los diferentes medios de cultivo (CHROMagar, 2016; Britania, 2015; Aryal, 2016).	40
<b>Tabla 15.</b> Resultado teórico y experimental de la tinción de Gram de <i>E. coli</i> (Arteaga et al., 2012).	42
<b>Tabla 16.</b> Resultados teóricos y experimentales de las pruebas bioquímicas de <i>S. aureus</i> (Arteaga et al., 2012; Al Humam, 2016).	42
<b>Tabla 17.</b> Resultados de susceptibilidad de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, con los unidiscos de antibióticos a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).	45
<b>Tabla 18.</b> Resultados de susceptibilidad de <i>S. aureus</i> de aislado clínico, con los sensidiscos de antibióticos de Bio-rad a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).	45
<b>Tabla 19.</b> Resultados de susceptibilidad de <i>E. coli</i> ATCC 25922, con los unidiscos de antibióticos a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).	46

<b>Tabla 20.</b> Resultados de susceptibilidad de <i>E. coli</i> de aislado clínico, con los sensidiscos de antibióticos de Bio-rad a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018). .....	47
<b>Tabla 21.</b> CMI de los péptidos C <sub>ss</sub> 54 [15E] <sup>+4</sup> y C <sub>ss</sub> 54 [14] <sup>+5</sup> , con las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	52
<b>Tabla 22.</b> Valores de concentración mínima inhibitoria de antibióticos y péptidos antimicrobianos de las cepas <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> por método de dilución en medio líquido.....	54
<b>Tabla 23.</b> Efectos obtenidos con las combinaciones de Ampicilina y péptidos antimicrobianos por el método de dilución en medio líquido. ....	57
<b>Tabla 24.</b> Ejemplos de PAMs evaluados en combinación con Ampicilina y sus efectos obtenidos.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, así como algunos ejemplos de antibióticos que actúan sobre ellos (Errecalde, 2004). .....	2
<b>Figura 2.</b> Porcentajes de enfermedades infecciosas producidas por cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina, publicadas por regiones (WHO, 2017). .....	7
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de transferencia horizontal de genes. Cada cuadrante representa un método diferente de transferencia de genes. (A) La conjugación es un proceso que requiere el contacto célula a célula a través de pili o adhesinas de la superficie celular, a través de las cuales se transfiere el ADN de la célula donante a la célula receptora. (B) La transformación es la captación, integración y expresión funcional de fragmentos desnudos de ADN extracelular. (C) Mediante transducción especializada o generalizada, los bacteriófagos pueden transferir ADN bacteriano de una célula donante previamente infectada a la célula receptora (Von Wintersdorff et al., 2016). .....	8
<b>Figura 4.</b> Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras, 2. Bombas de eflujo, 3. Cierre de porinas, 4. Proteínas unidoras de penicilinas (Fernández-Riverón et al., 2003). .....	9
<b>Figura 5.</b> <i>Escherichia coli</i> . A y B. Cultivo en Eosina y Azul de metileno, las colonias presentan una coloración verde metálico, C. Tinción de Gram, coloración rosado característica de las bacterias Gram negativas, D. Micrografía electrónica que presenta a <i>E. coli</i> con morfología de bacilos cortos (Salas, 2014). .....	12
<b>Figura 6.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> . A y B. Cultivo en agar de sangre, las colonias presentan una coloración grisácea debido al hemólisis que producen, C. Tinción de Gram, coloración violeta característica de las bacterias Gram positivas, D. Micrografía electrónica que presenta a <i>Staphylococcus aureus</i> con morfología de cocos que forman agrupaciones características en “racimo de uva” (Pahissa, 2009). .....	12
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. 1. Interacción de membrana, 2. Funciones inmunomoduladoras, 3. Formación de poros en forma toroidal, 4. Mecanismo de agregado, 5. Forma de poros en forma de barril, 6. Interacciones con el ADN y proteínas relacionadas, 7. Mecanismos que alteran la síntesis y plegamiento de proteínas (Téllez y Castaño, 2010). .....	16
<b>Figura 8.</b> Interacción de un péptido (color amarillo) con la membrana de la bacteria (color rojo). El PAM se coloca con una orientación paralela a la superficie de la membrana (Marquette y Bechinger, 2018). .....	18
<b>Figura 9.</b> Alacrán <i>Centruroides suffusus suffusus</i> . .....	19
<b>Figura 10.</b> Ejemplo del posible mecanismo, de sinergia entre un PAM $\alpha$ -hélice con un antibiótico comercial. La Ciprofloxacina es un inhibidor del ADN girasa, por lo que debe ingresar a la célula bacteriana para mostrar actividad antimicrobiana. En el ejemplo, el mecanismo de resistencia de esta bacteria Gram-negativa es una bomba de eflujo, que bombea el antibiótico fuera de la célula. Por lo que el PAM, permeabiliza la membrana, produciendo así el ingreso de más moléculas del antibiótico (Ciprofloxacina) al citoplasma, donde finalmente podrían alcanzar su blanco de acción (Hollmann et al., 2018). .....	22
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de acción de los antibióticos que se propusieron para utilizar (DRUGBANK, 2018; Errecalde, 2004). .....	27
<b>Figura 12.</b> Posibles resultados de la prueba de catalasa. Catalasa positiva, formación de burbujas y Catalasa negativa, no hay ninguna formación de burbujas (Reiner, 2010; Arteaga-Garibay et al., 2012). .....	29
<b>Figura 13.</b> Posibles resultados de la prueba bioquímica de oxidasa. Positivo (color azul-violeta) y negativo (sin cambio en el color) (SIGMA-ALDRICH, 2013). .....	29
<b>Figura 14.</b> Posibles resultados de la prueba bioquímica de coagulasa. Positivo (formación de coagulo) y negativo (no se forma coagulo) (Jiménez-Sánchez, 2015). .....	30
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de las variantes cortas del péptido antimicrobiano C <sub>ss</sub> 54: a) C <sub>ss</sub> 54[15E] <sup>+4</sup> y b) C <sub>ss</sub> 54[14] <sup>+5</sup> .....	44

<b>Figura 16.</b> Cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, efecto de los péptidos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 25923. A. Css54 [15E] <sup>+4</sup> y B. Css54 [14] <sup>+5</sup> .....	50
<b>Figura 17.</b> Porcentajes de crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, a las diferentes concentraciones de los péptidos A. Css54 [15E] <sup>+4</sup> y B. Css54 [14] <sup>+5</sup> , a las 12 horas de incubación. ....	50
<b>Figura 18.</b> Cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, efecto de los péptidos sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922. A. Css54 [15E] <sup>+4</sup> y B. Css54 [14] <sup>+5</sup> .....	51
<b>Figura 19.</b> Porcentajes de crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> ATCC 25922, a las diferentes concentraciones de los péptidos A. Css54 [15E] <sup>+4</sup> y B. Css54 [14] <sup>+5</sup> , a las 12 horas de incubación.....	52
<b>Figura 20.</b> Cinética de inhibición de crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> con Ampicilina.....	53
<b>Figura 21.</b> Cinética de inhibición de crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> con Ampicilina. ....	54
<b>Figura 22.</b> Cinética de inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> con las combinaciones de Css54 [15E] <sup>+4</sup> /Ampicilina.....	55
<b>Figura 23.</b> Cinética de inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> con las combinaciones de Css54 [14] <sup>+5</sup> /Ampicilina. ....	56
<b>Figura 24.</b> Cinética de inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> con las combinaciones de Css54 [14] <sup>+5</sup> /Ampicilina. ....	56
<b>Figura 25.</b> Interacción de Ampicilina con el sitio activo de PBP3. Con flechas rojas se señala la molécula de Ampicilina y con líneas punteadas color gris se señalan los puentes de hidrógeno entre la Ampicilina y PBP3 (Papp Wallace et al., 2012) .....	60
<b>Figura 26.</b> Interacción de Ampicilina con el sitio activo de PBP6. La molécula de Ampicilina, se encuentra en color rojo y con líneas punteadas color verde se señalan los puentes de hidrógeno entre la Ampicilina y PBP6 (Chen et al., 2009).....	61
<b>Figura 27.</b> Posibles puntos de interacción de los péptidos con Ampicilina. En las secuencias de los péptidos se observa en color rojo las Lisinas, las cuales son los posibles puntos de interacción con el grupo COOH de la Ampicilina a través de puentes de hidrógeno. ....	61

## I. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Símbolo/Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
°C	Grados Celsius o Centígrados
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ACN	Acetonitrilo
Amp	Ampicilina
APD2	Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos
ATCC	Colección Americana de Cultivos
BI	Índice de Boman
C-terminal	Carboxilo terminal
CLSI	Instituto de Normas Clínica y de Laboratorio
CMI	Concentraciones Mínimas Inhibitorias
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
Da	Daltones
DO	Densidad Óptica
EH	Eritrocitos Humanos
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonil
GRAVY	Gran Promedio de Hidropaticidad
H (%)	Porcentaje de Hidrofobicidad
HPLC	Cromatografía de Líquido de Alta Resolución
M	Concentración molar (número de moles/litro)
m/z	Relación masa/carga
min	Minutos
mm	Milímetros
nm	Nanómetro
PM	Peso Molecular
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PBS	Buffer de Fosfato Salino
PPBs	Proteínas Fijadoras de Penicilina
pI	Punto Isoeléctrico
ppm	Partes por millón
Q	Carga neta
rpm	Revoluciones por minuto
tBu	ter-Butil
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WHO	Organización Mundial de la Salud

## II. RESUMEN

El uso excesivo e incorrecto de los antibióticos, ha causado un incremento en la incidencia de infecciones bacterianas ocasionadas por cepas resistentes a su acción, como consecuencia de esta problemática ha surgido la necesidad de identificar y desarrollar agentes antimicrobianos novedosos, que permitan el control de la multirresistencia a los antibióticos.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs), son moléculas naturales o sintéticas que se han propuesto como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos antibióticos. Debido a que presentan características como un amplio espectro de actividad antimicrobiana, sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos, parásitos y virus; adicionalmente a diferencia de los antibióticos convencionales los PAMs presentan múltiples blancos de acción en las células bacterianas, incluyendo la disrupción de la membrana plasmática o interfiriendo con procesos como la síntesis de la pared celular, ADN, ARN y proteínas como los más importantes, por los PAMs pueden ejercer sus efectos bactericidas de forma directa o actuar como adyuvantes y potenciadores de otras moléculas antibióticas. La combinación de antibióticos con péptidos antimicrobianos puede potenciar su espectro antimicrobiano respecto a su uso por separado.

En el veneno de diferentes animales, como los arácnidos, se han identificado una gran variedad de PAMs, un ejemplo de estas moléculas, es el péptido denominado C<sub>ss</sub>54 proveniente del alacrán *Centruroides suffusus suffusus*, este péptido tiene una longitud de 25 aminoácidos y un peso molecular de 2,870.4 Da, presenta actividad antibiótica de amplio espectro, efectos hemolíticos sobre eritrocitos humanos y la capacidad de potenciar los efectos de antibióticos comerciales.

En un trabajo previo mediante ingeniería de proteínas y síntesis química se generaron dos péptidos cortos (14 y 15 aminoácidos), a partir de la secuencia del péptido C<sub>ss</sub>54 con actividades bactericidas sobre *E. coli* y *S. aureus*, en este trabajo se evaluó el efecto de estos péptidos cortos en combinación con antibióticos, esto para poder potenciar sus efectos antimicrobianos sobre cepas bacterianas de interés clínico como *E. coli* y *S. aureus*.

Primero se realizó la verificación de las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, lo cual nos dio como resultado que se encontraban puras. Se evaluó la susceptibilidad de cada cepa con diferentes antibióticos, mediante la técnica de Kirby-Bauer de acuerdo con lo estipulado por el CLSI. De acuerdo a lo esperado, debido a que son cepas de colección ATCC, ambas cepas bacterianas fueron sensibles a los antibióticos probados (Ampicilina, Cefotaxima, Gentamicina, Cefepime, Levofloxacina, Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina). Este ensayo nos ayudó para elegir los antibióticos para realizar las

combinaciones con los dos péptidos cortos. El antibiótico seleccionado fue Ampicilina que tiene como blanco de acción, la pared celular.

Los dos péptidos cortos de C<sub>ss</sub>54 se purificaron a homogeneidad por HPLC y se identificaron por espectrometría de masas, el péptido C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> presentó un PM de 2009.5 Da, mientras que el péptido C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> un PM de 1880.4 Da.

Una vez que se purificaron los péptidos, se cuantificaron y se llevaron a diferentes concentraciones, para evaluarlos con las dos cepas; y obtener las CMI, mediante el método de dilución en líquido. El péptido C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> presentó una CMI de 25 µM con *S. aureus* y una CMI de 50 µM con *E. coli*, mientras que el péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> presentó valores de CMI de 25 y 12.5 µM con *S. aureus*; y una CMI de 50 µM con *E. coli*.

Posteriormente se realizó un ensayo en líquido para determinar las CMI del antibiótico a diferentes concentraciones en ambas cepas, Ampicilina presentó una CMI de 2.6925µM (1µg/ml) con *S. aureus* y una CMI de 6.7314µM (2.5µg/ml) con *E. coli*.

Por último, se realizaron las combinaciones del péptido C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y Ampicilina, para evaluarlas en ensayos por el método en líquido. Estas combinaciones fueron evaluadas en *E. coli* ATCC 25922, obteniendo como resultado que los efectos inhibitorios eran menores, a los obtenidos cuando estos trabajan por separados. También se realizaron combinaciones del péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> y Ampicilina; la cuales, fueron evaluadas en *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Los efectos que se observaron fueron menores a los obtenidos cuando el péptido y Ampicilina trabajan por separado, es decir, se obtuvo efectos antagónicos. Por lo que en trabajos posteriores se evaluará el potencial antimicrobiano de estas variantes en combinación con antibióticos con blancos de acción intracelulares de comerciales sobre bacterias multirresistentes a los antibióticos, ya que nuestras variantes cortas en combinación con ampicilina no pueden potenciar sus efectos, pero con otros antibióticos si podría tener efectos potenciadores. Tal es el caso de La47 que en combinación con ampicilina tiene efectos antagónicos, mientras que, con Cloranfenicol, Estreptomicina y Kanamicina presentó efectos potenciadores.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas específicas derivadas o producidas por algunos microorganismos, que incluso en pequeñas concentraciones son capaces de destruir o inhibir el desarrollo de las bacterias (De Ahumada-Vázquez, *et al.*, 2002). En el siglo XX el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos, desde entonces, su empleo clínico ha permitido disminuir la morbimortalidad asociada a diversas patologías de forma muy significativa (Cabrera *et al.*, 2007; Alvo, *et al.*, 2016).

#### 1.1.1. Clasificación de los antibióticos

Las clasificaciones de los antibióticos se establecen de acuerdo con su efecto de acción sobre la bacteria blanco o en función de su mecanismo o estructura celular bacteriana sobre la cual ejercen su acción (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

De acuerdo con su efecto de acción sobre las células bacterianas los antibióticos se clasifican en:

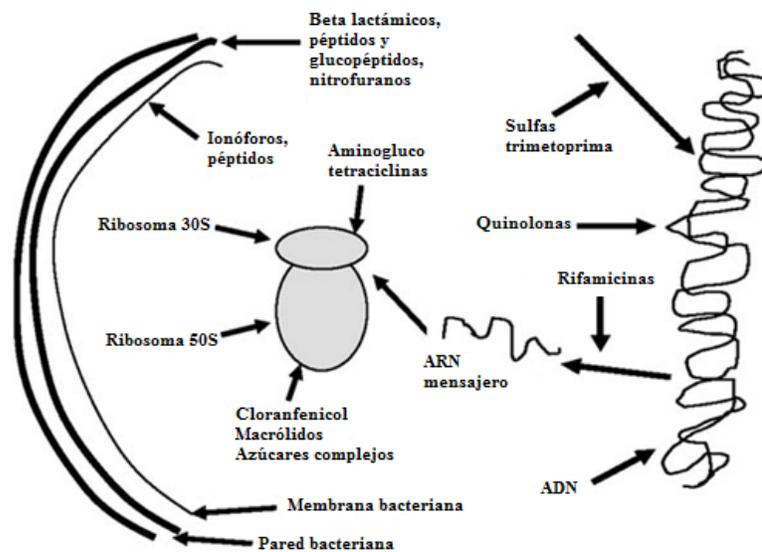
- a) **Bactericidas:** ejercen una acción letal para la bacteria, es decir destruye la bacteria.
- b) **Bacteriostáticos:** sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican en: 1) Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana, 2) Antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana, 3) Inhibidores de la síntesis proteica y 4) inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (Calderón y Perdue-Sabundayo, 2007; Falconer *et al.*, 2011; Kohanski *et al.*, 2010; Molina-López, 2015). En la Tabla 1 se enumeran ejemplos de antibióticos pertenecientes a cada uno de estos grupos y en la Figura 1 se presentan los agentes antibacterianos más comunes y sus sitios de acción dentro de la estructura bacteriana.

**Tabla 1.** Ejemplos de antibióticos clasificados con base en su mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Tipo de antibiótico
1. Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas Cefalosporinas Vancomicina Teicoplanina Bacitracina
2. Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Polimixinas Colistinas Nistatina Anfotericina B
3. Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol Tetraciclina Aminoglucósidos Eritromicina
4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Sulfonamidas Rifampicina Trimetoprima

Calderón y Perdue-Sabundayo, 2007; Falconer *et al.*, 2011; Kohanski *et al.*, 2010; Molina-López, 2015.



**Figura 1.** Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, así como algunos ejemplos de antibióticos que actúan sobre ellos (Errecalde, 2004).

- 1) Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana:** La pared celular protege la integridad de la bacteria, esta es esencial para su supervivencia. La pared celular soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas) y la ausencia de esta capa genera la muerte celular bacteriana (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Por lo tanto, los antibióticos que inhiben la síntesis de peptidoglicano (compuesto esencial de la constitución y ensamblaje de la pared celular), necesitan que las bacterias se encuentren en crecimiento activo para poder ejercer su acción y para ejercer su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o

hipotónico, lo que favorece la lisis celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias Gram positivas por su mayor riqueza en peptidoglucano (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Algunos ejemplos de antibióticos pertenecientes a este grupo son: los beta lactámicos, los glucopéptidos (Vancomicina, Teicoplanina y Avoparcina), la Bacitracina y las Estreptograminas (Virginiamicina, Quinupristina-Dalfopristina) (Errecalde, 2004).

- **2) Antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana:** La membrana citoplásmica es muy importante para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en estado de latencia, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplásmica (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). A este grupo pertenecen las Polimixinas que tienen actividad de tipo detergente, debido a que rompen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas (Errecalde, 2004). Otro antibiótico que actúa en la membrana es la Gramicidina, la cual produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de poros por donde puede haber pérdida del contenido citoplasmático de la bacteria (Molina-López, 2015).
- **3) Inhibidores de la síntesis proteica:** La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (small o pequeña, en la subunidad 30S) o L (large o grande, en la subunidad 50S). Los Aminoglucósidos y Aminociclitolos actúan a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero. De esta manera, la proteína que se sintetice contendrá errores y no será útil. También son capaces de inducir alteraciones de las membranas. Las Tetraciclinas, por su parte, también se unen al ribosoma en la porción 30S inhibiendo la unión del aminoacil RNAt al ribosoma, sólo que esta unión no es definitiva sino temporal, por lo cual ejerce sólo un efecto bacteriostático. El Cloranfenicol, Tianfenicol y Florfenicol, actúan a nivel de la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Las lincosamidas y macrólidos, también se unen a la porción 50S, inhibiendo la translocación. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática,

en cambio los Aminoglucósidos se comportan como bactericidas. La acción bactericida o bacteriostática es dependiente de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Errecalde, 2004; Molina-López, 2015).

- **4) inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:** La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. Los antibióticos pueden interferir a diferentes niveles en la síntesis de los ácidos nucleicos. Pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o causar una interconversión de nucleótidos, pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN. Entre ellos tenemos a las Sulfamidas y Trimetoprima cuya acción como antimetabolitos, impide la síntesis de purinas, los distingue del resto. Las Fluoroquinolonas y Novobiocina actúan a nivel de las cadenas de ADN, impidiendo el superenrollamiento, por inhibición de una topoisomerasa, que es la girasa de ADN. Los Nitroimidazoles, como Dimetridazol, Metronidazol y Tinidazol dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación. Los Nitrofuranos, por su parte impiden la lectura codónica ADN-ARN mensajero (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Errecalde, 2004; Molina-López, 2015). En la Tabla 2 se presenta ejemplos de antibióticos, resaltando los mecanismos o blancos de su acción, así como su espectro de actividad, organizados de acuerdo con la clasificación química de los antibióticos.

**Tabla 2.** Clasificación química de los antibióticos, algunos ejemplos, modo de acción y espectro simplificados (Errecalde, 2004).

Grupo	Mecanismo de acción	Miembros	Espectro
<b>Beta lactámicos: Penicilinas</b>	Inhiben la síntesis de pared	Penicilina G Penicilina V	Gram positivos
		Ampicilina	Gram positivos y negativos
<b>Beta lactámicos: Cefalosporinas</b>	Inhiben síntesis de pared	Cefalexina	Gram positivos y negativos, actividad frente a Estafilococos productores de penicilinas
		Cefuroxima	Menor actividad frente a Gram positivos que contra Gram negativos
		Moxalactam	Gram positivos, enterobacterias
<b>Beta lactámicos: Inhibidores de la Beta lactamasa</b>	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Ácido clavulánico	Bacterias productoras de beta lactamasa
		Sulbactam	
		Tazobactam	
<b>Beta lactámicos: Carbapenems</b>	Inhiben síntesis de pared	Imipenem-cilastatina	Gram positivos y negativos, aerobios y anaerobios
<b>Beta lactámicos: Monobactams Aminoglucósidos</b>	Inhiben síntesis de pared	Aztreonam	Gram negativos aerobios
		Inhiben síntesis proteica porción 30S ribosomal	Neomicina Gentamicina

**Continuación de la Tabla 2.**

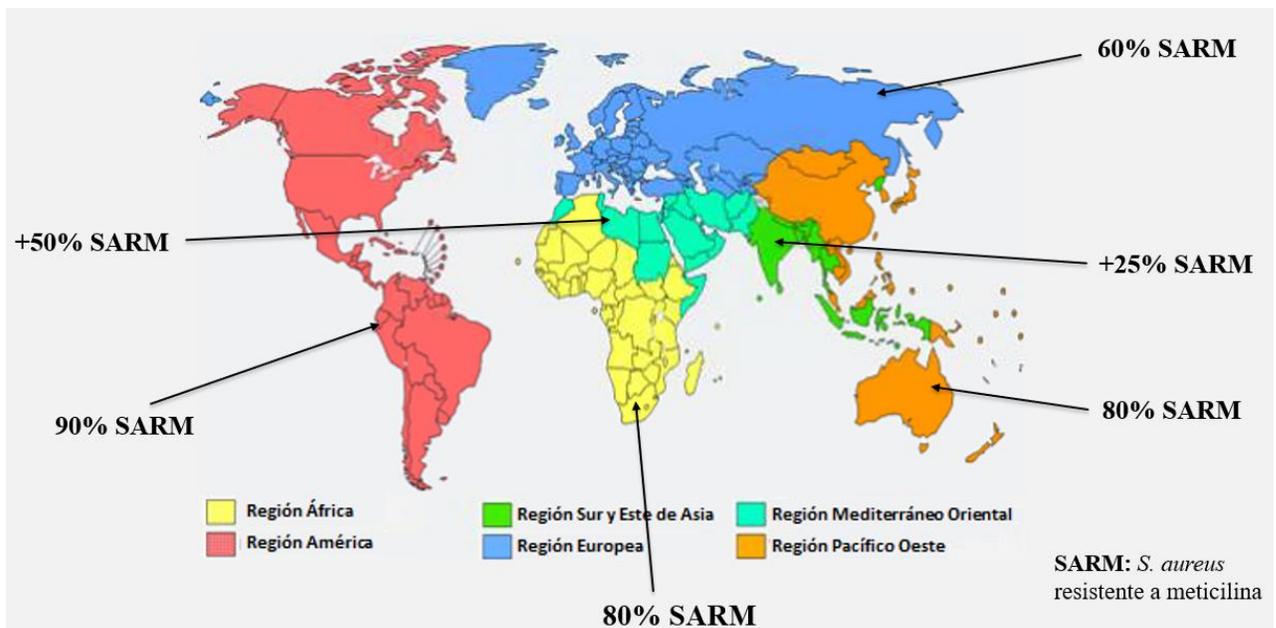
<b>Grupo</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Miembros</b>	<b>Espectro</b>
<b>Aminociclitolos</b>	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Espectinomicona	Gram negativos y micoplasmas
<b>Azúcares complejos o Lincosamidas</b>	Inhiben síntesis proteica porción 50S ribosomal	Lincomicina	Gram positivos anaerobios y micoplasmas
		Clindamicina	
		Pirlimicina	
<b>Rifamicinas</b>	Inhibe ARN polimerasa	Rifampicina	Gram positivos y micobacterias
<b>Péptidos</b>	Desorganizan membrana	Polimixina B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Glucopéptidos</b>	Inhibe síntesis de pared	Vancomicina	Gram positivos y negativos
		Teicoplanina	
<b>Estreptograminas</b>	Inhibe peptidil transferasa	Virginamicina	Gram positivos y negativos, aerobios y anaerobios
<b>Macrólidos</b>	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Eritromicina	Gram positivos y negativos
		Oleandomicina	
<b>Rifamicinas</b>	Inhibe ARN polimerasa	Rifampicina	Gram positivos y micobacterias
<b>Péptidos</b>	Desorganizan membrana	Polimixina B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Colistín	
<b>Glucopéptidos</b>	Inhibe síntesis de pared	Vancomicina	Gram positivos y negativos
<b>Estreptograminas</b>	Inhibe peptidil transferasa	Virginamicina	Gram positivos, aerobias y anaerobias
<b>Macrólidos</b>	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Eritromicina	Gram positivos y negativos
		Tilosina	
<b>Fenicoles</b>	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Cloranfenicol	Gram positivos y negativos, Rickettsias y Chlamydias
<b>Tetraciclinas</b>	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Oxitetraciclina	Gram positivos y negativos, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
		Doxiciclina	
<b>Fluoroquinolonas</b>	Inhiben ADN girasa	Enrofloxacina	Gram positivos y Gram negativos
		Danofloxacina	
<b>Sulfonamidas</b>	Interfieren la síntesis de ácido fólico	Sulfanilamida	Gram positivos y negativos, y Coccidios
		Sulfadiazina	
		Sulfatiazol	
		Ftalilsulfatiazol	
<b>Diaminopirimidinas</b>	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Trimetoprima	Gram positivos y negativos, aerobios
		Baquiloprima	
<b>Ionóforos</b>	Alteran flujo de membrana	Monensina	Coccidiosis, promoción del crecimiento en ganado.
		Salinomicona	
<b>Nitrofuranos</b>	Previenen traslación ARN mensajero	Nitrofurazona	Gram positivos y Gram negativos
		Furazolidona	
<b>Nitroimidazoles</b>	Disrupción del ADN	Metronidazol	Anaerobios
		Dimetridazol	

El uso indebido y desmedido de los antibióticos ha hecho que el consumo global de antibióticos aumente de manera impresionante, y a su vez, ha generado que las bacterias se vuelvan resistentes a su acción (WHO, 2017; WHO, 2001). Un grupo de investigadores realizó un análisis del consumo de antibióticos en 76 países, como resultados obtuvieron que entre los años 2000 y 2015, la tasa de consumo de antibióticos aumentó en un 39% (11.3–15.7 dosis diarias por 1,000 habitantes por día); estos resultados fueron obtenidos de datos de ventas para farmacias minoristas y de hospitales de la base de datos IMS Health (Klein *et al.*, 2018).

## 1.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos

Por “*resistencia a los antibióticos*” se entiende específicamente a la capacidad que desarrollan las bacterias comunes causantes de infecciones para resistir la acción de agentes antibióticos. Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos (WHO, 2018). Algunas de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana son: el uso indebido y desmedido de los antibióticos como en el caso del tratamiento de infecciones menores de la piel, estomacales o de las vías respiratorias, las deficiencias en la prevención y control de las infecciones, el uso incorrecto por falta de acceso a tratamientos apropiados y la subutilización debido a la falta de recursos financieros para completar los tratamientos (WHO, 2001; WHO, 2017). La Organización Mundial de la Salud realizó un estudio global sobre el aumento de enfermedades infecciosas producidas por *S. aureus* resistentes a meticilina; los resultados obtenidos fueron publicados de acuerdo a la región a la que pertenecen (Figura 2):

- Región de África: En algunas zonas de la Región, hasta un 80% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina, lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no funciona.
- Región de las Américas: En algunos entornos, hasta un 90% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.
- Región del Mediterráneo Oriental: En algunas zonas de la región, más de la mitad de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.
- Región Europea: En algunos entornos, hasta un 60% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.
- Región Sur y Este de Asia: En algunas zonas de la Región, más de un 25% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.
- Región Pacífico Oeste: En algunas zonas de la Región, hasta un 80% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.

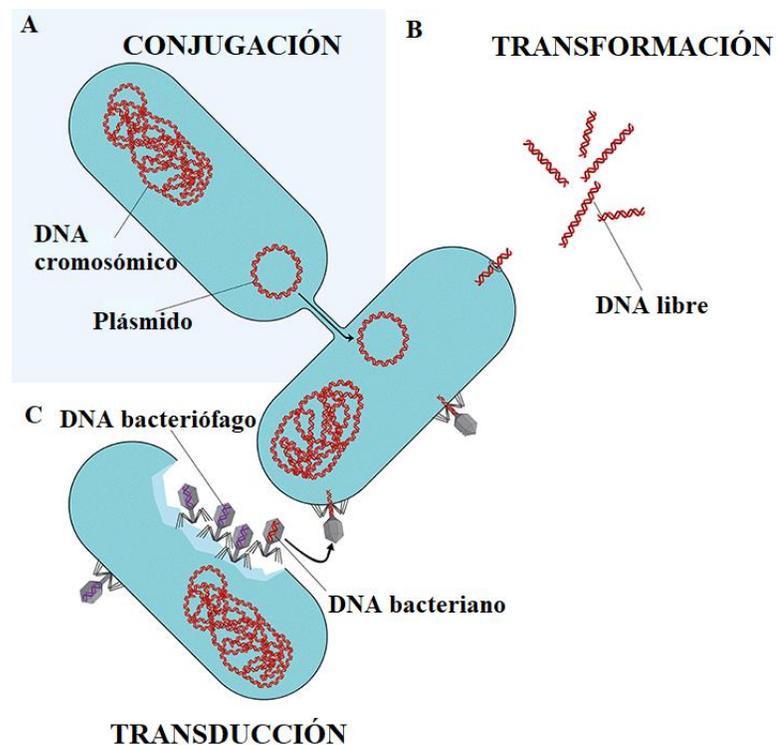


**Figura 2.** Porcentajes de enfermedades infecciosas producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, publicadas por regiones (WHO, 2017).

El aumento en la resistencia bacteriana por los antibióticos, se debe a que las bacterias sufren cambios en su DNA (Luna-Negret *et al.*, 2017), ya sea por mutación o por adquisición de nuevo material genético (Von Wintersdorff *et al.*, 2016), los cuales pueden llevarse a cabo mediante diferentes mecanismos de transferencia horizontal de genes como: transducción, conjugación o por competencia para la transformación natural por absorción de DNA extracelular (Bakkali, 2013).

- **Transducción:** La transducción puede ser especializada o generalizada, en este mecanismo intervienen bacteriófagos, los cuales pueden transferir genes ventajosos para sus huéspedes microbianos, a su vez promoviendo su supervivencia y diseminación. La transferencia de genes se da de una célula donante (que previamente fue infectada por un bacteriófago) a otra receptora (Figura 3C). El DNA transferido puede ser: DNA cromosómico, plásmidos, transposones o islas genómicas. La transducción es especializada, cuando el DNA de una región específica del cromosoma del hospedero se integra directamente al genoma del virus y es generalizada, cuando cualquier porción del genoma bacteriano se integra y forma parte del genoma del bacteriófago (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; Karp, 2009).
- **Conjugación:** Es el contacto entre dos células bacterianas, una donadora y otra receptora de DNA. El contacto se da mediante el *pili* de superficie celular o adhesinas (Figura 3A), a través de las cuales se transfiere el DNA de la célula donante a la célula receptora (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; Karp, 2009).

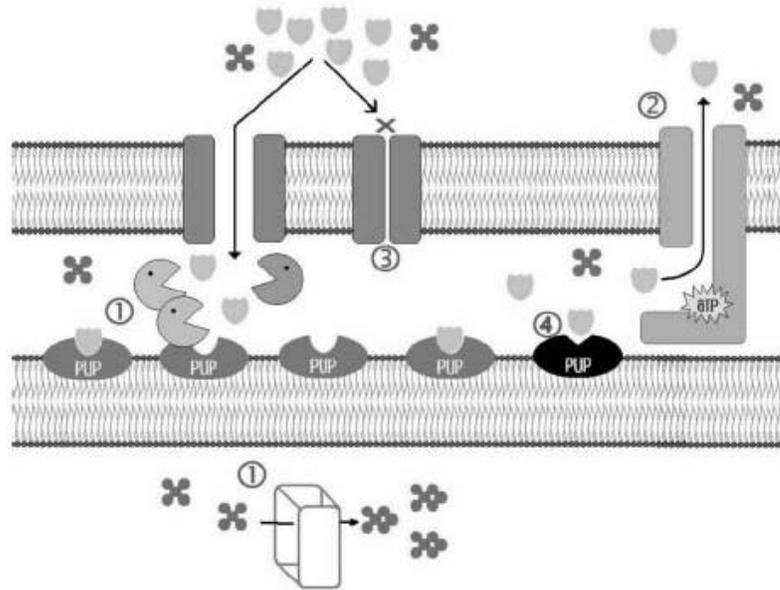
- Transformación:** Cuando una bacteria originalmente susceptible a los antibióticos capta fragmentos de ADN procedentes de otra bacteria resistente a algún antibiótico, la cual pudo morir debido a factores ambientales, puede adquirir genes que le confieren resistencia a los efectos de ese antibiótico (Figura 3B). Mediante este mecanismo las bacterias pueden ir añadiendo un arsenal de genes de resistencia a los antibióticos y así desarrollando resistencia a una amplia gama de estos compuestos, como es el caso de las cepas multirresistentes, las cuales pueden causar infecciones en el ser humano y a los animales, y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes. Un ejemplo de este tipo de bacterias es *S. aureus*, bacteria que causa graves estragos en muchos quirófanos (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; Karp, 2009).



**Figura 3.** Mecanismos de transferencia horizontal de genes. Cada cuadrante representa un método diferente de transferencia de genes. (A) La conjugación es un proceso que requiere el contacto célula a célula a través de *pili* o adhesinas de la superficie celular, a través de las cuales se transfiere el ADN de la célula donante a la célula receptora. (B) La transformación es la captación, integración y expresión funcional de fragmentos desnudos de ADN extracelular. (C) Mediante transducción especializada o generalizada, los bacteriófagos pueden transferir ADN bacteriano de una célula donante previamente infectada a la célula receptora (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

### 1.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir a la acción de los antibióticos. Estos mecanismos de resistencia pueden resumirse en cuatro categorías principales (Figura 4).



**Figura 4.** Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras, 2. Bombas de eflujo, 3. Cierre de porinas, 4. Proteínas unidoras de penicilinas (Fernández-Riverón *et al.*, 2003).

- 1. Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. (Fernández-Riverón *et al.*, 2003; Tafur *et al.*, 2011).
- 2. Bombas de eflujo:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Fernández-Riverón *et al.*, 2003; Tafur *et al.*, 2011).
- 3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Fernández-Riverón *et al.*, 2003; Tafur *et al.*, 2011).
- 4. Alteraciones del sitio de acción:** las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta (Fernández-Riverón *et al.*, 2003; Tafur *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Consecuencias de la resistencia bacteriana

El fenómeno de resistencia bacteriana a los antibióticos tiene grandes implicaciones tanto a nivel salud como económicas. En el caso de pacientes con infecciones ocasionadas por bacterias resistentes, los costos de tratamiento se incrementan por la necesidad de mayor número de análisis clínicos, estadías más largas de convalecencia, mayores concentraciones de antibióticos de primera línea o el uso de agentes antimicrobianos de segunda línea, lo cual puede resultar en efectos adversos. Inclusive las bacterias más resistentes pueden ser inhibidas o erradicadas por una concentración suficientemente alta de antibióticos, sin embargo, los pacientes no son capaces de tolerar las concentraciones necesarias, sin sufrir efectos tóxicos o incluso la muerte (Rodríguez-Solís, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. La lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos (WHO, 2017).

Esta lista se divide en tres categorías, de acuerdo con la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media (WHO, 2017).

- **Prioridad crítica:** son las bacterias multirresistentes (Tabla 3) que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Las bacterias de esta categoría pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías.
- **Prioridad alta y media:** son bacterias que exhiben una farmacoresistencia creciente (Tabla 3) y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonela.

**Tabla 3.** Lista de las bacterias más peligrosas para la salud humana (WHO, 2017)

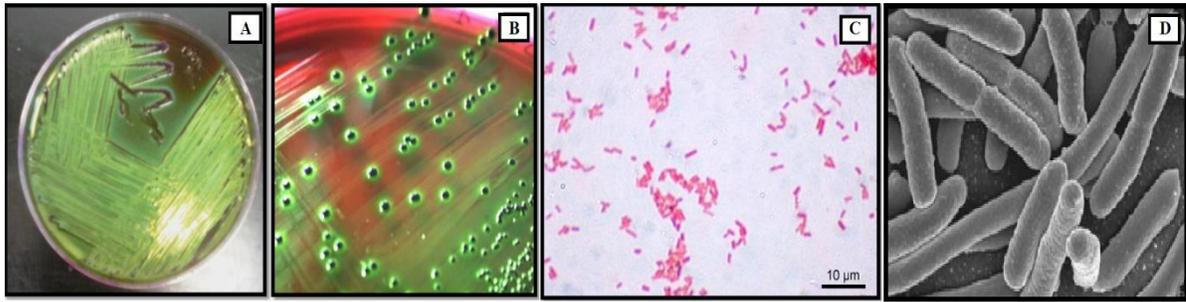
<b>Prioridad 1: crítica</b>	
<b>Bacteria</b>	<b>Resistencia a:</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	resistente a los carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	resistente a los carbapenémicos
La familia de <i>Enterobacteriaceae</i>	resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL
<b>Prioridad 2: alta</b>	
<b>Bacteria</b>	<b>Resistencia a:</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	resistente a la claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	resistente a las fluoroquinolonas
<i>Salmonellae</i>	resistentes a las fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
<b>Prioridad 3: media</b>	
<b>Bacteria</b>	<b>Resistencia a:</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	sin sensibilidad a la penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	resistente a la ampicilina
<i>Shigella spp</i>	resistente a las fluoroquinolonas

Debido a la magnitud del problema sobre la resistencia bacteriana, en este trabajo se utilizaron como modelos bacterianos, dos bacterias, una Gram negativa: *Escherichia coli* y una Gram positiva: *Staphylococcus aureus* a continuación, se describen algunas de las características de estas bacterias.

***Escherichia coli*:** Son bacilos Gram negativos (Figura 5), aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. En cultivo sólido sobre placas de Petri, sus colonias se observan ligeramente blanquecinas, con una superficie suave brillante y un aspecto húmedo, su consistencia es blanda y con una elevación convexa.

Forman parte del grupo de los “coliformes”, *E. coli* es una bacteria presente en la microbiota normal gastrointestinal de animales de sangre caliente y se elimina por las heces. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas cepas han adquirido factores de virulencia, generando una incidencia anual de aproximadamente 630 millones de casos de enfermedades gastrointestinales en el mundo, de los cuales entre 5 y 6 millones de pacientes mueren, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo.

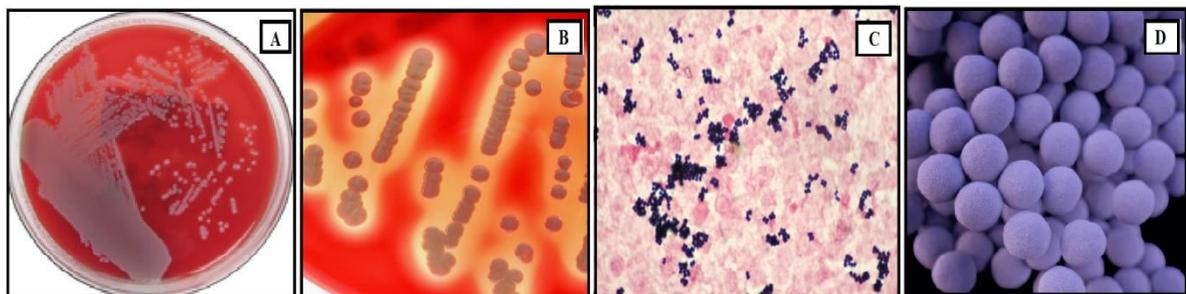
También hay algunas cepas resistentes a las Fluoroquinolonas, que han cobrado relevancia en infecciones urinarias a nivel mundial (De La Fuente *et al.*, 2017; WHO, 2016; Molina-López y Eslava-Campos, 2015).



**Figura 5.** *Escherichia coli*. A y B. Cultivo en Eosina y Azul de metileno, las colonias presentan una coloración verde metálico, C. Tinción de Gram, coloración rosado característica de las bacterias Gram negativas, D. Micrografía electrónica que presenta a *E. coli* con morfología de bacilos cortos (Salas, 2014).

***Staphylococcus aureus* (aureus, en latín significa colonias de oro)** (Fetsch, 2017): Son bacterias Gram positivas (Figura 6), son inmóviles y no forman esporas. En cultivo sólido sobre placas de Petri, las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo al dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen  $\beta$ -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre (García-Martos *et al.*, 1997; Pahissa, 2009).

*Staphylococcus aureus* es causante de infecciones cutáneas, se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la Metilina tienen una mayor probabilidad de morir, un 64% respecto a los pacientes con infecciones causadas por cepas no resistentes (WHO, 2016). Las infecciones por *S. aureus* son supurativas y tienden a producir abscesos. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales (Cervantes-García *et al.*, 2014).



**Figura 6.** *Staphylococcus aureus*. A y B. Cultivo en agar de sangre, las colonias presentan una coloración grisácea debido al hemólisis que producen, C. Tinción de Gram, coloración violeta característica de las bacterias Gram positivas, D. Micrografía electrónica que presenta a *Staphylococcus aureus* con morfología de cocos que forman agrupaciones características en “racimo de uva” (Pahissa, 2009).

Debido a la problemática de resistencia bacteriana, varios centros de referencia como: el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), se han dado a la tarea de publicar la terminología y las normas más ideales para realizar los ensayos correspondientes en relación al estudio de los agentes antimicrobianos y sus respectivas combinaciones, además de proporcionar los valores correspondientes que ayuden a una correcta y acertada interpretación de los resultados de pruebas de susceptibilidad.

Los métodos idóneos para estudiar la sensibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos son las técnicas de dilución y de difusión. La técnica de dilución proporciona resultados como el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI), y la técnica de difusión proporciona información sobre la resistencia o susceptibilidad de las cepas bacterianas a los agentes antimicrobianos, permitiendo identificar si las cepas presentan susceptibilidad, susceptibilidad intermedia o resistencia. Ambos métodos son importantes, porque existe una correlación directa entre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano obtenido en la técnica de difusión y la CMI obtenida en la técnica de dilución. La resistencia (R) se observa cuando un microorganismo no es afectado o no presenta inhibición frente a altas concentraciones de uno o varios antibióticos a los que en un tiempo previo era sensible, es decir, se volvió “*immune*” a estos. En el efecto de susceptibilidad intermedia (I), se pueden observar respuestas variables hacia un antimicrobiano, porque los microorganismos, se presentan clínicamente susceptibles y/o resistentes, es decir, que la eficacia clínica está implicada en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. Quinolonas y  $\beta$ -lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor de lo normal de una droga puede ser usada. Se dice que un microorganismo es susceptible (S) o sensible, si una infección debido a este microorganismo puede ser apropiadamente tratada con la dosis del agente microbiano recomendado para este tipo de infección y especie infectante (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015; CLSI, 2018).

### **1.3. Combinación de antibióticos**

La mayoría de las infecciones bacterianas en los pacientes pueden ser tratadas con un solo antibiótico, sin embargo, cada vez ha aumentado la aparición de infecciones potencialmente severas que son causadas por bacterias resistentes, lo que las hace más difíciles de tratar con los antibióticos disponibles. El problema de la resistencia a los antibióticos ha motivado a seguir investigando para descubrir nuevos medicamentos para el control de infecciones bacterianas, así también como la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos no comunes o la elaboración de combinaciones entre antibióticos comerciales disponibles para generar efectos benéficos como (Veitía-Velázquez *et al.*, 2008) (García *et al.*, 2013):

- Sinérgicos: cuando el efecto de dos o más antibióticos resulta mejor que el obtenido con los antibióticos por separado.
- Aditivos: cuando el efecto de la mezcla de dos o más antibióticos, es mucho más potente, que los antibióticos por separado.

Aunque también, puede ocurrir un efecto antagónico, donde los dos antibióticos compiten por el mismo receptor, haciendo que se inhiba uno de ellos.

### **1.3.1. Combinaciones de antibióticos en México**

La combinación de antibióticos comerciales con nuevos antimicrobianos, ha sido una de las mejores estrategias propuestas para mejorar la eficiencia de los tratamientos y así mismo combatir la resistencia y multiresistencia de las bacterias hacia los antibióticos. El propósito para estudiar las combinaciones de antimicrobianos es potenciar el efecto de los antimicrobianos contra la resistencia de las bacterias, esto podría ser una aplicación muy promisoriosa para tratamientos terapéuticos contra enfermedades infecciosas en la salud pública (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015). Ejemplos de enfermedades infecciosas, en las cuales las bacterias que las provocan son resistentes a antibióticos comunes son: la gastroenteritis aguda (diarrea aguda) (Bielsa-Fernández *et al.*, 2016) y las infecciones en el tracto urinario (Molina-López y Manjarrez-Hernández, 2015).

La diarrea aguda, es una de las enfermedades infecciosas más recurrente en México con cinco millones de casos en el año 2011. En el 2015 se realizó un estudio de 1,000 pacientes con coprocultivos positivos a gastroenteritis aguda, estos eran adultos y niños de la Ciudad de México. De los 1,000 pacientes el 90.76% necesitó antimicrobianos, además necesitaron probióticos y antidiarreicos, individualmente o en diversas combinaciones (Bielsa-Fernández *et al.*, 2016).

Las infecciones en el tracto urinario son de las enfermedades infecciosas con mayor incidencia en México durante el 2013, donde *E. coli* es la principal bacteria implicada, es causante de más del 90% de este tipo de infecciones, debido a esto se considera un problema frecuente de salud pública. El antimicrobiano más recetado para estas infecciones son la Nitrofurantoina por vía oral, o una combinación de Sulfonamida-Trimetoprima, asimismo, se pueden utilizar Amoxicilina, Cefalexina o Ciprofloxacina. Estos regímenes de antibióticos, presentaban eficacias del 90 al 95% en infecciones en el tracto urinario en mujeres, sin embargo, esto ha cambiado debido a las resistencias desarrolladas por las bacterias ante estos y otros antimicrobianos. Por ello, se ha recurrido a utilizar como alternativas para su tratamiento combinaciones de antibióticos como Trimetoprim-Sulfametoxazol, Amoxicilina-Clavulanato y Ticarcilina-Clavulanatos (Molina-López y Manjarrez-Hernández, 2015).

### **1.3.2. Alternativas para el control de infecciones**

El uso inadecuado de los antibióticos, incluye prácticas como la prescripción injustificada y el incumplimiento del “uso racional” de los antibióticos, lo que implica mayores gastos en el sector salud, derivados del desperdicio de antibióticos y el desarrollo de la resistencia bacteriana a su acción.

Por ello, en los últimos años, la investigación farmacológica se ha dado a la tarea de buscar nuevos agentes antimicrobianos con propiedades y/o mecanismos de acción diferentes a los convencionales, entre los cuales se pueden encontrar los péptidos antimicrobianos (PAMs) de distintas fuentes; por ejemplo los péptidos, LL-37 de origen humano, Magainina proveniente de la piel de la rana *Xenopus laevis* y Csx54 y Pin2 obtenidos del veneno de los escorpiones *Centruroides suffusus suffusus* y *Pandinus imperator*, respectivamente (Corzo *et al.*, 2001; García *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2007).

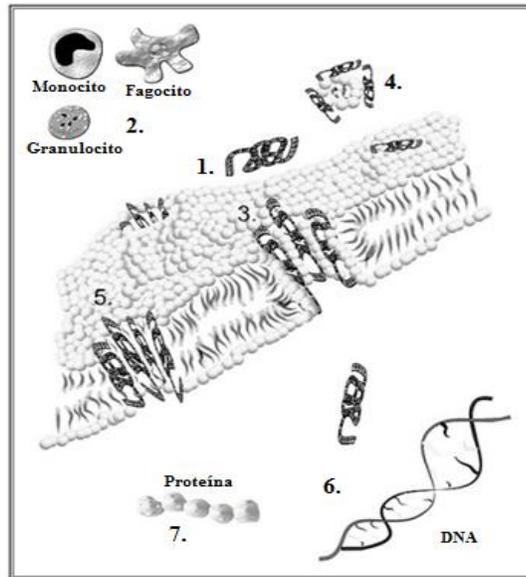
### **1.4. Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (PAMs de sus siglas en inglés: Anti Microbial Peptides), inhiben el crecimiento y/o establecimiento de bacterias, hongos, parásitos y virus encapsulados. Los PAMs constituyen un mecanismo de defensa ampliamente distribuido en plantas, insectos y vertebrados. (Castañeda-Casimiro *et al.*, 2009). Los PAMs son oligopéptidos, pequeñas proteínas que están conformadas de 12-50 aminoácidos (Grassi *et al.*, 2017).

El descubrimiento de los PAMs se remonta a 1939, cuando Dubos extrajo un agente antimicrobiano a partir de una cepa de *Bacillus* proveniente del suelo. Este extracto demostró la capacidad de proteger a los ratones de la infección por neumococos. En total, más de 5,000 PAMs se han descubierto o sintetizado hasta la fecha, los PAMs naturales se pueden encontrar tanto en procariotas (por ejemplo, bacterias) y eucariotas (por ejemplo, protozoos, hongos, plantas, insectos, y animales). Por citar un ejemplo, solo en la piel de diferentes especies de ranas se han identificados más de 300 PAMs diferentes (Bahar y Ren, 2013).

#### **1.4.1. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos**

La gran variedad estructural de los péptidos antimicrobianos sugiere que su actividad no está dirigida a blancos celulares concretos como enzimas o receptores (como los antibióticos convencionales), sino a características comunes de las membranas bacterianas (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010). En la Figura 7 se presentan los mecanismos principales de acción de los PAMs.



**Figura 7.** Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. 1. Interacción de membrana, 2. Funciones inmunomoduladoras, 3. Formación de poros en forma toroidal, 4. Mecanismo de agregado, 5. Forma de poros en forma de barril, 6. Interacciones con el ADN y proteínas relacionadas, 7. Mecanismos que alteran la síntesis y plegamiento de proteínas (Téllez y Castaño, 2010).

A continuación, se describirán los principales mecanismos de acción de los PAMs:

**1. Interacciones con la membrana:** La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de la membrana. Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010). Recientemente se han encontrado nuevos blancos de acción de los PAMs como lo son: la pared celular bacteriana y/o la membrana, las cuales poseen proteínas que pueden ser blanco de los péptidos antimicrobianos (Kumar *et al.*, 2018; Sánchez, 2016). El péptido denominado Hecidina 25 y su isoforma Hecidina 20 presentan la habilidad de perturbar las membranas bacterianas de una forma dependiente del pH, siendo la misma más evidente a pH ácido. En esta condición, las histidinas son cargadas positivamente y así se vuelven más efectivas en la disrupción de la membrana (Sánchez, 2016). Otro ejemplo es el péptido Nisina, este se une con alta afinidad a la molécula del lípido II, un precursor de la pared celular anclado en la membrana (Kumar *et al.*, 2018).

**2. Funciones inmunomoduladoras:** Los péptidos de defensa del huésped tienen un amplio rango de funciones inmunomoduladoras, como controlar la expresión de genes en monocitos y células

epiteliales, presentar efectos quimiotácticos sobre las células del sistema inmune, la inducción de citocinas y la diferenciación celular, promoviendo la angiogénesis, la curación de las heridas y la resolución de las infecciones (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010). Además, ha sido también descrito que algunos péptidos antimicrobianos pueden penetrar las células inmunológicas y activarlas para conseguir una respuesta inmune, tal es el ejemplo de los péptidos derivados de cromogranina A pueden penetrar los neutrófilos, unirse a la calmodulina citoplasmática e inducir el influjo de  $Ca^{2+}$  conduciendo a la activación de neutrófilos y a la activación del sistema inmune (Kumar *et al.*, 2018).

**3. Mecanismo de formación de poros en forma de barril:** En este mecanismo los péptidos forman un poro en la membrana con un lumen central que semeja a un tapón compuesto por péptidos helicoidales (Castañeda-Casimiro, 2009). La formación de este tipo de poros es irregular en tamaño y duración, lo que genera, finalmente, una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana (Figura 7) (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010). Pocos péptidos como la Alameticina, la Pardaxina y las Protegrinas, han demostrado formar poros en forma de barril (Kumar *et al.*, 2018).

**4. Mecanismo de formación de poros en forma toroidal:** Los péptidos se unen a la membrana al alcanzar una concentración límite que hace que los lípidos se doblen formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos que, a diferencia del anterior, forma un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana. Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como Magainina 2, Mellitina, Lacticina Q y Aureína 2.2 (Gutiérrez y Orduz, 2003; Kumar *et al.*, 2018; Téllez y Castaño, 2010). Como los poros son transitorios tras la desintegración, algunos péptidos se translocan a la hoja citoplasmática interna que ingresa al citoplasma y potencialmente se dirigen a los componentes intracelulares (Kumar *et al.*, 2018).

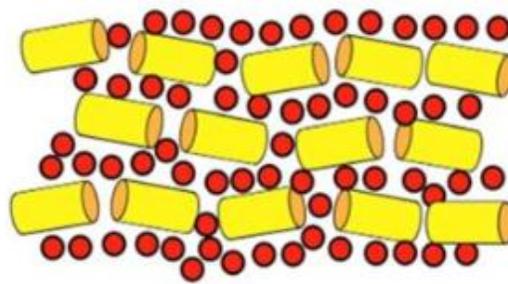
**5. Mecanismo de alfombra:** En este mecanismo, los péptidos no se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados con la cara externa y, al alcanzar un punto crítico, forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso en una configuración de la micela; eventualmente, se produce la muerte celular por pérdida del citoplasma (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010). Los ejemplos de AMP que actúan según el modelo de alfombra son Cecropin, Indolicidin, Aurein 1.2 y LL-37 (Kumar *et al.*, 2018).

**6. Mecanismo de agregado:** En este modelo, similar a la función de los detergentes, el péptido se une a la membrana y, a una concentración suficiente, se reorienta, lo que permite la formación de estructuras parecidas a las micelas que se extienden en la bicapa en un complejo péptido-lipídico. Estos

agregados aleatorios transmembranales, conformados por péptidos, lípidos y agua, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o la membrana puede desintegrarse por su acción, similar a la de un detergente (Gutiérrez y Orduz, 2003; Téllez y Castaño, 2010).

**7. Interacciones relacionadas con los ácidos nucleicos, síntesis, translocación y plegamiento de proteínas:** Algunos péptidos antimicrobianos pueden atravesar espontáneamente las membranas bacterianas, acumulándose intracelularmente, su presencia en el espacio intracelular puede interferir con procesos celulares críticos. Se han descubierto muchos PAMS presentan mecanismos de acción que implican efectos sobre dianas intracelulares, como la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas, la alteración de la actividad enzimática y proteica (Kumar *et al.*, 2018; Sánchez, 2016). Por ejemplo, la Buforina II, una AMP derivada de histonas de ranas, se transloca a través de la membrana bacteriana sin permeabilización y se une al ADN y al ARN de *E. coli* (Kumar *et al.*, 2018).

En el caso de los péptidos antimicrobianos cortos, debido a la longitud de su secuencia, cuando no son capaces de formar poros lo bastante grandes para desestabilizar la membrana de la bacteria; pueden interactuar con la membrana e internalizarse en ella, es decir que la hélice de su estructura se coloca con una orientación paralela a la superficie de la membrana (Figura 8), lo que hace que la asociación de membrana sea reversible y así mismo, llegar a su blanco de acción. También, pueden ingresar al interior de la célula bacteriana por difusión, es decir, atraviesan la membrana sin interactuar con ella ni afectarla, de tal manera que al llegar al citoplasma y tener la concentración suficiente se trasladan a su blanco de acción (Kumar *et al.*, 2018; Marquette y Bechinger, 2018).



**Figura 8.** Interacción de un péptido (color amarillo) con la membrana de la bacteria (color rojo). El PAM se coloca con una orientación paralela a la superficie de la membrana (Marquette y Bechinger, 2018).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Diseño de péptidos antimicrobianos

En nuestro grupo de investigación se ha abordado el estudio, caracterización y diseño de péptidos antimicrobianos provenientes de alacranes, como las Pandininas 1 y 2 de *Pandinus imperator* (Corzo *et al.*, 2001) y el péptido Css54 de *Centruroides suffusus suffusus* (García *et al.*, 2013). La Pandinina 2 ha sido modificada en su secuencia con el objetivo de mejorar sus características terapéuticas (Rodríguez *et al.*, 2011), sintetizada con D-aminoácidos (Carmona *et al.*, 2013) y, recientemente, la longitud de su secuencia fue reducida para disminuir sus efectos tóxicos y costo de producción, se diseñaron dos variantes cortas, Pin2 [14] y Pin2 [17], de las cuales Pin2 [14] presentó solo el 25% de hemólisis hacia eritrocitos humanos a concentraciones tan altas como 100  $\mu\text{M}$ , mientras que el péptido Pin2 [17] no mostró ningún efecto hemolítico a la misma concentración, en lo que respecta a su actividad antimicrobiana ambos péptidos presentaron efectos bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los antibióticos. Por lo que Pin2 [14] y Pin2 [17] tienen el potencial de ser utilizados como una alternativa de antibióticos con efectos hemolíticos reducidos (Rodríguez *et al.*, 2014).

El péptido Css54, el cual se estudió en este trabajo, fue aislado del veneno del alacrán mexicano *Centruroides suffusus suffusus* (Figura 9), su secuencia de aminoácidos se determinó utilizando degradación de Edman del extremo N-terminal y espectrometría de masas. Este péptido está conformado por 25 aminoácidos, su peso molecular es de 2,870.4 Da, y presenta una estructura helicoidal de acuerdo a su espectro de Dicroísmo Circular. Se realizó la evaluación de su actividad antimicrobiana, hemolítica y su efecto potenciador al mezclarse con antibióticos de disponibilidad comercial, Css54 presentó actividades antimicrobianas y hemolíticas en rangos muy similares (3-25  $\mu\text{M}$ ) a los reportados para el péptido Pandinina 2 (García *et al.*, 2013). Estos péptidos presentan potencial como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas, inclusive con resistencia a la acción de los antibióticos. En la Tabla 4 se presentan las secuencias de los péptidos Pin2 y Css54.



**Figura 9.** Alacrán *Centruroides suffusus suffusus*.

**Tabla 4.** Secuencias de los péptidos antimicrobianos Pin2 y Css54.

Péptido	Fuente	Secuencia	No. Aminoácidos
Pin2	<i>Pandinus imperator</i>	FWGALAKGALKLIPSLFSSFS-KKD	24
Css54	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE	25

## 2.2. Variantes cortas del péptido antimicrobiano Css54

En el trabajo realizado por Martínez-Paula (2017), se generaron cuatro variantes cortas a partir de la secuencia del péptido antimicrobiano y hemolítico Css54. A estas variantes se les redujo el tamaño de las secuencias al eliminar aminoácidos poco relacionados con la actividad antimicrobiana, con la finalidad de reducir el costo de producción y la actividad hemolítica de los péptidos respecto del péptido parental, manteniendo sus los efectos antimicrobianos en rangos similares (Martínez-Paula, 2017), las secuencia cortas se muestran en la Tabla 5. Algunos de los parámetros fisicoquímicos que se tomaron en cuenta para el diseño de las variantes fueron: la carga neta ( $Q$ ), debe estar entre +4 y +8 para una mejor actividad antimicrobiana; la estructura ( $X$ ), debe ser alfa-helicoidal para favorecer la interacción con la membrana bacteriana; la anfipaticidad ( $A$ ), debe tener una cara hidrofóbica y un cara hidrofílica para una mejor interacción del péptido con la membrana bacteriana, ángulo polar ( $\theta$ ) entre menor sea este más potente es la actividad antimicrobiana del péptido, y la hidrofobicidad ( $H$ ) entre más cercana este al 50%, se presentarán mejores efectos antimicrobianos (Takahashi *et al.*, 2010).

**Tabla 5.** Secuencia de las variantes cortas de Css54 propuestas.

Nombre	Secuencia	No. aa	P.M. (Da)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	H (%)	GRAVY	Carga Neta	BI (Kcal/mol)
Css54	FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE	25	2870.4	NP	44	0.220	+4	0.62
Css54[16E] <sup>+4</sup>	FWKKLLELLFKLFRKL	16	2122.7	5500	62	0.419	+4	0.19
Css54[15E] <sup>+4</sup>	FWRKLELLFKFLKK	15	2009.5	5500	60	0.193	+4	0.53
Css54[15] <sup>+5</sup>	FWKLLKLLFKLFRKL	15	1993.6	5500	66	0.680	+5	-0.24
Css54[14] <sup>+5</sup>	FWRLKLLFKFLKK	14	1880.4	5500	64	0.457	+5	0.08

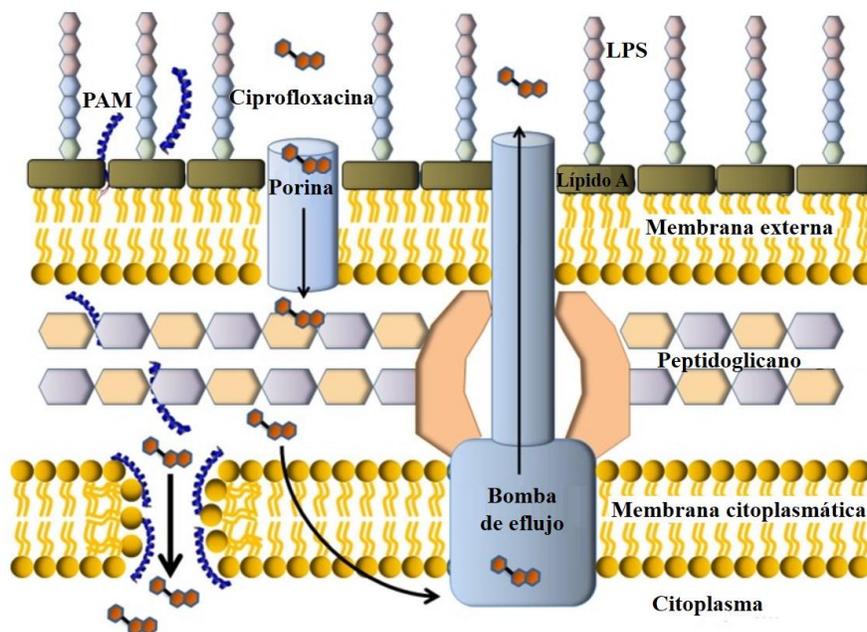
Con estas cuatro variantes se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar y por el método de dilución, además de ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos humanos. En lo que respecta a la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar el péptido parental Css54 presentó valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 de 25 y 50  $\mu$ M respectivamente, mientras por este mismo método, solo la variante Css54 [15E]<sup>+4</sup> presentó actividad frente a ambas cepas bacterianas, con un valor de CMI de 100  $\mu$ M contra *S. aureus* y de 50  $\mu$ M sobre *E. coli*, lo que indica que esta variante es un 75% menos potente sobre la bacteria Gram positiva *S. aureus*, mientras que en el caso de la bacteria Gram negativa *E. coli* no hubo diferencia en el efecto antimicrobiano. Por otro lado en los ensayos de inhibición en líquido, por el método de dilución, el péptido

parental presentó efectos bactericidas sobre ambas cepas, con valores de CMI de 12.5 contra *S. aureus* y de 6.25 sobre *E. coli*, en este ensayo dos de las variantes sintetizadas, C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54 [15]<sup>+5</sup>, presentaron efectos bacteriostáticos sobre ambas cepas a la máxima concentración evaluada 50 µM, mientras que la variante C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup>, presentó valores de CMI sobre *S. aureus* y *E. coli* de 25 y 12.5 µM respectivamente, mientras que la variante C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>, presentó valores de CMI de 25 µM sobre *S. aureus* y de 12.5 sobre *E. coli*, estos valores son similares a los del péptido parental. Al evaluar la actividad hemolítica, estas variantes presentaron menores porcentajes de hemólisis respecto al péptido C<sub>ss</sub>54, en el caso del péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> la actividad hemolítica disminuyó ligeramente, alrededor de un 25%, mientras que la actividad hemolítica del péptido C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> se redujo cerca de un 40%. De manera general estas variantes presentaron actividades antimicrobianas similares a las del péptido parental utilizado como base para su diseño, además estas variantes presentaron una ligera reducción en su actividad hemolítica, adicionalmente, debido a su formato más corto, de 14 y 15 aminoácidos, su costo de producción es menor.

### **2.3. Combinaciones de péptidos antimicrobianos cortos con antibióticos comerciales**

Para ampliar el alcance de los tratamientos antimicrobianos, se han empleado combinaciones de agentes antibióticos, entre ellas se ha evaluado la combinación con péptidos antimicrobianos naturales (PAMs). Recientemente, se ha reportado que los PAMs potencian la actividad de los antibióticos con un gran efecto sinérgico. Por lo tanto, estas combinaciones se han propuesto como una nueva alternativa para contender con la problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Shah y Chen, 2017).

Los antibióticos comerciales, en general, inhiben la replicación del ADN, la transcripción del ADN o la síntesis de la pared celular, teniendo como blanco de acción las topoisomerasas y las proteínas fijadoras de penicilina (PPBBS). Algunas bacterias resistentes a los antibióticos, muestran como mecanismo, la dificultad para que las moléculas de los antibióticos puedan ingresar a la célula bacteriana. Por otro lado, los PAMs se dirigen a la membrana e inducen una mayor permeabilidad, haciendo que esta se desestabilice. Una vez desestabilizada la membrana bacteriana, esta ya es permeable a los antibióticos, que pueden ingresar al citoplasma y atacar a sus objetivos. La Figura 10 representa un ejemplo de un posible mecanismo (pero ciertamente no el único) involucrado en el efecto sinérgico visto para la combinación de algunos PAMs con antibióticos comerciales. En este ejemplo, se muestra una resistencia a la Ciprofloxacina mediada por la bomba de eflujo de salida en bacterias Gram negativas. A lo que el PAM ayuda a permeabilizar la membrana para que más antibiótico pueda ingresar a la célula bacteriana y alcanzar su blanco de acción. En este ejemplo, los blancos de acción de la Ciprofloxacina son las enzimas topoisomerasa II (ADN girasa) y topoisomerasa IV, ambas no mostradas (Hollmann *et al.*, 2018).



**Figura 10.** Ejemplo del posible mecanismo, de sinergia entre un PAM  $\alpha$ -hélice con un antibiótico comercial. La Ciprofloxacina es un inhibidor del ADN girasa, por lo que debe ingresar a la célula bacteriana para mostrar actividad antimicrobiana. En el ejemplo, el mecanismo de resistencia de esta bacteria Gram-negativa es una bomba de eflujo, que bombea el antibiótico fuera de la célula. Por lo que el PAM, permeabiliza la membrana, produciendo así el ingreso de más moléculas del antibiótico (Ciprofloxacina) al citoplasma, donde finalmente podrían alcanzar su blanco de acción (Hollmann *et al.*, 2018).

En el trabajo de Rajasekaran y colaboradores (2017), se utilizó el PAM de origen humano LL-37, este PAM posee actividades antimicrobianas y antiinflamatorias, su aplicación terapéutica está limitada por su baja selectividad celular y su alto costo de producción derivado de su gran tamaño. Para superar estos problemas, desarrollaron péptidos  $\alpha$ -helicoidales derivados de LL-37 con selectividad celular mejorada y con actividad antiinflamatoria similar a la del PAM LL-37 parental. Mediante la sustitución de aminoácidos, diseñaron y sintetizaron una serie de análogos de FK13 basados en la secuencia del péptido FK13 corto 13- (residuos 17-29 de LL-37) identificada como la región responsable de la actividad antimicrobiana de LL-37. Los análogos de FK13 diseñados, FK-13-a1 y FK-13-a7 mostraron alta selectividad celular y conservaron la actividad antiinflamatoria. Además, FK-13-a1 y FK-13-a7 mostraron una actividad antimicrobiana más potente contra las bacterias resistentes a los antibióticos, incluidos *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos (MDRPA) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VREF), respecto a LL-37. También, los péptidos FK-13-a1 y FK-13-a7 exhibieron efectos sinérgicos mayores en combinación con cloranfenicol contra bacterias MRSA y MDRPA y presentaron efectos sobre biofilms de MDRPA más eficaces que LL-37. Para evaluar la

interacción de los péptidos FK13-a1 y FK13-a7 con la membrana de las bacterias, realizaron ensayos de absorción de verde de SYTOX, la despolarización de la membrana y la cinética de destrucción, de acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que estos PAM's eliminan a las células microbianas al permeabilizar y dañar la integridad de la membrana celular bacteriana (Rajasekaran *et al.*, 2017).

En el trabajo de García y colaboradores (2013), se realizaron mezclas de los péptidos Pin2 y Css54 con antibióticos comerciales. Los antibióticos utilizados en combinación con Pin2 fueron: Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomina, Kanamicina y Novomicina (Tabla 6). Los efectos de las combinaciones fueron evaluados sobre la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los resultados mostraron que las mezclas de Pin2 con los antibióticos Cloranfenicol, Kanamicina y Novobiocina presentaron efectos sinérgicos, estos antibióticos presentan blancos intracelulares de acción como los ribosomas y la replicación del ADN, por lo que los efectos sinérgicos observado pueden relacionarse con la capacidad de Pin2 para generar poros sobre la membrana bacteriana (García *et al.*, 2013).

Para el caso del péptido Css54 se generaron mezclas con los antibióticos Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol (Tabla 6). Las mezclas presentaron efectos potenciadores de tipo aditivo y sinérgico sobre la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las mezclas de Css54 con Isoniazida, Pirazinamida o Etambutol mostraron un efecto aditivo. Por lo tanto, las mezclas de Css54 y los antibióticos comerciales evaluados, presentan mejores efectos antimicrobianos sobre *S. aureus* con respecto a su uso por separado, indicando que los péptidos favorecen los efectos de los antibióticos (García *et al.*, 2013).

**Tabla 6.** Efectos de mezclas de los PAMs y antibióticos comerciales (García *et al.*, 2013).

Pin2		Css54	
Antibiótico	Tipo de efecto	Antibiótico	Tipo de efecto
<b>Ampicilina</b>	Aditivo	<b>Isoniazida</b>	Aditivo
<b>Cloranfenicol</b>	Sinérgico	<b>Pirazinamida</b>	Aditivo
<b>Estreptomina</b>	Sinérgico	<b>Etambutol</b>	Aditivo
<b>Kanamicina</b>	Sinérgico	<b>Rifampicina</b>	Sinérgico
<b>Novobiocina</b>	Sinérgico		

En este trabajo el potencial de las variantes cortas Css54 [15E]<sup>+4</sup> y Css54 [14]<sup>+5</sup>, se evaluará para determinar si estos péptidos cortos pueden potenciar el efecto de antibióticos de disposición comercial, lo que permitiría utilizarlos en menores dosis con la misma efectividad, reduciendo los costos del tratamiento de infecciones bacterianas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso excesivo e incorrecto de antibióticos, han causado un incremento en la incidencia de cepas bacterianas resistentes a su acción, esta problemática ha impulsado a las empresas productoras de antibióticos a buscar alternativas que permitan potenciar el efecto de sus productos, y continuar su comercialización.

Se ha reportado que péptidos antimicrobianos como Pin2, variantes cortas de Pin2 y el péptido Css54, entre otros, pueden potenciar el efecto de antibióticos *in vitro*, permitiendo la disminución de las dosis efectivas de antibióticos necesarias para el control de bacterias patógenas.

En un trabajo previo mediante ingeniería de proteínas y síntesis química se generaron dos péptidos cortos con actividades bactericidas sobre *E. coli* y *S. aureus*, en este trabajo se pretende evaluar si estos péptidos cortos en combinación con antibióticos pueden potenciar sus efectos antimicrobianos sobre cepas bacterianas de interés clínico como *E. coli* y *S. aureus*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los péptidos cortos sintéticos podrán potenciar los efectos de antibióticos comerciales que actúan sobre blancos intracelulares.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. General**

Determinar si péptidos cortos sintéticos pueden potenciar los efectos antimicrobianos de antibióticos comerciales sobre cepas bacterianas.

##### **5.2. Particulares**

- 1) Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas a los péptidos y antibióticos comerciales propuestos.
- 2) Generar diferentes combinaciones de péptidos y antibióticos, con base en sus valores de CMI, y evaluar sus efectos sobre las cepas bacterianas propuestas.
- 3) Determinar con base en los efectos de las mezclas sobre el crecimiento bacteriano si las mezclas tienen efectos potenciadores o antagonicos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Reactivos químicos y material biológico

#### 6.1.1. Reactivos y solventes

Todos los reactivos, medios de cultivo y solventes que se utilizaron durante la realización de los diferentes experimentos enumerados en esta tesis son de grado extra puro. Los medios de cultivo: agar con sangre, CHROMagar Staph aureus, CHROMagar Salmonella, agar Eosina y Azul de Metileno, agar McConkey y agar Salmonella-Shigella se utilizaron para la verificación de las cepas bacterianas; agar Mueller-Hinton y caldo Mueller-Hinton se utilizaron para los ensayos de actividad antimicrobiana y la preservación de las diferentes cepas bacterianas.

#### 6.1.2 Material biológico

Para la realización de ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon dos cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (por sus siglas en inglés, ATCC) ambas cepas donadas por el INSP (Instituto Nacional de Salud Pública), todas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, del Centro de Investigación en Biotecnología (LEFIP-CEIB). El mantenimiento de las diferentes cepas bacterianas se realizó mediante resiembras consecutivas utilizando como medio de cultivo agar Mueller-Hinton (BD Bioxón). Las resiembras se realizaron en periodos semanales y se preservaron en refrigeración (4°C). Además, todas las cepas se preservaron en una solución de glicerol al 50% a -80°C.

**Tabla 7.** Cepas bacterianas

Tipo de cepa	Especie	ATCC*	Morfología
Gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	<i>Coco</i>
Gram-negativa	<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Bacilo</i>
*ATCC=Colección Americana de Cultivos			

#### 6.1.3. Péptidos antimicrobianos

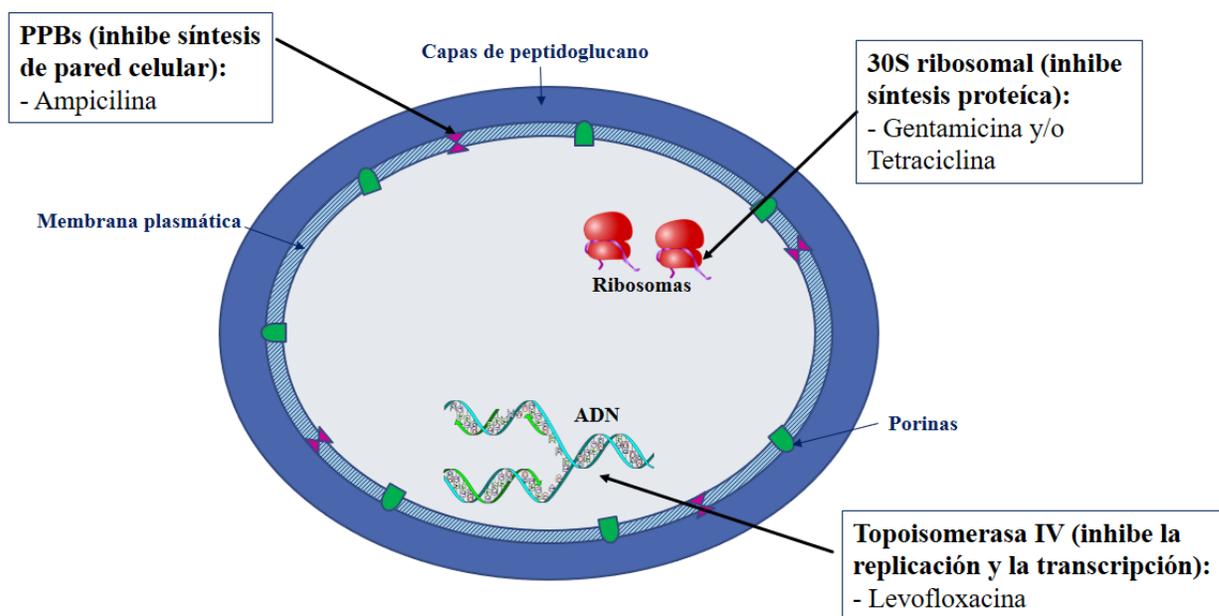
Los PAMs que se utilizaron en este estudio son de origen sintético y son variantes cortas del péptido antimicrobiano CSS54: C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+</sup>

#### 6.1.4. Antibióticos comerciales

Los antibióticos comerciales que se propusieron para utilizar en este estudio son los que se muestran en la Tabla 8. Se propusieron antibióticos de diferentes blancos de acción (Figura 11), además de ser ampliamente utilizados en el control de infecciones.

**Tabla 8.** Antibióticos comerciales y su respectivo blanco de acción (DRUGBANK, 2018; Errecalde, 2004).

ANTIBIÓTICO	TIPO	BLANCO	ESPECTRO
<b>Ampicilina</b>	Beta lactámico	Pared celular (síntesis)	Amplio espectro
<b>Levofloxacin</b>	Fluorquinolona	Topoisomerasas- Inhibe la replicación y transcripción del ADN.	Amplio espectro
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclinas	30S ribosomal- Interfiere con la síntesis de proteínas.	Amplio espectro
<b>Gentamicina</b>	Beta lactámico: Aminoglucósido	30S ribosomal- Síntesis proteica	Gram negativas



**Figura 11.** Mecanismos de acción de los antibióticos que se propusieron para utilizar (DRUGBANK, 2018; Errecalde, 2004).

## 6.2. Verificación de las cepas.

### 6.2.1. Morfología colonial

Las cepas fueron sembradas por estría en diferentes medios de cultivo. En el caso de *S. aureus* ATCC 25923 se utilizaron los medios, agar sangre y CHROMagar Staph aureus, incubando la cepa a 37°C por 24 h. Se describió la morfología colonial y el tipo de hemólisis en agar sangre. En CHROMagar Staph aureus las colonias positivas presentan una coloración malva tras un plazo de incubación de 20 a 24 h. La presencia de sustratos cromógenos en el medio facilita la diferenciación de *S. aureus* de otros organismos (BD, 2013; CHROMagar, 2013).

Para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 se utilizaron los medios, agar sangre, en el cual las colonias deben tener un crecimiento bueno o excelente y presentar o no beta hemolítica, agar de Eosina y Azul de Metileno, en este medio las colonias deben presentar un crecimiento de bueno a excelente y una coloración negro azulada

con brillo verde metálico, agar McConkey, en este medio las colonias positivas presenten una coloración de rosa a rojo, y pueden zona con precipitación de bilis alrededor de las colonias, agar Salmonella-Shigella, en este medio debe presentarse una inhibición de parcial a completa del crecimiento, las colonias desarrolladas deben presentar una coloración rojo carmesí con precipitación y CHROMagar Salmonella, en este medio debe presentarse una inhibición parcial a completa del crecimiento, las colonias desarrolladas deben presentar coloración verde azulada (BD, 2013; BD, 2013; BD, 2013; CHROMagar, 2013; BD, 2014).

### **6.2.2. Morfología microscópica.**

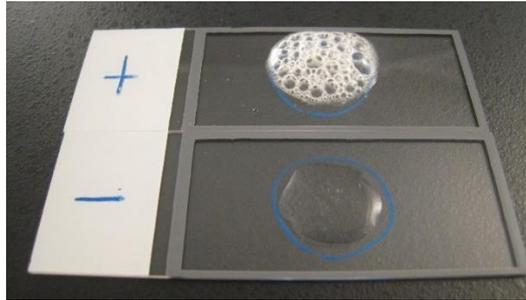
La evaluación de la morfología microscópica se realizó mediante la tinción de Gram y la observación de las colonias teñidas al microscopio. La tinción de Gram es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios microbiológicos. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (López-Jácome et al., 2014).

Para realizar esta técnica se colocó una colonia de la cepa pura en un portaobjetos con ayuda de un asa de siembra, se extendió y se fijó con calor. Se le agregó cristal violeta por 1 minuto y después se lavó con agua destilada. Inmediatamente se le agregó yodo-lugol durante 30 segundos como mordiente y se volvió a lavar con agua destilada. Se decoloró con alcohol-acetona, realizando lavados por 30 segundos. Se agregó safranina por 1 minuto y se lavó con agua destilada. Se dejó secar el frotis a temperatura ambiente, los resultados se observaron al microscopio óptico, aumento de 100X, con aceite de inmersión. Dependiendo de los resultados de la tinción de la bacteria se dividieron en dos grupos: Gram positivas (color morado) y Gram negativas (color rosa) (Cappuccino y Sherman, 2013).

### **6.2.3. Pruebas bioquímicas.**

**Catalasa.** El método de catalasa es uno de los más sencillos y más rápidos para comprobar la producción de la enzima catalasa. En este método se utilizó un asa de inoculación estéril o un aplicador de madera, esto para recoger una colonia bien aislada de bacteria, la cual debe tener de 18 a 24 h, posteriormente se colocó en un portaobjetos del microscopio. Se debe tener cuidado de no agarrar ningún agar. Esto es particularmente importante si el aislado de la colonia se cultivó en agar que contiene glóbulos rojos. El arrastre de glóbulos rojos en la prueba puede dar como resultado una reacción positiva falsa. Por último, se usó un gotero o una pipeta Pasteur, para colocar 1 gota de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la colonia que se encuentra en el portaobjetos. No mezclar y observar los resultados. Las reacciones positivas son evidentes por efervescencia inmediata (formación de burbujas) y si no hay ninguna formación de burbujas (ninguna enzima catalasa para hidrolizar el peróxido de hidrógeno)

y, por lo tanto, representa una reacción de catalasa negativa (Figura 12) (Reiner, 2010; Arteaga-Garibay *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Posibles resultados de la prueba de catalasa. Catalasa positiva, formación de burbujas y Catalasa negativa, no hay ninguna formación de burbujas (Reiner, 2010; Arteaga-Garibay *et al.*, 2012).

**Oxidasa.** Este método está basado en la capacidad de ciertas bacterias para producir azul de indofenol a partir de la oxidación de dimetil-*p*-fenilendiamina y  $\alpha$ -naftol. Gaby y Hadley introdujeron un método más sensible usando N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina oxalato, en el que todos los estafilococos eran oxidasa negativos. En presencia de la enzima citocromo oxidasa (bacterias gram-negativas), el N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina oxalato y el  $\alpha$ -naftol reaccionan al azul de indofenol. En un portaobjetos se colocó 0.2ml de medio líquido inoculado con la bacteria (18-24 horas), encima se le agregó un disco de oxidasa y se esperó aproximadamente por 2 minutos a una temperatura de 25-30°C. Si el disco cambia a un color azul-violeta oscuro (oxidasa positiva) y si el disco no tiene ningún cambio de color (oxidasa negativa), como se muestra en la Figura 13 (Britania, 2010; SIGMA-ALDRICH, 2013).



**Figura 13.** Posibles resultados de la prueba bioquímica de oxidasa. Positivo (color azul-violeta) y negativo (sin cambio en el color) (SIGMA-ALDRICH, 2013).

**Coagulasa.** Esta prueba permite diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) del resto de especies de *Staphylococcus* (coagulasas negativos). La técnica en tubo detecta coagulasa libre y ligada. La coagulasa libre es la procoagulasa (enzima extracelular bacteriana) y la coagulasa ligada o factor de agregación actúa directamente sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina (Cappuccino

y Sherman, 2013). La prueba de coagulasa consiste en tomar 30  $\mu$ L de medio líquido bacteriano puro y transferirlo a un tubo que tenga 30  $\mu$ L de plasma, para posteriormente poner a incubar por 24 h a 37°C, si la reacción es positiva se observará un coágulo (Figura 14) entre 3-4 h (Jiménez-Sánchez, 2015).



**Figura 14.** Posibles resultados de la prueba bioquímica de coagulasa. Positivo (formación de coágulo) y negativo (no se forma coágulo) (Jiménez-Sánchez, 2015).

#### 6.2.4. Métodos semiautomatizados

Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. La API 20E permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las *Enterobacteriaceae* y de otros bacilos Gram negativos.

API 20E, se siembra la bacteria en AMH por 24 h, después se toma una colonia bien aislada del microorganismo y se re-suspende homogéneamente en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril. Se llena con la suspensión de bacterias cada reacción, se llenan bien los pocillos: Citrato (CIT), Voges-Proskauer (VP), gelatinasa (GEL), con la suspensión de bacterias. Se cubre con parafina los pocillos: Arginina deshidrolasa (ADH), lisina descarboxilasa (LDC), ornitina descarboxilasa (ODC), ureasa (URE), H<sub>2</sub>S para obtener anaerobiosis se coloca la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente los pocillos se llenan de agua para proporcionar una atmosfera húmeda durante la incubación. Por último, se incuba a 37°C durante 24 h, para posteriormente proceder a realizar la lectura y análisis de los resultados con la ayuda de una tabla de lectura del propio API 20E.

La API Staph permite la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*. Es una galería conformada por 20 reacciones en 20 pocillos. Las primeras 11 pruebas demuestran la reacción de enzimas metabólicas, que son la reducción de azúcar, urea, H<sub>2</sub>S y las últimas 9 reacciones, son enzimas del metabolismo de carbohidratos, donde de acuerdo al cambio de color es considerada positiva o negativa, después del periodo de incubación de 24 h a 37°C.

### 6.2.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano

La cinética del crecimiento bacteriano se realizó con la finalidad de establecer las condiciones y los tiempos necesarios para realizar los ensayos de susceptibilidad antimicrobianas con las 2 cepas con las que se trabaja. Para realizar dichas cinéticas, se inocularon con la bacteria, tubos que contengan Mueller Hinton Liquido estéril, para posteriormente meter a incubar a 37°C por 2 h, se medirá DO<sub>595nm</sub> hasta obtener 0.2 de absorbancia, una vez hecho esto el inóculo se colocó en una placa Elisa de 96 pocillos, se metió a incubar a 37°C. El seguimiento de las cinéticas se realizó a través de la medición de la Densidad Óptica (DO), cada 2 h hasta completar 12 h de crecimiento, con los resultados se realizó una gráfica de la absorbancia contra el tiempo.

### 6.3. Purificación de los péptidos antimicrobianos

#### 6.3.1. Purificación mediante HPLC

Los péptidos liofilizados se disolvieron en una solución al 10% (acetonitrilo/agua) acidificada con TFA 0.1%, para llevar a cabo la purificación de los mismos por HPLC utilizando como solvente A: 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O, y como solvente B: 0.1% TFA en acetonitrilo (ACN). Los péptidos fueron separados en una columna analítica C<sub>18</sub> (10 x 250 mm.) en fase reversa, con un gradiente de 10-60% de solvente B en un lapso de 70 min (1ml/min), como se puede observar en la tabla.

**Tabla 9.** Metodología de purificación de péptido antimicrobiano (Martínez-Paula, 2017).

Tiempo (min)	A [%]	B [%]	Flujo [mL/min]	Max. Límite de Presión [bar]
0.00	90.0	10.0	1.000	600.00
5.00	90.0	10.0	1.000	600.00
55.00	40.0	60.0	1.000	600.00
60.00	0.0	100.0	1.000	600.00
65.00	0.0	100.0	1.000	600.00
70.00	90.0	10.0	1.000	600.00

Posteriormente para realizar la identificación de los péptidos purificados, se realizó la determinación de su peso molecular por medio de espectrometría de masas.

#### 6.3.2. Cuantificación de proteína

Los PAM fueron cuantificados en base a su peso seco en mg, y a su absorbancia la longitud de onda  $\lambda$  280nm y su coeficiente de extinción, a través de la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon dc$$

Ecuación 1

A: absorbancia de cada péptido a 280nm

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del péptido (expresado como M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

d: distancia que atraviesa el haz de luz (1.0cm)

c: concentración de la sustancia absorbente en el medio (M, mol/L)

Se consideró una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm para los PAM C55 [15E]<sup>+4</sup> y C55 [14]<sup>+5</sup>. El  $\epsilon$  obtenido a través del servidor ExPASy Proteomics Tools (sección Prot Param) es de 5500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **6.3.3. Determinación de la susceptibilidad de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.**

Para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de las bacterias frente a los antibióticos, se realizaron pruebas según la técnica de Kirby-Bauer, a lo cual, se prepararon cajas de 100 mm con medio agar Mueller-Hinton, estas deben tener un espesor de 4 mm de agar.

De acuerdo a la técnica de Kirby-Bauer del CLSI, 2018 se estriaron cajas con las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, dejándolas incubar por un periodo de 18-24 h a una temperatura de 35-37°C, después se inoculó un tubo para cada cepa bacteriana con solución isotónica hasta llegar a una DO<sub>595</sub> 0.08-0.13 posteriormente se tomó un hisopo y se sumergió en la suspensión bacteriana quedando este empapado, por las paredes del tubo de ensayo se descargó el hisopo para retirar el exceso de suspensión. Se procedió a inocular las cajas con medio agar Mueller-Hinton antes preparadas, con un estriado masivo en diferentes direcciones y estas se dejaron secar. Una vez que el inóculo de bacterias secó, se colocaron no más de 5 discos con sus respectivas concentraciones de antibiótico; los discos se colocaron con pinzas estériles y a no menos de 24 mm de distancia, de centro a centro. El diámetro de cada zona debe ser claramente medible; ya que las zonas superpuestas evitan una medición precisa. Las cajas Petri se llevaron a incubar por 24 h. a una temperatura de 35±2°C, para observar los halos de inhibición en mm (zonas claras alrededor del disco). De acuerdo, a los métodos de referencia estándar se procedió a determinar la susceptibilidad por la (CLSI, 2018), para definir si la cepa bacteriana es Sensible (S), Intermedio (I) y/o Resistente (R) a los antibióticos.

## **6.4. Determinación de concentración mínima inhibitoria de antibióticos comerciales y péptidos antimicrobianos**

### **6.4.2. Método por dilución en medio líquido**

Para determinar la CMI de los PAMs y los antibióticos comerciales, se realizó una dilución en medio líquido basados en las especificaciones del CLSI, 2018. En una placa de Elisa de 96 pozos con medio líquido Mueller-Hinton, en cada pocillo se depositó 100  $\mu$ L de PAM y/o antibióticos comerciales, los cuales, se prepararon a diferentes concentraciones desde 0.1 a 100  $\mu$ M, también se colocó ampicilina (control de inhibición del crecimiento bacteriano) y Acetonitrilo 10% en agua (control de crecimiento bacteriano sin inhibición), posteriormente se añadió el inóculo de bacterias en medio líquido (2h de incubación). El seguimiento de las cinéticas de inhibición se realizó midiendo el cambio de absorbancia (595 nm) respecto

al tiempo de incubación a los inóculos de bacteria en medio líquido en presencia y ausencia de los PAM y/o los antibióticos comerciales o ampicilina, el seguimiento de las cinéticas se realizó a través de la medición de la Densidad Óptica (DO), cada 2 h hasta completar 12 h de crecimiento. Si el registro de absorbancia de los PAM y/o antibióticos comerciales no presentan diferencia significativa con el correspondiente para la presencia de ampicilina, se determina un efecto bactericida, y el valor de la CMI corresponde a la menor concentración utilizada que presenta un efecto bactericida, cuando el registro de absorbancia es mayor al de la ampicilina pero menor al de las bacterias sin presencia de PAM y/o antibiótico, el efecto es bacteriostático y se reporta el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano, todos los ensayos se realizaron por triplicado (Martínez-Paula, 2017; Jiménez-Sánchez, 2015).

### 6.5. Diseño de mezclas de antibiótico más péptido antimicrobiano

Una vez que ya se los valores de las CMI individuales (péptidos y antibióticos), se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de mezclas de antibióticos y PAM's. Para este fin se utilizó el método de diseño tipo ajedrez (Tabla 9), el cual consiste en la elaboración de una matriz de diluciones múltiples de los agentes a evaluar en concentraciones iguales, por arriba y por debajo de las CMI de cada agente antimicrobiano antibióticos y PAM's (Jiménez-Sánchez, 2015). Las concentraciones que se utilizaron para este análisis, correspondieron a cuatro o cinco concentraciones por debajo del valor de la CMI, la CMI y el doble de la CMI (Jiménez-Sánchez, 2015).

Las concentraciones de los agentes antimicrobianos incluidos en las mezclas que presentaron efectos bactericidas, se transformaron a Concentraciones Fraccionales Inhibitorias (CFI). Las CFI de un agente antimicrobiano individual (B) es la relación de la CMI del antimicrobiano en combinación con el segundo compuesto (AB) a la CMI del antimicrobiano por si solo (B) y la concentración necesaria del compuesto para inhibir el crecimiento cuando se combina con otro agente antimicrobiano se expresa como una fracción:

$$CFI_A = \frac{(CMI_A \text{ en presencia de B})}{(CMI_A)} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$CFI_B = \frac{(CMI_B \text{ en presencia de A})}{(CMI_B)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Se obtuvo el índice CFI para las diferentes combinaciones (PAM vs antibiótico comercial).

$$\text{Índice CFI} = CFI_A + CFI_B \quad \text{Ecuación 4}$$

El resultado del índice CFI produce un solo número que indica el tipo de efecto existente. Si el resultado de la sumatoria es: =1 el efecto de la combinación es efecto aditivo, si es <1 el efecto es sinérgico ó si es >1 el efecto es antagónico (Jiménez-Sánchez, 2015).

**Tabla 10.** Diseño tipo ajedrez para determinar la actividad antimicrobiana de dos compuestos en combinación (Jiménez-Sánchez, 2015).

		<b>AGENTE B</b> Antibiótico comercial					
		<b>μM</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>	<b>6.2</b>
<b>AGENTE B</b> Péptido antimicrobiano (PAM)	<b>25</b>	100/25	50/25	25/25	12.5/25	6.2/25	
	<b>12.5</b>	100/12.5	50/12.5	25/12.5	12.5/12.5	6.2/12.5	
	<b>6.2</b>	100/6.2	50/6.2	25/6.2	12.5/6.2	6.2/6.2	
	<b>3.2</b>	100/3.2	50/3.2	25/3.2	12.5/3.2	6.2/3.2	
	<b>1.6</b>	100/1.6	50/1.6	25/1.6	12.5/1.6	6.2/1.6	

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1. Verificación de cepas

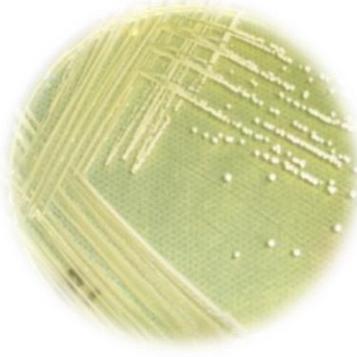
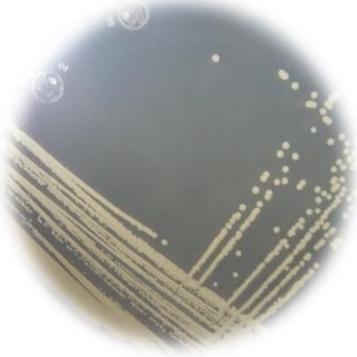
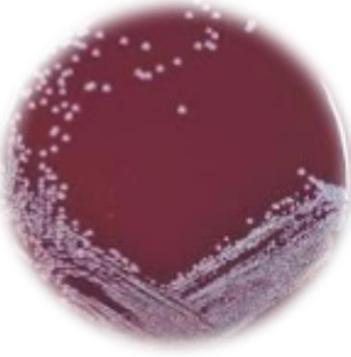
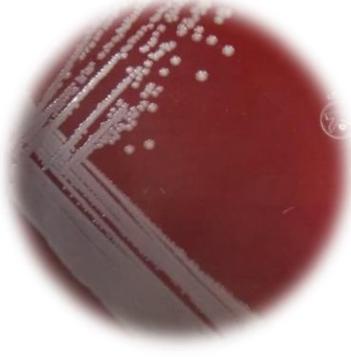
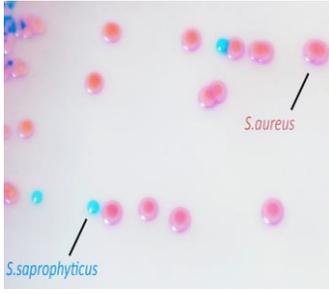
#### 7.1.1. Morfología en colonia de *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* es una cepa proveniente de la ATCC. Esta cepa en agar Mueller-Hinton (medio rico), presentó colonias de aproximadamente de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, de bordes enteros, levemente convexas y con una coloración que va desde color crema al amarillo, como se muestra en la Tabla 11 (Aryal, 2015).

Posteriormente la cepa de *S. aureus* se sembró en medios de cultivo selectivos y diferenciales como: agar sangre, que es un medio diferencial suplementado con 5-10% de sangre ovina desfibrinada estéril a temperatura ambiente, el agar debe estar a 45-50°C, este medio permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y se utiliza para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos. Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias, se determina el tipo de hemólisis que presentan: alfa (es una lisis parcial de los glóbulos rojos por la oxidación de la hemoglobina con halo color verde), beta (es una lisis total de glóbulos rojos con halo amarillo) o gamma (hay una ausencia de lisis de los glóbulos rojos, no presenta halo) (Cappuccino y Sherman, 2013; Britania, 2015). Las colonias de la cepa de *S. aureus* crecieron de una coloración entre blanco y gris sin hemólisis como se muestra en la Tabla 11.

Otro medio de cultivo utilizado fue el CHROMagar Staph aureus, es un medio cromogénico para el aislamiento y la diferenciación directa de *S. aureus* en muestras clínicas e industriales, por color específico de la colonia (CHROMagar, 2015). Las colonias de la cepa *S. aureus* presentaron las características morfológicas de género y especie, las cuales fueron: pigmentación malva, lisas y con bordes redondos (Tabla 11).

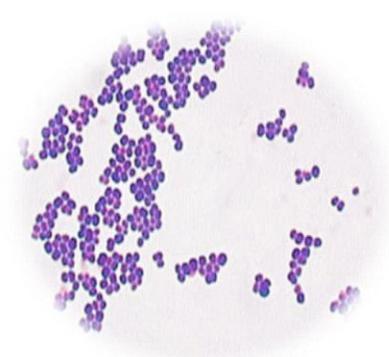
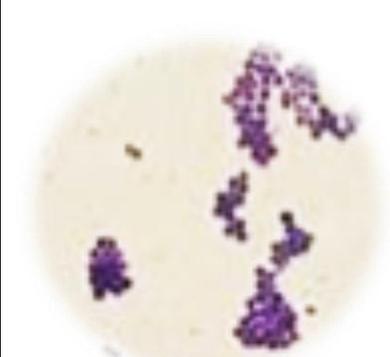
**Tabla 11.** Resultados teóricos y experimentales de *S. aureus*, en los diferentes medios de cultivo (CHROMagar, 2015; Britania, 2015; Aryal, 2015).

Medios de cultivo	Resultados teóricos	Resultados esperados	Resultados experimentales
Agar Mueller-Hinton	Buen crecimiento, lisas, de bordes enteros, levemente convexas y con una coloración que va desde color crema al amarillo		
Agar sangre	Colonias grandes, de color entre blanco y gris o entre crema y amarillo, con o sin hemólisis.		
CHROMagar Staph aureus	El crecimiento de las colonias debe tener una coloración malva.		

### 7.1.2. Morfología microscópica de *S. aureus*

A la cepa *S. aureus* se le realizó la identificación microscópica mediante microscopia óptica con un lente de 100X, como resultado se obtuvo una morfología de cocos en racimo y al realizarle la tinción resultó Gram positiva con una coloración violeta (Tabla 12), según la librería de NCBI y el Manual de Prácticas Bacteriología Médica, se obtuvo un resultado correcto.

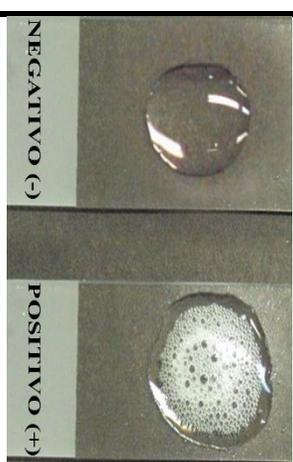
**Tabla 12.** Resultado teórico y experimental de la tinción de Gram de *S. aureus* (Tracey & Chandrashekhar., 2018; Arteaga *et al.*, 2012).

Identificación microscópica	Resultado teórico	Resultado esperado	Resultado experimental
Tinción de Gram	Gram-positiva Coloración azul/púrpura, con morfología de cocos y que se agrupan en racimos "similares a uvas".		

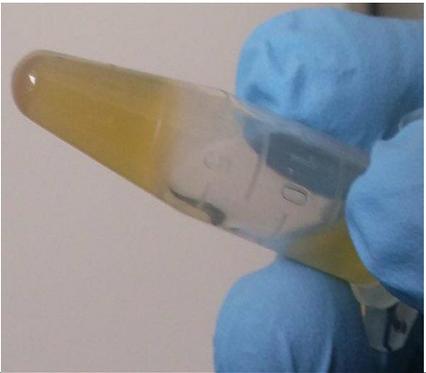
### 7.1.3. Pruebas Bioquímicas de *S. aureus*

Las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de *S. aureus*, fueron: catalasa (dio positivo), oxidasa (dio negativo) y coagulasa (dio positivo). Arteaga *et al.*, en el 2012; Tracey & Chandrashekhar, 2018; reportan que *S. aureus* a las pruebas bioquímicas da: catalasa positiva (todas las especies patógenas de *Staphylococcus*), coagulasa positiva (para distinguir a *Staphylococcus aureus* de otras especies de *Staphylococcus*) y oxidasa negativa; por lo tanto, los resultados obtenidos con nuestra cepa son correctos, Tabla 13.

**Tabla 13.** Resultados teóricos y experimentales de las pruebas bioquímicas de *S. aureus* (Arteaga *et al.*, 2012; Tracey & Chandrashekhar, 2018).

Prueba bioquímica	Resultado teórico	Posibles resultados	Resultado experimental
Catalasa	Positivo (+)		

Continuación de la Tabla 13.

Prueba bioquímica	Resultado teórico	Posibles resultados	Resultado experimental
Oxidasa	Negativo (-)		
Coagulasa	Positivo (+)		

**7.1.4. Morfología en colonia de *E. coli***

*Escherichia coli* es otra cepa proveniente de la ATCC. Esta cepa fue sembrada en 6 medios de cultivos diferentes: agar Mueller-Hinton, agar Sangre, agar de Eosina y Azul de Metileno, agar McConkey, agar Salmonella-Shigella y CHROMagar Salmonella, todos estos para realizar la verificación de morfología de colonia. En agar Mueller-Hinton (medio rico), sus colonias se observan ligeramente blanquecinas, con una superficie suave brillante y un aspecto húmedo, su consistencia es blanda y una elevación convexa, miden de 2 a 3 μm, como se muestra en la Tabla 14.

Posteriormente la cepa de *E. coli* se sembró en medios de cultivos selectivos y diferenciales como: agar sangre, es un medio diferencial suplementado con 5-10% sangre ovina desfibrinada estéril a temperatura ambiente, el agar debe estar a 45-50°C, este medio permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y se utiliza para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos. Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias, se determina el tipo de hemólisis que poseen:

alfa (es una lisis parcial de los glóbulos rojos por la oxidación de la hemoglobina con halo color verde), beta (es una lisis total de glóbulos rojos con halo amarillo) o gamma (hay una ausencia de lisis de los glóbulos rojos, no presenta halo) (Cappuccino y Sherman, 2013; BD, 2013). Las colonias de la cepa de *E. coli* crecieron con una coloración gris, presentaron hemólisis, como se muestra en la Tabla 14.

El tercer medio de cultivo en el que se sembró *E. coli* fue Agar de Eosina y Azul de Metileno, este medio contiene los colorantes de azul de metileno y eosina, los cuales inhiben bacterias Gram-positivas. Los colorantes también actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. Los coliformes como *E. coli* producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. Las colonias de *E. coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa (BD, 2013; Raquid, *et al.*, 2018). Las colonias de la cepa *E. coli* presentaron una coloración de negro azulado, con una precipitación de verde brillante, por lo tanto, los resultados son correctos según los estudios de Raquid y colaboradores en el 2018 (Tabla 14).

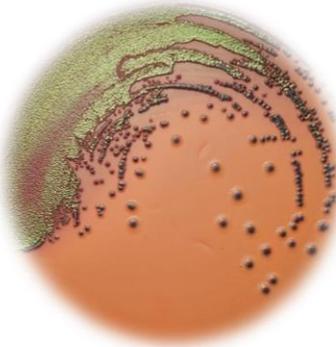
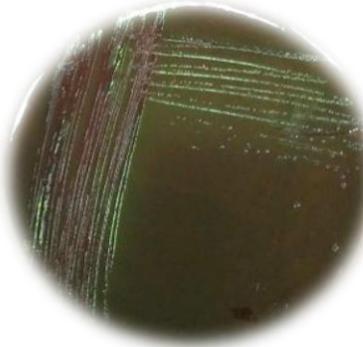
El cuarto medio de cultivo que se utilizó para la verificación morfológica de *E. coli* fue el agar McConkey, el cual, contiene peptonas que son las que proporcionan los nutrientes, el cristal violeta inhibe las bacterias Gram-positivas, en especial los *enterococos* y *estafilococos*. La diferenciación de los microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro, con estos crecen colonias incoloras o de color de rosa a rojo según la capacidad del aislado para fermentar carbohidratos (BD, 2014; Barcella, *et al.*, 2016). Las colonias de la cepa de *E. coli* crecieron de una coloración rosada con precipitación de bilis, como se muestra en la Tabla 14.

También se cultivó *E. coli* en el medio de agar *Salmonella-Shigella*, este medio contiene lactosa. Los organismos que fermentan lactosa producen ácido, por lo que sus colonias presentan una coloración roja debido a la presencia del indicador rojo neutro. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras. Este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidas *Salmonella* y *Shigella* (BD, 2013; Aryal, 2016). Como *E. coli* es una cepa fermentadora de lactosa, presentó una coloración rojo carmesí con precipitación, estos resultados son correctos según en el reporte de Aryal de 2016 (Tabla 14).

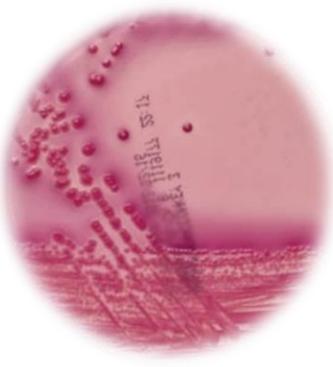
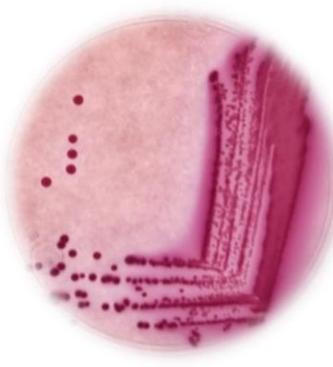
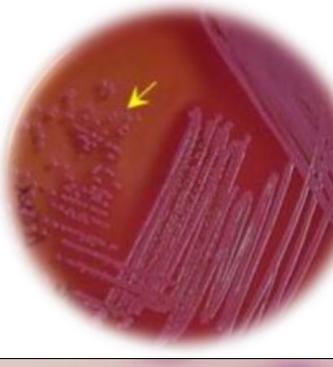
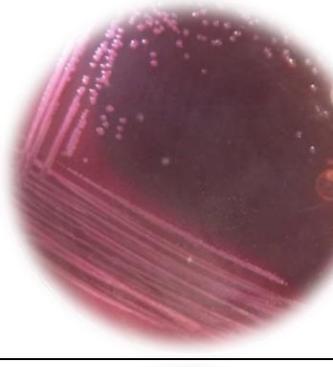
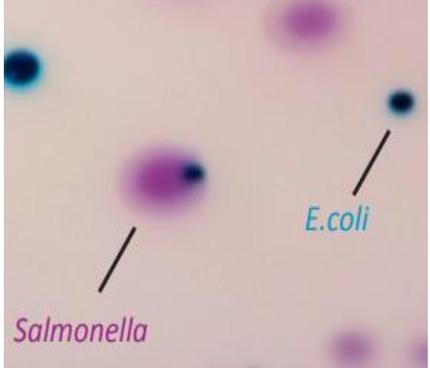
Otro medio de cultivo utilizado fue el CHROMagar *Salmonella*, es un medio cromogénico para la detección y el aislamiento de especies de *Salmonella*, incluidas *S. typhi* y *S. paratyphi* A, en este medio las colonias desarrollan una coloración malva; mientras que para coliformes como *E. coli*, las colonias son pequeñas con una coloración verde-azulado (CHROMagar, 2016). Las colonias de la cepa *E. coli* presentaron las

características morfológicas de género y especie, como lo indica el instructivo del CHROMagar Salmonella (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados teóricos y experimentales de *E. coli*, en los diferentes medios de cultivo (CHROMagar, 2016; Britania, 2015; Aryal, 2016).

Medios de cultivo	Resultados teóricos	Resultados esperados	Resultados experimentales
<b>Agar Mueller-Hinton</b>	Las colonias son blanquecinas, con una superficie suave brillante, con un aspecto húmedo y una elevación convexa.		
<b>Agar sangre</b>	Colonias con un crecimiento bueno o excelente, puede ser o no beta hemolítica.		
<b>Agar de Eosina y Azul de Metileno</b>	Las colonias tendrán un crecimiento de bueno a excelente; colonias de color negro azulado con brillo metálico		

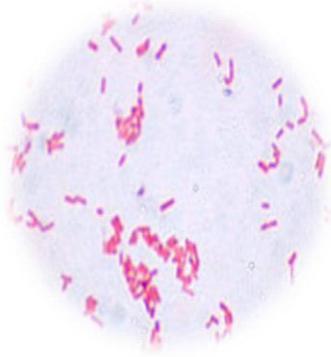
Continuación de la tabla 14.

Medios de cultivo	Resultados teóricos	Resultados esperados	Resultados experimentales
Agar McConkey	Crecimiento; colonias de color rosa (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis)		
Agar Salmonella-Shigella	Inhibición de parcial a completa; colonias de color rojo carmesí con precipitación		
CHROMagarSalmonella	Inhibición parcial a completa; colonias color verde-azulado		

7.1.5. Morfología microscópica de *E. coli*

A la cepa *E. coli* se le realizó la identificación microscópica mediante microscopía óptica con un lente de 100X, como resultado se obtuvo una morfología de bacilos cortos y al realizarle la tinción resultó Gram positiva con una coloración rosada (Tabla 15), según el Manual de Prácticas Bacteriología Médica, se obtuvo un resultado correcto.

**Tabla 15.** Resultado teórico y experimental de la tinción de Gram de *E. coli* (Arteaga *et al.*, 2012).

Identificación microscópica	Resultado teórico	Resultado esperado	Resultado experimental
Tinción de Gram	Gram negativa Coloración rosada, con morfología de bacilos cortos		

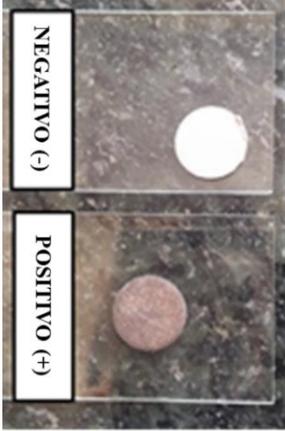
### 7.1.6. Pruebas Bioquímicas de *E. coli*

Las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de *E. coli*, fueron: catalasa (dio positivo), oxidasa (dio negativo) y coagulasa (dio negativo). Arteaga *et al.*, en el 2012 y Al Humam (2016), reportan que *E. coli* en las pruebas bioquímicas como resultado: catalasa positiva (todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*), coagulasa y oxidasa negativa (todas las *Enterobacteriaceae* son oxidasa negativa); por lo tanto, los resultados obtenidos con nuestra cepa son correctos, Tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados teóricos y experimentales de las pruebas bioquímicas de *S. aureus* (Arteaga *et al.*, 2012; Al Humam, 2016).

Prueba bioquímica	Resultado teórico	Posibles resultados	Resultado experimental
Catalasa	Positivo (+)		

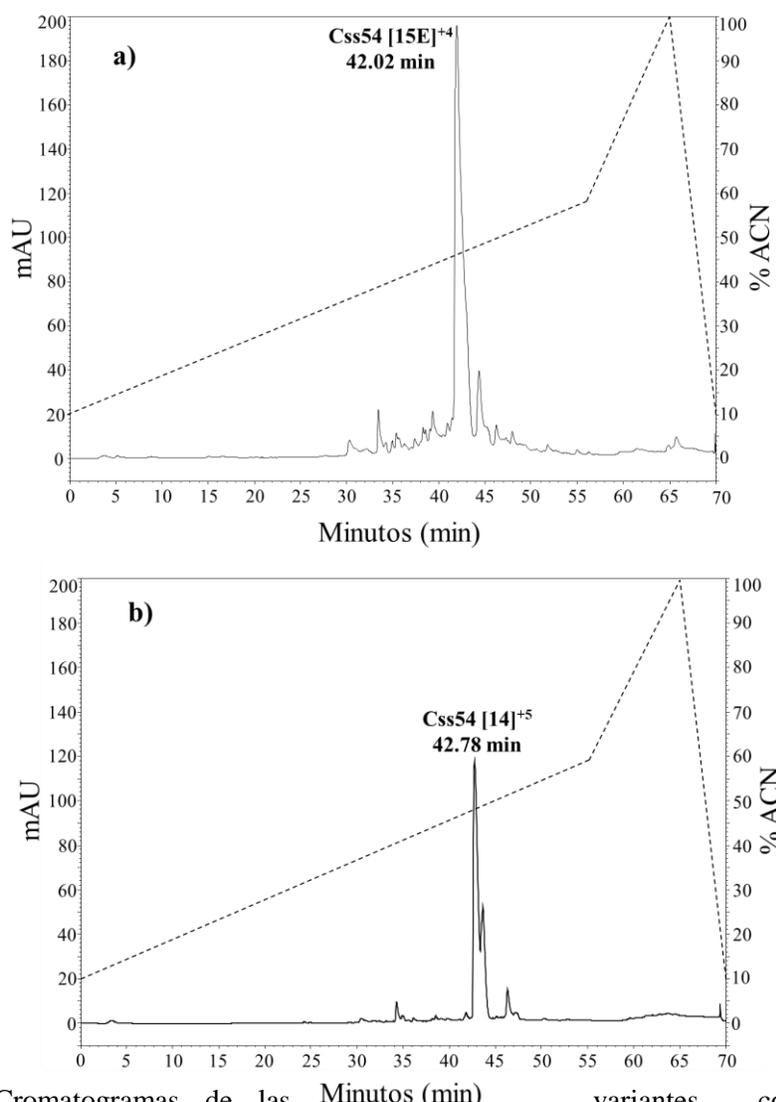
Continuación de la Tabla 16.

Prueba bioquímica	Resultado teórico	Posibles resultados	Resultado experimental
Oxidasa	Negativo (-)		
Coagulasa	Negativo (-)		

## 7.2. Purificación de los péptidos antimicrobianos

### 7.2.1. Purificación mediante HPLC

La purificación de las dos variantes del péptido C<sub>ss</sub>54 evaluadas en este trabajo se realizó mediante HPLC, las corridas cromatográficas fueron monitoreadas a una longitud de onda de 280 nm, finalmente todas las fracciones de interés fueron colectadas manualmente. En la Figura 15 (paneles a-b) se muestran los cromatogramas correspondientes a la última fase de purificación de las variantes cortas del péptido C<sub>ss</sub>54. Los tiempos de retención de las variantes fueron: para C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> de 42.02 min y para C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> de 42.78 min respectivamente.



**Figura 15.** Cromatogramas de las Minutos (min) variantes cortas del péptido antimicrobiano C5554: a) C5554[15E]<sup>4+</sup> y b) C5554[14]<sup>5+</sup>.

### 7.2.2. Determinación de la susceptibilidad de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

#### *S. aureus*

Para evaluar a que antibióticos, es resistente o sensible la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, se realizó la técnica de Kirby-Bauer con unidiscos de diferentes antibióticos para cepas Gram positivas, en total se probaron 7 diferentes unidiscos de antibióticos (ANEXO C.1.). Según la CLSI de 2018, esta cepa presentó sensibilidad a los 7 antibióticos: Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (30µg), Gentamicina (10 µg), Cefepime (30 µg), Levofloxacina (5 µg), Sulfametoxazol-Trimetoprima (25 µg) y Tetraciclina (30 µg), como se puede observar en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Resultados de susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 25923, con los discos de antibióticos a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).

Antibiótico	Abreviatura	Concentración del disco (µg)	<i>S. aureus</i> , puntos de corte (mm), CLSI,2018	<i>S. aureus</i> , halos de inhibición (mm)	Resultado
Ampicilina	AM	10	27-35	30	S
Cefotaxima	CTX	30	25-31	30	S
Gentamicina	GM	10	19-27	23	S
Cefepime	FEP	30	23-29	26	S
Levofloxacina	LEV	5	25-30	27	S
Sulfametoxazol- Trimetoprima	SXT	25	24-32	28	S
Tetraciclina	TE	30	24-30	30	S
<b>R=Resistencia; S= Sensible; N.D.=No determinado</b>					

Para una mejor selección de antibióticos para *S. aureus*, se le evaluó la resistencia a una cepa de aislado clínico, a la cual se le realizó la técnica de Kirby-Bauer con discos de Bio-Rad para bacterias Gram positivas, en total se probaron 11 antibióticos (ANEXO C.2.): Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Levofloxacina (5 µg), Penicilina (10 µg), Sulfametoxazol-Trimetoprima (25 µg) y Tetraciclina (30 µg). Como resultado se obtuvo que la cepa era resistente a los 11 antibióticos, como se puede observar en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Resultados de susceptibilidad de *S. aureus* de aislado clínico, con los discos de antibióticos de Bio-rad a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).

AB	Abreviatura	Concentración del disco (µg)	<i>S. aureus</i> , puntos de corte (mm), CLSI,2018	<i>S. aureus</i> , halos de inhibición (mm)	Resultado
Ampicilina	AM	10	27-35	10	R
Cefalotina	CF	30	29-37	23	R
Cefepime	FEP	30	23-29	4	R
Cefotaxima	CTX	30	25-31	13	R
Cefuroxima	CXM	30	27-35	23	R
Eritromicina	E	15	22-30	19	R
Gentamicina	GE	10	19-27	18	R
Levofloxacina	LEV	5	25-30	23	R
Penicilina	PE	10	26-37	4	R
Sulfametoxazol- Trimetoprima	SXT	25	24-32	5	R
Tetraciclina	TE	30	24-30	22	R
<b>R=Resistencia; S= Sensible; N.D.=No determinado</b>					
<b>*BIO-RAD: CAT 71080480</b>					

## *E. coli*

A la cepa de *E. coli* ATCC 25922, también se le realizó la técnica de Kirby-Bauer con unidiscos de diferentes antibióticos para cepas Gram negativas, en total se probaron 5 diferentes unidiscos de antibióticos (ANEXO C.3.). Según la CLSI de 2018, esta cepa presentó sensibilidad a los 5 antibióticos: Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (30µg), Gentamicina (10 µg), Cefepime (30 µg) y Levofloxacina (5 µg), como se puede observar en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Resultados de susceptibilidad de *E. coli* ATCC 25922, con los unidiscos de antibióticos a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).

AB	Abreviatura	Concentración del unidisco (µg)	<i>E.coli</i> , puntos de corte (mm), CLSI,2018	<i>E. coli</i> , halos de inhibición (mm)	Resultado
<b>Ampicilina</b>	AM	10	15-22	19	S
<b>Cefotaxima</b>	CTX	30	29-35	30	S
<b>Gentamicina</b>	GM	10	19-26	21	S
<b>Cefepime</b>	FEP	30	31-37	31	S
<b>Levofloxacina</b>	LEV	5	29-37	35	S

**R=Resistencia; S= Sensible; N.D.=No determinado**

Para una mejor selección de antibióticos para *E. coli*, se le evaluó la resistencia a una cepa de aislado clínico, a la cual se le realizó la técnica de Kirby-Bauer con sensidiscos de Bio-Rad para bacterias Gram negativas, en total se probaron 12 antibióticos (ANEXO C.4.): Amikacina (30 µg),Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Levofloxacina (5 µg), Netilmicina (30 µg), Nitrofurantoina (300 µg) y Sulfametoxazol-Trimetoprima (25 µg). Como resultado se obtuvo que la cepa era resistente a 10 antibióticos y sensible a 2 antibióticos, como se puede observar en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Resultados de susceptibilidad de *E. coli* de aislado clínico, con los sensibilizadores de antibióticos de Bio-rad a través de la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2018).

AB	Abreviatura	Concentración del sensibilizador (µg)	<i>E.coli</i> , puntos de corte (mm), CLSI,2018	<i>E. coli</i> , halos de inhibición (mm)	Resultado
Amikacina	AK	30	19-26	16	R
Ampicilina	AM	10	15-22	10	R
Cefalotina	CF	30	15-21	11	R
Cefepime	FEP	30	31-37	15	R
Cefotaxima	CTX	30	29-35	22	R
Ceftriaxona	CRO	30	29-35	26	R
Cloranfenicol	CL	30	21-27	21	S
Gentamicina	GE	10	19-26	10	R
Levofloxacina	LEV	5	29-37	22	R
Netilmicina	NET	30	22-30	17	R
Nitrofurantoína	NF	300	20-25	18	R
Sulfametoxazol-Trimetoprima	SXT	25	23-29	25	S
R=Resistencia; S= Sensible; N.D.=No determinado					
*BIO-RAD: CAT 71080480					

El método de Kirby-Bauer, es una técnica que se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del CLSI, de los Estados Unidos.

A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar (en este caso algunos antibióticos comerciales) sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar (Sánchez-García, *et al.*, 2016).

Es importante conocer el efecto de ciertos antibióticos comerciales a estudiar sobre las cepas bacterianas, ya que existen reportes como en el de Akanbi y colaboradores en el año 2016, donde realizaron la evaluación de la susceptibilidad de aislados de *S. aureus*, obtuvieron como resultado que la susceptibilidad antibiótica de 30 aislamientos de *S. aureus*, reveló grados variables de patrones de susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos. En general, los antibióticos más efectivos para *S. aureus* fueron Cefoxitina 76.7%, Cloranfenicol 83.3%, Levofloxacina 86.7% e Imipenem 96.7%. También se registró una susceptibilidad baja,  $\geq 50\%$  a Vancomicina y Doxiciclina (50%), Tetraciclina y Sulfametoxazol-Trimetoprima (56.7%),

Gentamicina (63.3%) y Ciprofloxacina (66.7) %). Se identificó una mayor resistencia a la Eritromicina (70%) y Clindamicina y Rifampicina (80%), con resistencia a la Penicilina G y Ampicilina la más alta (cada registro de 96.7%) (Akanbi, *et al.*, 2016).

Un claro ejemplo de la resistencia bacteriana de *E. coli* a antibióticos comerciales, es el reporte de Rasheed y colaboradores en el 2014; en el cual realizaron una recolección de aislados de *E. coli* provenientes de alimentos como carne de pollo, verduras, huevo, leche, etc., en el cual, al evaluar la susceptibilidad de estos aislados con antibióticos comerciales, obtuvieron como resultado resistencia a uno o más agentes antimicrobianos en 22 (14.7%) aislamientos de detectados en un total de 150 muestras y se observó un patrón de resistencia múltiple a los medicamentos.

El tipo dominante de resistencia fue la Ampicilina y la Amoxicilina detectadas de forma idéntica en 20 (13,3%) aislamientos, seguidos de Tetraciclina en 19 (12,6%), Cotrimoxazol en 17 (11,3%), Estreptomina en 12 (8%), Ciprofloxacina y Ofloxacina en 10 (6,6%) cada una, Cefotaxima en 8 (5,3%) y Gentamicina, Cloranfenicol y Amoxicilina-Acido clavulánico en 7 (4,6%) de cada aislado. 22 aislamientos de *E. coli* provocaron 18 patrones diferentes de resistencia a los antibióticos a los agentes utilizados en este estudio. Ninguno de los aislamientos se encontró resistente al Imipenem, Tigeciclina y Colistina (Rasheed, *et al.*, 2014).

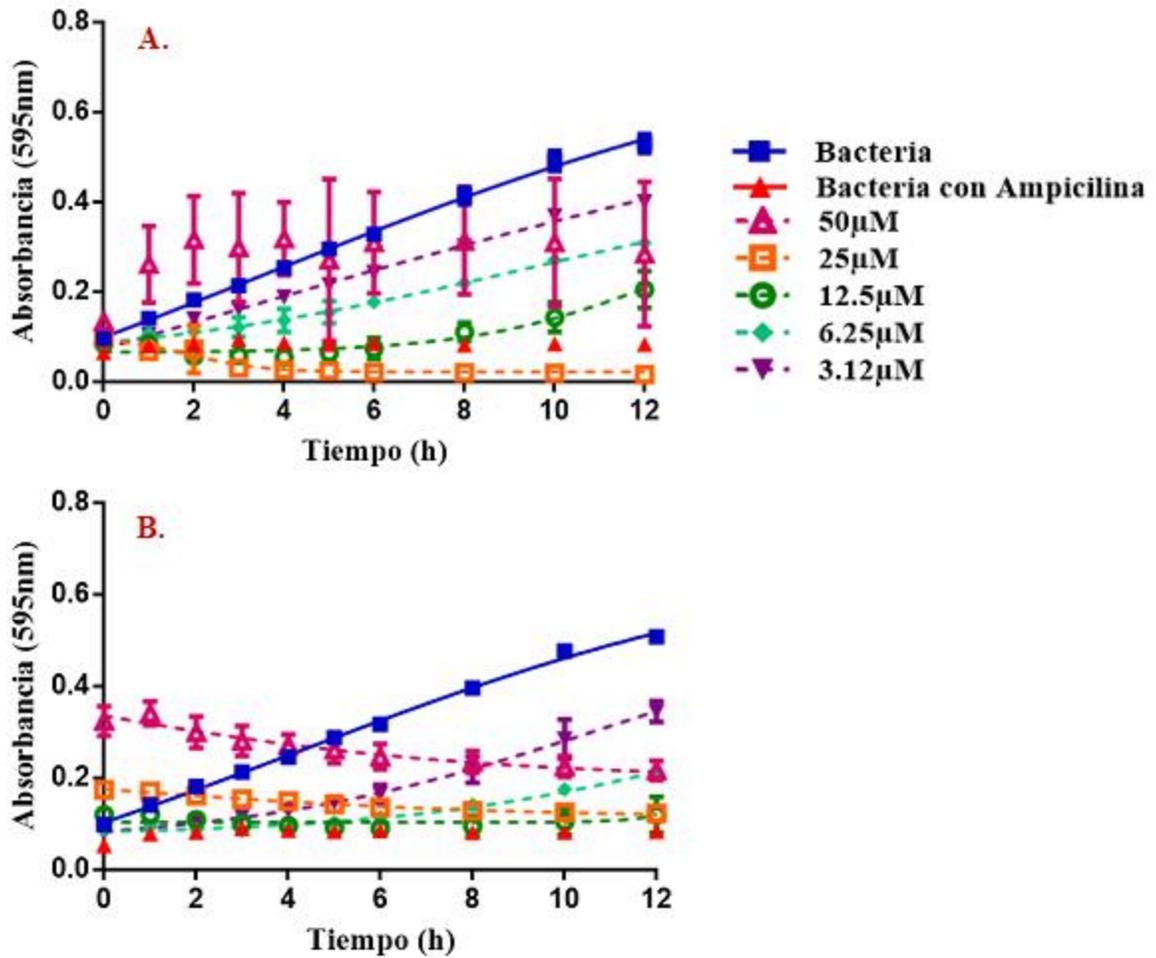
Dados los resultados de las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, tanto de ATCC como las de aislado clínico e inclusive los datos de los estudios antes mencionados; Ampicilina fue el antibiótico que se seleccionó para evaluar su actividad antimicrobiana en combinación con los péptidos cortos C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>, ya que la incidencia de resistencia bacteriana a este antibiótico va en aumento. Por lo que en este estudio se buscó disminuir las dosis efectivas de Ampicilina al combinarlas con nuestros péptidos cortos, es decir, poder generar un efecto sinérgico y/o aditivo.

Por ello la resistencia a los antimicrobianos ha sido reconocida como un problema mundial emergente en medicina veterinaria y humana, tanto en países desarrollados como en desarrollo. También por lo cual, se deben de tomar precauciones para disminuir la incidencia de más cepas resistentes a múltiples antibióticos.

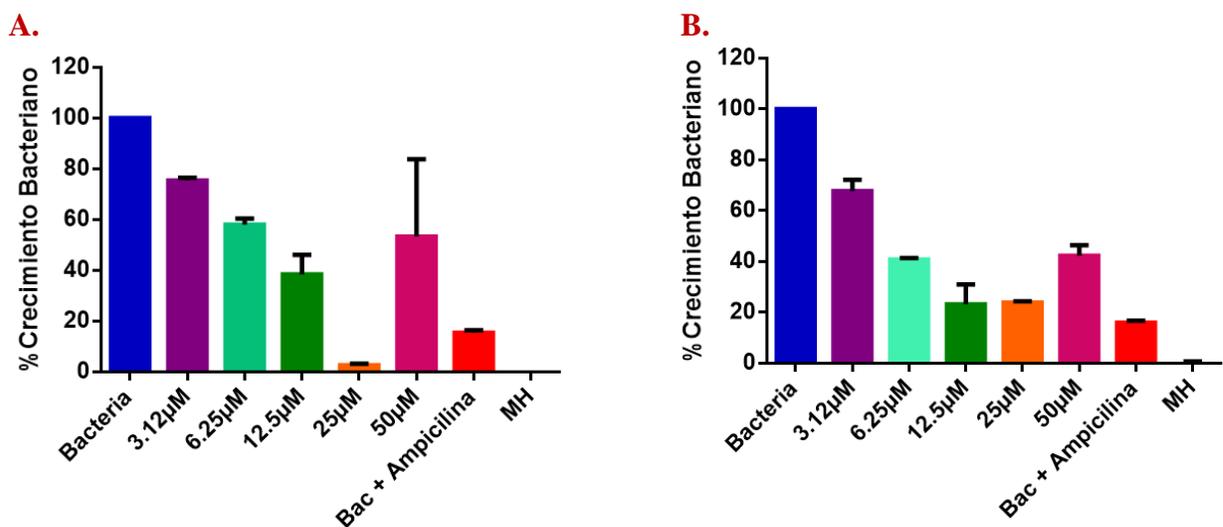
### **7.3. Determinación de concentración mínima inhibitoria de antibióticos comerciales y péptidos antimicrobianos.**

#### **7.3.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria de los péptidos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>, en *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 por el método por dilución en medio líquido.**

Para un análisis más detallado de la determinación de concentración mínima inhibitoria de la actividad antimicrobiana de los péptidos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> en *S. aureus* ATCC 25923, se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana por el método de dilución, a diferentes concentraciones. Como control positivo se colocó Ampicilina (10µg/ml) + inóculo de bacteria y como control negativo se utilizó el crecimiento de la bacteria sola. En la Figura 16 se muestran las cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de los péptidos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>. El péptido C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> presentó una CMI de 25 µM, con un porcentaje de inhibición del 97% aproximadamente, como se muestra en la Figura 17a; mientras que el péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> presentó actividad antimicrobiana bactericida contra *S. aureus*, con valores de CMI de 25 y 12.5 µM, con porcentajes de inhibición de 76 y 75% aproximadamente (Figura 17b).

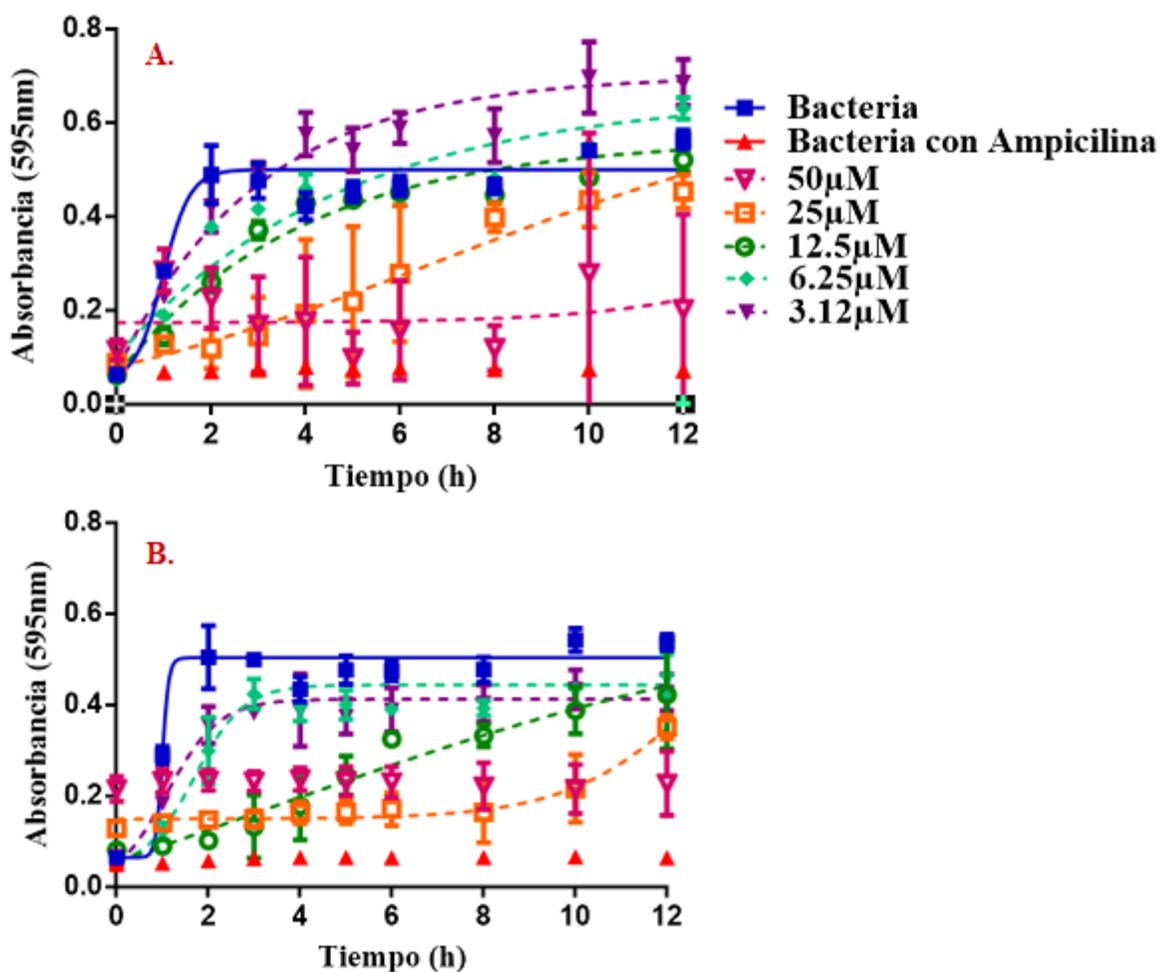


**Figura 16.** Cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, efecto de los péptidos sobre *S. aureus* ATCC 25923. A. Css54 [15E]<sup>+</sup> y B. Css54 [14]<sup>+</sup>.

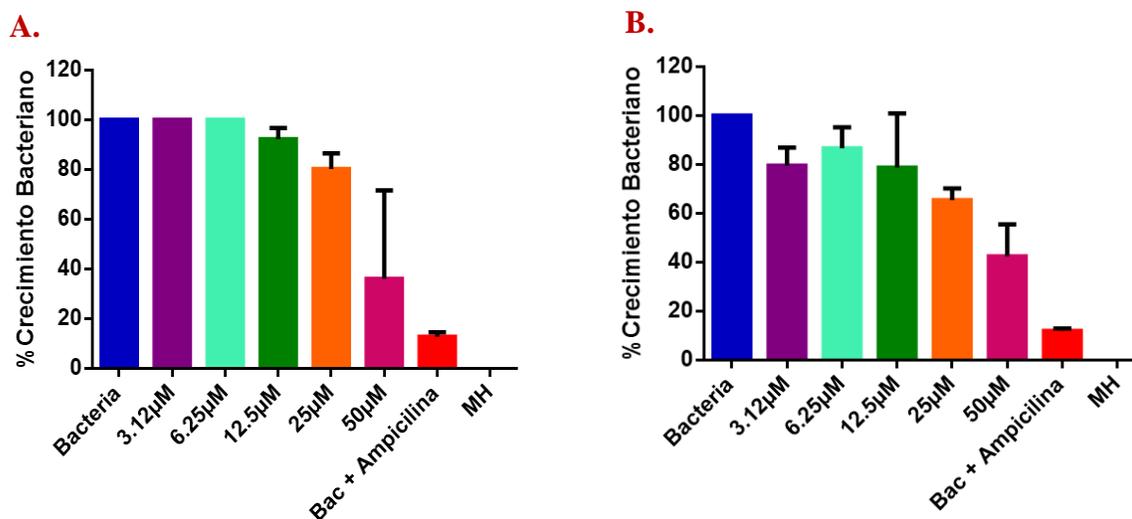


**Figura 17.** Porcentajes de crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 25923, a las diferentes concentraciones de los péptidos A. Css54 [15E]<sup>+</sup> y B. Css54 [14]<sup>+</sup>, a las 12 horas de incubación.

En la Figura 18, se muestran las cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en presencia de los péptidos Css54 [15E]<sup>+4</sup> y Css54 [14]<sup>+5</sup> presentaron actividades bactericidas, con valores de CMI de 50  $\mu$ M, con porcentajes de inhibición del 60% aproximadamente para Css54 [15E]<sup>+4</sup> y de 55% para Css54 [14]<sup>+5</sup>, como se muestra en la Figura 19 y presentaron actividades bacteriostáticas a partir de los valores de 25  $\mu$ M.



**Figura 18.** Cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, efecto de los péptidos sobre *E. coli* ATCC 25922. A. Css54 [15E]<sup>+4</sup> y B. Css54 [14]<sup>+5</sup>.



**Figura 19.** Porcentajes de crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922, a las diferentes concentraciones de los péptidos A. C. [15E]<sup>+4</sup> y B. C. [14]<sup>+5</sup>, a las 12 horas de incubación.

Los péptidos tienen potencial para ser un buen agente antimicrobiano en combinación con antibióticos y así tener un mejor efecto en conjunto. En la Tabla 21 se muestran las CMI de los péptidos con ambas cepas.

**Tabla 21.** CMI de los péptidos C. [15E]<sup>+4</sup> y C. [14]<sup>+5</sup>, con las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922.

Péptido	<i>S. aureus</i> CMI (μM)	<i>E. coli</i> CMI (μM)
C. [15E] <sup>+4</sup>	25	50
C. [14] <sup>+5</sup>	12.5	50
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria		

Los efectos antimicrobianos de ambos péptidos sobre las dos cepas bacterianas a las más altas concentraciones (50 μM) se puede observar en la Figuras 15 y 17, que desde las 0 horas al medir su DO<sub>595</sub>, la mezcla del péptido con el inóculo de la bacteria tenía una absorbancia de 0.1-0.3 aproximadamente, es decir, presentó cierta turbidez, caso contrario con las demás concentraciones evaluadas en las que su absorbancia a las 0 horas era cercana a 0.

A las altas concentraciones de los péptidos, la absorbancia disminuyó de manera muy lenta, a lo largo del ensayo (12 horas). Una situación muy similar se presentó en el trabajo de Vega y colaboradores en el 2018. Ellos evaluaron la actividad antimicrobiana de un péptido, que diseñaron y sintetizaron, el cual es derivado de Lactoferricina B (LfcinB) bovina. Curiosamente, durante sus experimentos con Muller-Hinton líquido observaron que a concentraciones de 100 y 200 μM, el péptido parecía algo inestable, ya que, al agregar la solución peptídica, el cultivo desarrolló turbidez, que desapareció con el tiempo. Concluyendo que este efecto pudiera deberse al contenido de sal en el Mueller-Hinton líquido, ya que se ha informado que varios

AMP pierden actividad en soluciones salinas fisiológicas y en sueros. A lo cual, se requerirán estudios adicionales sobre las interacciones de la sal y la unión del suero para determinar la utilidad del péptido, cuyo uso como agente antimicrobiano puede limitarse actualmente a concentraciones más bajas (actividad hemolítica a 12.5  $\mu\text{M}$ ; 11.2%) (Vega, *et al.*, 2018).

### 7.3.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria de Ampicilina en *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 por el método por dilución en medio líquido.

En la Figura 20 y 21, se muestran las cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 en presencia del antibiótico de Ampicilina. Para evaluar Ampicilina con *S. aureus* y *E. coli*, se realizaron varias concentraciones de este antibiótico para poder obtener los valores de CMI; para ambas cepas se evaluaron concentraciones de 0.0026  $\mu\text{M}$  a 26.9258  $\mu\text{M}$  [(10 $\mu\text{g/ml}$ ) concentración recomendada por la CLSI, 2018]. En la Figura 20 se muestra como Ampicilina presentó actividad bactericida ante el crecimiento bacteriano de *S. aureus*, con un CMI de 2.6925  $\mu\text{M}$  y presentó actividad bacteriostática a partir de la concentración de 0.3365 $\mu\text{M}$ ; mientras que con *E. coli* presentó actividad bactericida a un CMI de 6.7314  $\mu\text{M}$  y presentó actividad bacteriostática a partir de la concentración de 1.6694  $\mu\text{M}$ , como se muestra en la Figura 21.

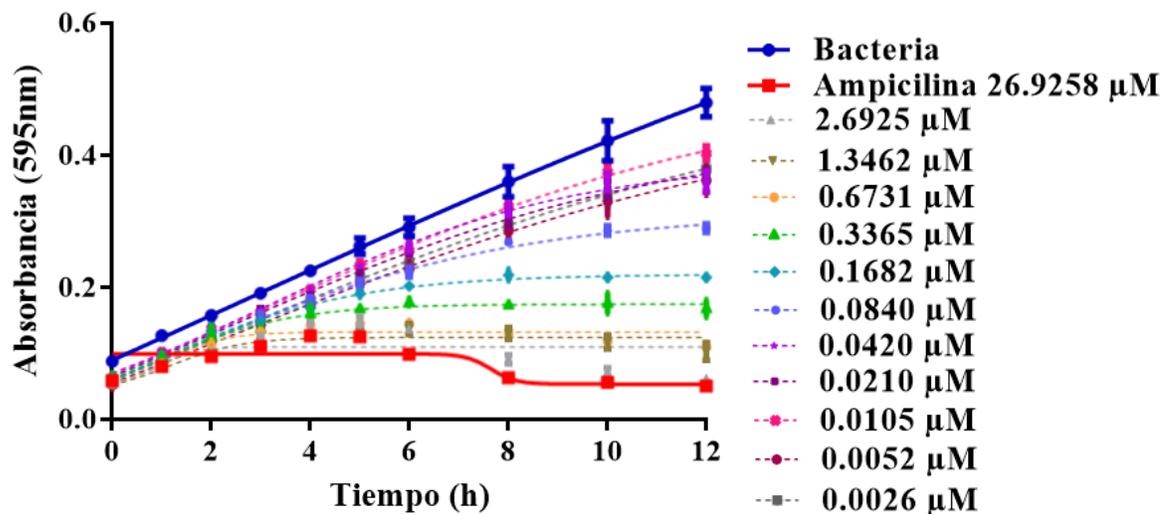
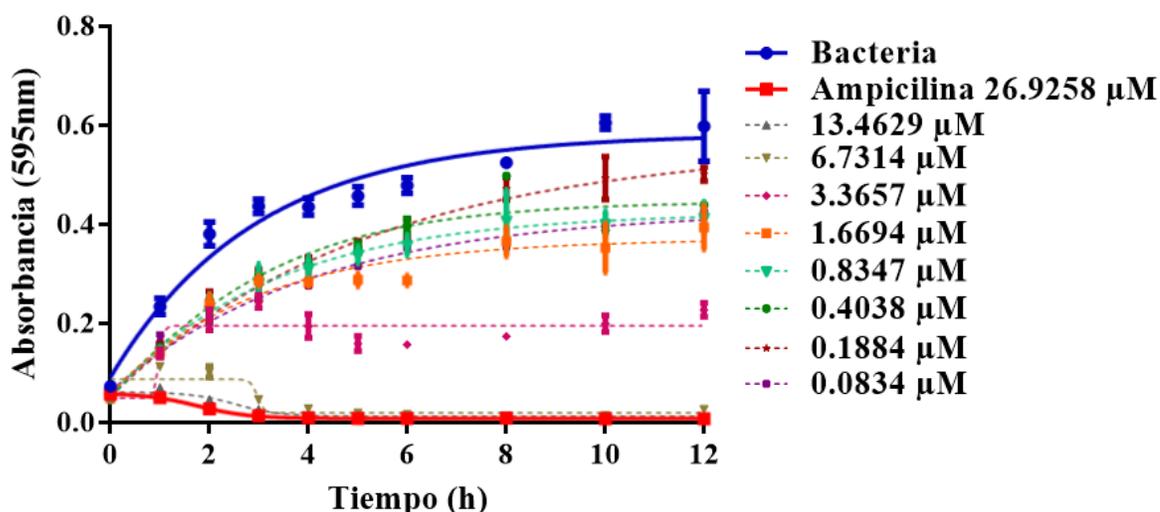


Figura 20. Cinética de inhibición de crecimiento bacteriano de *S. aureus* con Ampicilina.



**Figura 21.** Cinética de inhibición de crecimiento bacteriano de *E. coli* con Ampicilina.

### 7.3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las diferentes combinaciones de Ampicilina con los dos péptidos cortos

En la Tabla 22, se muestran las CMI's obtenidas de los péptidos y de Ampicilina, estos contra ambas cepas. Una vez que se obtuvieron los CMI's de los péptidos y de Ampicilina contra las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, se procedió a escoger las concentraciones con las cuales se realizaron las combinaciones; estas combinaciones se realizaron a través de un cuadro de ajedrez. Las concentraciones de los péptidos que se seleccionaron fueron una concentración menor a la de la CMI obtenida; mientras que las concentraciones de Ampicilina seleccionadas fueron las que tuvieron menor efectividad contra las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, esto para poder evaluar concentraciones menores a las comúnmente utilizadas para estas dos cepas. Los cuadros de ajedrez de dichas combinaciones resultantes se pueden observar en el ANEXO A.

**Tabla 22.** Valores de concentración mínima inhibitoria de antibióticos y péptidos antimicrobianos de las cepas *S. aureus* y *E. coli* por método de dilución en medio líquido.

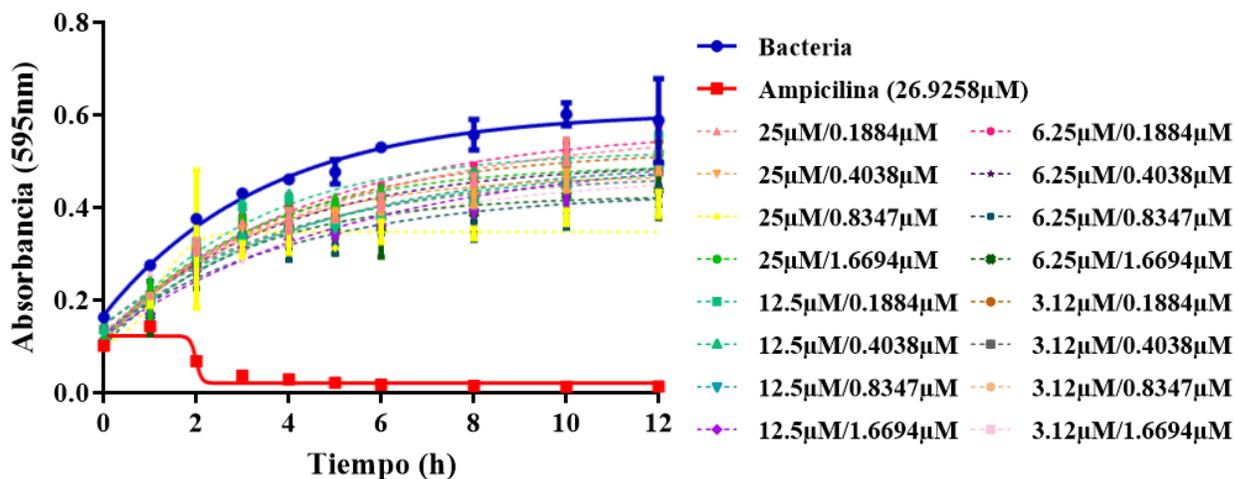
AB/PAMs	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (µM)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (µM)
Ampicilina	2.7	6.7
Css54 [15E] <sup>+4</sup>	25	50
Css54 [14] <sup>+5</sup>	12.5	50

#### Css54 [15E]<sup>+4</sup>/Ampicilina

Las concentraciones que se utilizaron del péptido Css54 [15E]<sup>+4</sup> para realizar las combinaciones, fueron de 3.12-25µM; mientras que las concentraciones de Ampicilina utilizadas fueron de 0.1884–1.6694 µM. A estas combinaciones se les evaluó su actividad antimicrobiana con *E. coli* ATCC 25922; los resultados

obtenidos, fue que se presentó crecimiento de la cepa bacteriana en las diferentes combinaciones obtenidas del cuadro de ajedrez (ANEXO B). También, se puede observar en la Figura 22, el efecto que tuvieron estas combinaciones, son menores a los efectos obtenidos de Ampicilina y el péptido C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup>, trabajando por separados; es decir, no presentaron actividad como se puede observar en el ANEXO D.1.

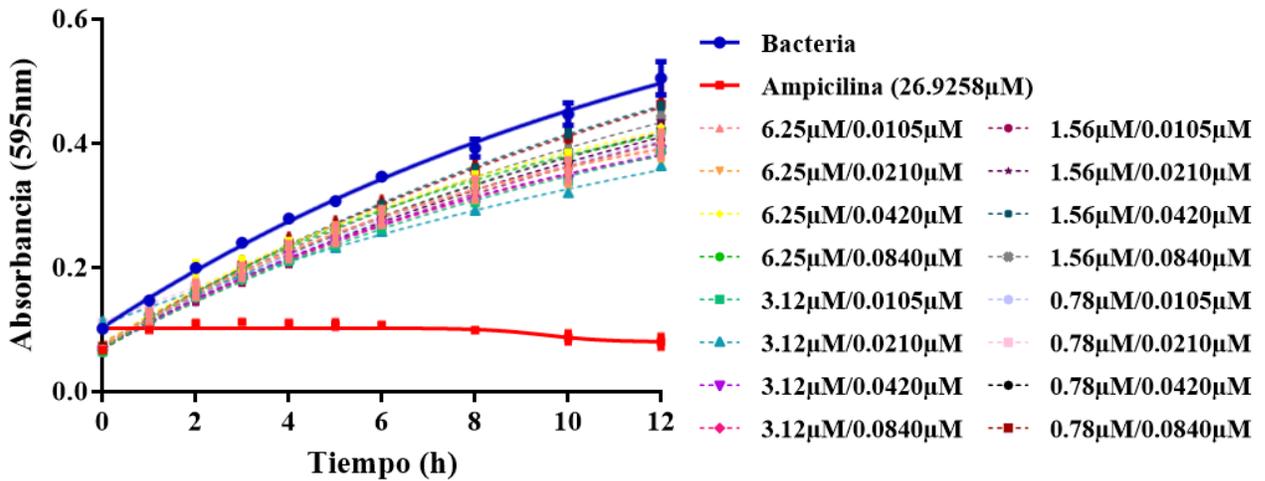
También se evaluaron las combinaciones del péptido C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y Ampicilina sobre *S. aureus* ATCC 25923. Las concentraciones de péptido que se utilizarán son de 1.56–12.5  $\mu$ M y las concentraciones de Ampicilina son de 0.0105-0.0840  $\mu$ M.



**Figura 22.** Cinética de inhibición de crecimiento de *E. coli* con las combinaciones de C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup>/Ampicilina.

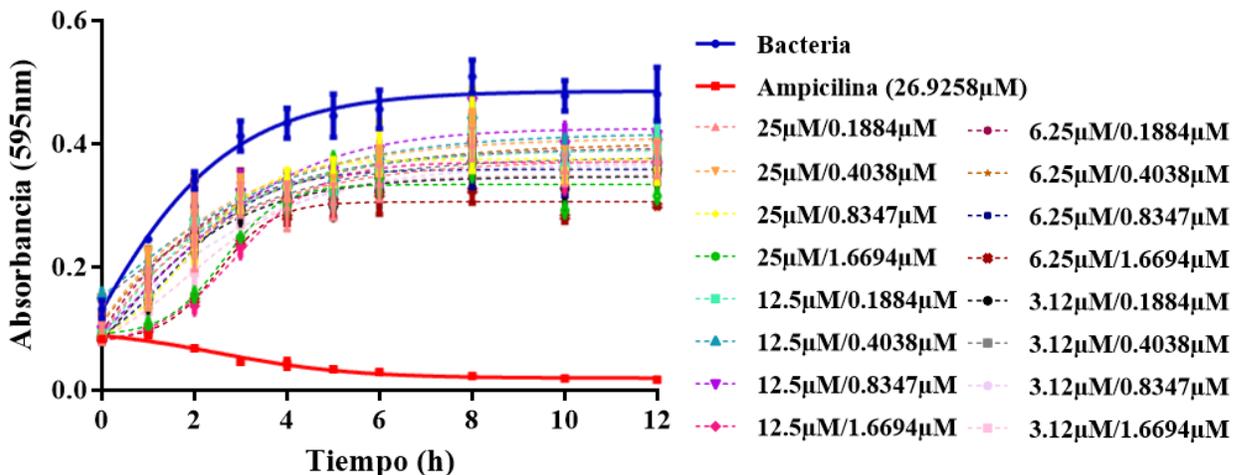
### C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>/Ampicilina

Las concentraciones que se utilizaron del péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> para realizar las combinaciones, fueron de 0.78–6.25  $\mu$ M; mientras que las concentraciones de Ampicilina utilizadas fueron de 0.0105–0.0840  $\mu$ M. A estas combinaciones se les evaluó su actividad antimicrobiana con *S. aureus* ATCC 25923, los resultados obtenidos, fue que se presentó crecimiento de la cepa bacteriana en las diferentes combinaciones obtenidas del cuadro de ajedrez (ANEXO B). También se puede observar en la Figura 23, el efecto que tuvieron estas combinaciones, son menores a los efectos obtenidos de Ampicilina y el péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>, trabajando por separados. Por lo tanto, se podría pensar que su efecto es antagónico, ya que no presentan actividad, como se puede observar en el ANEXO D.2.



**Figura 23.** Cinética de inhibición de crecimiento de *S. aureus* con las combinaciones de Css54 [14]<sup>+5</sup>/Ampicilina.

Por último, se realizaron las combinaciones del péptido y Ampicilina para evaluar su actividad sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922; los resultados obtenidos, fue que se presentó crecimiento de la cepa bacteriana en las diferentes combinaciones obtenidas del cuadro de ajedrez (ANEXO B). Las concentraciones utilizadas del péptido Css54 [14]<sup>+5</sup>, fueron de 3.12–25 µM; mientras que las concentraciones de Ampicilina fueron de 0.1884–1.6694 µM. Se puede observar en la Figura 24, el efecto que tuvieron estas combinaciones, son menores a los efectos obtenidos de Ampicilina y el péptido Css54 [14]<sup>+5</sup>, trabajando por separados. Por lo tanto, se podría decir que, al no presentar actividad, su efecto es antagónico, como se observa en el ANEXO D.3.



**Figura 24.** Cinética de inhibición de crecimiento de *E. coli* con las combinaciones de Css54 [14]<sup>+5</sup>/Ampicilina.

En la Tabla 23, se muestra los efectos obtenidos de las mezclas de AB (Ampicilina) + PAM (Css54 [15E]<sup>+4</sup> y/o Css54 [14]<sup>+5</sup>) contra las cepas de *S. aureus* y *E. coli*. El AB Ampicilina fue seleccionado para ambas

cepas, ya que en la actualidad estas cepas presentan cada vez en mayor incidencia resistencia a este AB; además de que como se sabe Ampicilina es un antibiótico que su blanco de acción es la síntesis de la pared celular y se propone que los péptidos Css54 [15E]<sup>+4</sup> y Css54[14]<sup>+5</sup> pueden realizar formación de poros en la membrana celular, al igual que su péptido parental Css54 (Corzo *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2014). Como resultados se obtuvo que las diferentes combinaciones de AB + PAM, no presentaron actividad contra ambas cepas por lo que se supone que el efecto es antagónico. Resultados similares obtenidos en el trabajo de Jiménez en el 2015; en el cual, realizó combinaciones de Amoxicilina (síntesis de pared celular) + Css54 (formación de poros en la membrana) contra una cepa de *S. aureus* UPS13 (aislado clínico de ulcera de pie diabético), obteniendo como resultado que las combinaciones no presentaron actividad contra dicha cepa bacteriana; ya que tanto Amoxicilina como Css54 podrían estar compitiendo por el mismo blanco de acción y/o interfiriéndose uno contra otro (Jiménez, 2015; Hall *et al.*, 1982). Otra suposición de la del porque resultó un efecto antagónico podría ser, que nuestros péptidos son agentes antimicrobianos bacteriostáticos a esas concentraciones, mientras que Ampicilina es un agente bactericida. Por lo cual, según en el trabajo de Ocampo y colaboradores en el 2019, en donde se realizaron combinaciones de 21 antibióticos (de diferentes blancos de acción: pared celular, síntesis de proteínas y biosíntesis de ácido fólico), clasificándolos en bactericidas (incluida Ampicilina) y bacteriostáticos: obteniendo varias combinaciones sinérgicas y combinaciones antagónicas. Para probar de manera más general si el antagonismo se enriqueció en combinaciones bacteriostáticas-bactericidas, clasificaron los pares de antibióticos en: pares bactericida-bactericida, bactericida-bacteriostática y bacteriostática-bacteriostática. A lo que denotaron, que un alto grado de antagonismo, fueron casi siempre los pares bacteriostáticos–bactericidas. Por lo tanto, sus datos sugirieron que los agentes bacteriostáticos antagonizan las acciones de los antibióticos que actúan sobre las células en crecimiento. Este hallazgo les resultó ampliamente consistente con informes anteriores que demuestran que la inhibición del crecimiento a través de la limitación de nutrientes a menudo disminuye los efectos de los compuestos bactericidas (Ocampo *et al.*, 2014).

**Tabla 23.** Efectos obtenidos con las combinaciones de Ampicilina y péptidos antimicrobianos por el método de dilución en medio líquido.

Bacteria	PAM (CMI)	Antibiótico (CMI)	Blanco de acción	AB+PAM (μM)	Tipo de efecto
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Css54 [15E] <sup>+4</sup>	Ampicilina	Síntesis de pared celular	NE	NE
	Css54 [14] <sup>+5</sup>	Ampicilina	Síntesis de pared celular	0.0840+12.5	Antagónico
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Css54 [15E] <sup>+4</sup>	Ampicilina	Síntesis de pared celular	1.6694+25	Antagónico
	Css54 [14] <sup>+5</sup>	Ampicilina	Síntesis de pared celular	1.6694+25	Antagónico
NE: No Evaluado					

En la Tabla 24 se muestran una diversidad de estudios que trabajaron con diferentes péptidos en combinación con el AB Ampicilina. En esta tabla se encuentra 3 listas de péptidos, los cuales fueron organizados según el efecto que tuvieron las combinaciones, que realizaron; cómo se puede observar hay una mayor cantidad de péptidos que tuvieron efectos sinérgicos y aditivos a comparación con los que tuvieron efectos antagónicos. Yu y colaboradores en el 2016, en su estudio mencionan que los mecanismos moleculares de interacción, especialmente los antagonismos, de los AMP con agentes antimicrobianos son en gran parte desconocidos. Ya que la mayoría de los AMP se dirigen a la membrana de los patógenos y es poco probable que sus interacciones interrumpen directamente la red metabólica en la célula como ciertos antibióticos. En el ANEXO E, se muestran los péptidos que se mencionan en la Tabla 24, con sus respectivos parámetros fisicoquímicos. Cabe destacar que los GRAVY de los péptidos que presentaron un efecto sinérgico, casi todos son valores negativos y a su vez tienen una hidrofobicidad relativamente baja, es decir, son más hidrofílicos. Los valores bajos de GRAVY indican una hidrofiliidad fuerte y los valores altos de GRAVY indican una hidrofobicidad fuerte (Panda y Chandra, 2012) y al ser más hidrofílica presentan una actividad antimicrobiana mayor, ya que esto le permite una mayor interacción con la membrana de la bacteria (Rodríguez-Solís, 2012; Martínez, 2017). Los péptidos que se evaluaron en este estudio tienen valores de GRAVY mayores a los obtenidos por los PAMs (ANEXO F.3.), con efectos sinérgicos de la Tabla 24, por lo tanto, sus valores de hidrofobicidad son mayores y son más hidrofóbicos que dichos PAMs (ANEXO F.4) de la tabla antes mencionada.

También al hacer la comparación del BI de los PAMs con efectos sinérgicos y aditivos de la Tabla 24, con los PAMs evaluados en este estudio; se observó que los valores de BI de nuestros PAMs son menores a los PAMs de los estudios (ANEXO F.5.). Al igual las cargas netas de los PAMs de estos dichos estudios, son mayores, a comparación de las cargas netas de nuestros PAMs (ANEXO F.2.). Estos dos parámetros podrían ser de gran importancia, para que los PAMs tengan efectos sinérgicos o aditivos al combinarse con Ampicilina.

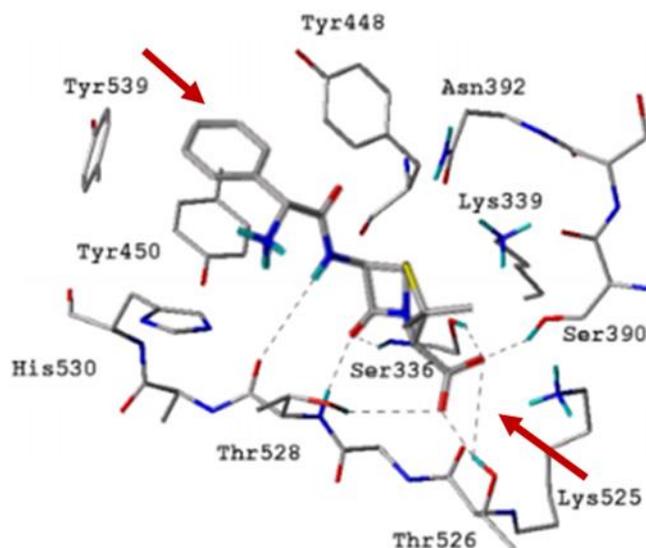
Otra comparación que se realizó fue el número de aminoácidos; sin embargo, nuestros PAMs tienen números de aminoácidos muy similares a los PAMs de la Tabla 24 con efectos sinérgicos y aditivos, por lo tanto, este parámetro fisicoquímico no tiene relación con los efectos potenciadores (ANEXO F.1.). Resultados similares en el trabajo de Ulvatne y colaboradores en el 2001, donde probaron 5 péptidos diferentes de 6-18 aminoácidos con diferentes antibióticos, uno de ellos ampicilina (Ulvatne *et al.*, 2001).

**Tabla 24.** Ejemplos de PAMs evaluados en combinación con Ampicilina y sus efectos obtenidos.

Antagónico		Sinérgico		Aditivo	
Péptido	Referencia	Péptido	Referencia	Péptido	Referencia
VVRG	(He <i>et al.</i> , 2015)	LFcin 17-30	(Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010)	Indolicidin	(He <i>et al.</i> , 2015)
La 47	(García <i>et al.</i> , 2013)	LFampin 265-284	(Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010)	ARVA	(He <i>et al.</i> , 2015)
MelitAP-27	(Almaaytah <i>et al.</i> , 2016)	P9	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)	Melittin	(He <i>et al.</i> , 2015)
CM11	(Amani <i>et al.</i> , 2015)	Cryptdin-2	(Rishi <i>et al.</i> , 2011)	UP-5	(Almaaytah <i>et al.</i> , 2018)
Esc (1-18)	(Marcellini <i>et al.</i> , 2009)	Arenicin-1	(Choi y Lee, 2012)	P18	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
RR	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)	Magainin II	(He <i>et al.</i> , 2015)	P15	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
IK8 “D isoforma”	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)	VAYR	(He <i>et al.</i> , 2015)	P12	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
KFF (3K)	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)	Pleurocidin	(Choi y Lee, 2012)	P6	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
		Bombina HL	(Xiang <i>et al.</i> , 2017)	BHL-bombina	(Xiang <i>et al.</i> , 2017)
		Bombina HD	(Xiang <i>et al.</i> , 2017)	Pin2	(García <i>et al.</i> , 2013)
		CLP-19	(Li <i>et al.</i> , 2017)		
		CSpK14	(Regmi <i>et al.</i> , 2017)		
		Coprisa	(Hwang <i>et al.</i> , 2013)		

Un estudio reciente sugirió que la sinergia es causada por la conjugación de AMP aplicados, que forman una supermolécula y poros mejor estabilizados. Esto también se confirma mediante péptidos sintetizados químicamente unidos. Además, los péptidos formadores de poros también pueden ayudar a otros agentes antimicrobianos transmembranales aplicados a invadir rápidamente células bacterianas e interrumpir sustancialmente el metabolismo (Yu *et al.*, 2016; Brogden *et al.*, 2005).

En el caso del antagonismo este puede ser resultado de diferentes mecanismos como: competencia entre sitios blanco; alteración del sitio blanco por el otro agente antimicrobiano, o inactivación del PAM causada por el antibiótico o viceversa (Ulvatne *et al.*, 2001; Tekin *et al.*, 2016). Basandonos en el trabajo de Papp Wallace y colaboradores en el 2012, realizaron un Docking para ver como Ampicilina interactuaba con PBP3 (por sus siglas en inglés, Proteínas Fijadoras de Penicilina), Ampicilina haciendo que PBP3 se inactivara ya que interactúa con su sitio activo. La interacción se da por puentes de hidrogeno entre: el =O (oxígeno) de Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido Serina, el grupo NH o el =O de la Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> o el =O del aminoácido Treonina y el =O de Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido Lisina, como se puede observar en la Figura 25.



**Figura 25.** Interacción de Ampicilina con el sitio activo de PBP3. Con flechas rojas se señala la molécula de Ampicilina y con líneas punteadas color gris se señalan los puentes de hidrógeno entre la Ampicilina y PBP3 (Papp Wallace *et al.*, 2012)

También tomando como referencia el trabajo de Chen y colaboradores en el 2009, en el cual estudiaron la estructura cristalina de PBP6 (por sus siglas en inglés, Proteína Fijadora de Penicilina) de *Escherichia coli* y como es su interacción con Ampicilina, haciendo Ampicilina que PBP6 se inactivara. La interacción se da por puentes de hidrogeno entre: el =O (oxígeno) de Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido Serina, el grupo NH o el =O de la Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> o el =O del aminoácido Treonina y el =O de Ampicilina con el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido Arginina, como se puede observar en la Figura 26.



## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó la verificación de las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 (donación INSP), las cuales nos dio como resultado que se encontraban puras.

Se purificaron a homogeneidad, mediante HPLC los dos péptidos cortos de C<sub>ss</sub>54: C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> se obtuvo al tiempo 42.02min y C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> se obtuvo al tiempo 42.78min; tuvieron tiempos de retención muy similares y se mandaron a identificar por espectrometría de masas, teniendo C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> un PM de 2009.5 Da y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> un PM de 1880.4 Da.

Se evaluó la susceptibilidad de cada cepa con diferentes antibióticos, con la técnica de Kirby- Bauer, según el CLSI. Como resultado se obtuvo que las bacterias son sensibles a los antibióticos probados (Ampicilina, Cefotaxima, Gentamicina, Cefepime, Levofloxacin, Sulfametoxazol/ Trimetoprima y Tetraciclina) como se esperaba, ya que son ATCC. Este ensayo nos ayudó para elegir los antibióticos para realizar las combinaciones con los dos péptidos cortos. El antibiótico seleccionado fue Ampicilina que tiene como blanco de acción, la pared celular.

Una vez que se purificaron los péptidos, se cuantificaron y se llevaron a diferentes concentraciones, para evaluarlos con las dos cepas; y obtener las CMI, mediante el método de dilución en líquido. El péptido C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> presentó una CMI de 25 µM con *S. aureus* y una CMI de 50 µM con *E. coli*, mientras que el péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> presentó valores de CMI de 25 y 12.5 µM con *S. aureus*; y una CMI de 50 µM con *E. coli*.

Posteriormente se realizó un ensayo en líquido para determinar las CMI del antibiótico a diferentes concentraciones en ambas cepas, Ampicilina presentó una CMI de 2.6925µM (1µg/ml) con *S. aureus* y una CMI de 6.7314µM (2.5µg/ml) con *E. coli*.

Por último, se realizaron las combinaciones del péptido C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y Ampicilina, para evaluarlas en ensayos por el método en líquido. Estas combinaciones fueron evaluadas en *E. coli* ATCC 25922, obteniendo como resultado que los efectos inhibitorios eran menores, a los obtenidos cuando estos trabajan por separados. También se realizaron combinaciones del péptido C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup> y Ampicilina; las cuales, fueron evaluadas en *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Los efectos que se observaron fueron antagónicos, porque menores a los obtenidos cuando el péptido y Ampicilina trabajan por separado.

A lo que se concluye que las variantes cortas de C<sub>ss</sub>54: C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>, al evaluar su actividad antimicrobiana ante cepas ATCC mostraron una buena actividad antimicrobiana. Sin embargo, al ser evaluadas en combinación con ampicilina mostraron efectos antagónicos, estos resultados comparados con otros PAMs en combinación con ampicilina que mostraron efectos sinérgicos, se observó que los parámetros fisicoquímicos de las variantes de C<sub>ss</sub>54 eran muy diferentes:

- El GRAVY de nuestras variantes es positivo, mientras que el de los péptidos reportados el GRAVY es negativo.
- El BI de nuestras variantes es menor, mientras que el de los péptidos reportados es mayor.
- La carga neta de nuestras variantes es menor (+4 y+5), mientras que las cargas netas de los péptidos reportados son mayores, ya que en su mayoría tienen cargas netas de +6 a +9.
- En cuanto a la hidrofobicidad, nuestras variantes cortas tienen hidrofobicidad mayor (hidrófobos); mientras que la hidrofobicidad de los péptidos reportados son menores (hidrofilicos).

Por lo tanto, nuestras variantes cortas en combinación con ampicilina no pueden potenciar sus efectos, pero con otros antibióticos sí podría tener efectos potenciadores.

Además de que los péptidos pueden interactuar con el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido Lisina con el grupo COOH de la ampicilina, así mismo interfiriéndose en cuanto a su actividad antimicrobiana, antes de poder interactuar con la célula bacteriana.

## **9. PERSPECTIVAS**

Para poder comprender mejor el mecanismo de acción de los PAMs, estos se podrían ser valuados con diferentes antibióticos como: Gentamicina, Levofloxacin y Trimetoprima, ya que dichos antibióticos tienen blancos intracelulares. Una vez obteniendo los resultados de dichas combinaciones, se podrían evaluar los efectos de estas.

Además de que estos PAMs podrían ser probados con una mayor variedad de cepas bacterianas, tanto ATCC como de aislados clínicos. Varios estudios incluyendo el trabajo de Rodríguez-Solís y colaboradores en el 2012, evaluaron la actividad antimicrobiana de PAMs, obteniendo mejores resultados en cepas bacterianas de aislados clínicos a comparación de las cepas ATCC.

Otra gran oportunidad que podrían tener estos PAMs, sería el de evaluar su actividad en células cancerígenas, ya que estos péptidos presentan alta actividad hemolítica.

## 10. REFERENCIAS

- AFPMB. Armed Forces Pest Management Board: The living hazards database. Revisado: 8 de febrero de 2018. ([http://www.acq.osd.mil/eie/afpmb/docs/lhd/venomous\\_animals\\_byspecies.pdf](http://www.acq.osd.mil/eie/afpmb/docs/lhd/venomous_animals_byspecies.pdf)).
- Almaaytah, A., Alnaamneh, A., Abualhajjaa, A., y Al-Balas, Q. (2016). In vitro synergistic activities of the hybrid antimicrobial peptide MelitAP-27 in combination with conventional antibiotics against planktonic and biofilm forming bacteria. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. Vol. 22(4), págs. 497-504.
- Almaaytah, A., Qaoud, M., Khalil Mohammed, G., Abualhajjaa, A., Knappe, D., Hoffmann, R., y Al-Balas, Q. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity of UP-5, an ultrashort antimicrobial peptide designed using only arginine and biphenylalanine. *Pharmaceuticals*, Vol. 11(1), págs. 3.
- Al Humam, N. A. (2016). Special biochemical profiles of *Escherichia coli* strains isolated from humans and camels by the VITEK 2 automated system in Al-Ahsa, Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 10(22), págs.783-790.
- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C., y Fica, A. (2016). Basic concepts for the rational use of antibiotics in otorhinolaryngology. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, Vol. 76(1), págs. 136-147.
- Akanbi, O. E., Njom, H. A., Fri, J., Otigbu, A. C., y Clarke, A. M. (2017). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 14(9), págs. 1001.
- Amani, J., A Barjini, K., M Moghaddam, M., y Asadi, A. (2015). In vitro synergistic effect of the CM11 antimicrobial peptide in combination with common antibiotics against clinical isolates of six species of multidrug-resistant pathogenic bacteria. *Protein and Peptide Letters*. Vol. 22(10), págs. 940-951.
- Arteaga-Garibay, R., Doval-Ugalde, R., Aguilera-Arreola, G., Aparicio-Ozores, G., Castro-Escarpulli, G., y Rivera-Méndez, M. (2012). Manual de Prácticas de Bacteriología Médica. *Academia de Bacteriología Médica*. Vol. 1, págs. 6-9.
- Aryal, Sagar. (August, 2015). Mueller Hinton Agar (MHA) – Composition, Principle, Uses and Preparation. Microbiology Info. Revisado: 25 de noviembre de 2018. (<https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>).
- Aryal, Sagar. (June. 2016). Salmonella Shigella (SS) Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Result Interpretation. Microbiology Info. Revisado: 28 de noviembre de 2018. (<https://microbiologyinfo.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-uses-preparation-and-result-interpretation/>).
- Bahar, A. A., y Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. Vol. 6(12), págs. 1543-1575.
- Bakkali, M. (2013). Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility?. *Archives of Microbiology*, Vol. 195(4), págs. 279-289.

- Barcella, L., Barbaro, A. P., y Rogolino, S. B. (2016). Colonial morphology of *Escherichia coli*: impact of detection in clinical specimens. *Microbiologia Medica*, Vol.2, págs. 31.
- BD. (julio, 2014). Instructions for use ready to use plated media. BD MacConkey II Agar. Revisado: 21 de julio de 2018. (<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>).
- BD. (abril, 2013). Instructions for use ready to use plated media. BD *Salmonella Shigella* Agar. Revisado: 19 de julio de 2018. (<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8779>).
- BD. (abril, 2013). Instructions for use ready to use plated media. BD™ EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Revisado: 4 de abril de 2018. (<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765>).
- BD. (abril, 2013). Instructions for use ready to use plated media. BD™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood. Revisado: 4 de abril de 2018. (<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8968>).
- Berga, A. P. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Marge Books.
- Bielsa-Fernández, M. V., Frati-Munari, A. C., y Ariza-Andraca, R. (2016). Treatment to Patients with Acute Diarrhea: Survey to a Group of General Practitioners from Mexico. *Atención Familiar*, Vol. 23(4), págs. 119-124.
- Britania. (2013). Discos de Oxidasa. Britania. Revisado: 18 de julio de 2018. (<http://studylib.es/doc/5110963/discos-de-oxidasa---laboratorios-britania>).
- Britania. (2015). Sangre Agar Base. Britania. Revisado: 20 de julio de 2018. ([http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2975a1ab740.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2975a1ab740.pdf))
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, Vol.3(3), págs.238.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., y Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, Vol. 38(2), págs. 149-158.
- Calderón, C. B., y Sabundayo, B. P. (2007). 2 Antimicrobial Classifications. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, págs. 7.
- Calvo, J., y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 27(1), págs. 44-52.
- Cappuccino, J. G., y Sherman, N. (2013). Microbiology: A Laboratory Manual. *EUA: Pearson*. Págs. 514.
- Castañeda-Casimiro, J., Ortega-Roque, J. A., Venegas-Medina, A. M., Aquino-Andrade, A., Serafín-López, J., Estrada-Parra, S., y Estrada, I. (2009). Antimicrobial peptides: peptides with multiple functions. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, Vol. 18(1), págs. 16-29.
- Cervantes-García, E., García-González, R., y Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, págs.28-40.
- Chen, Y., Zhang, W., Shi, Q., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., y Shoichet, B. K. (2009). Crystal structures of penicillin-binding protein 6 from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 131(40), págs. 14345-14354.

- Chernysh, S., Gordya, N., Tulin, D., y Yakovlev, A. (2018). Biofilm infections between *Scylla* and *Charybdis*: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. *Infection and drug resistance*, Vol. 11, págs. 501.
- Choi, H., y Lee, D. G. (2012). Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Vol. 1820(12), págs.1831-1838.
- Choi, H., y Lee, D. G. (2012). Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, Vol. 163(6-7), págs. 479-486.
- CHROMagar. (marzo, 2015). Instructions for use. CHROMagar *Staph Aureus*. Revisado: 4 de abril de 2018. ([http://www.chromagar.com/fichiers/1425915717NT\\_EXT\\_005\\_V9\\_TA.pdf](http://www.chromagar.com/fichiers/1425915717NT_EXT_005_V9_TA.pdf)).
- CLSI. (2018). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28<sup>th</sup> ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, págs. 30-150
- CONABIO. (2009). Arachnids (*Aracnida*). Mexican Biodiversity. Revisado: 8 de febrero de 2018). ([http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/animales/aracnidos/aracnidos.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/animales/aracnidos/aracnidos.html))
- CHROMagar. (12 de febrero de 2016). CHROMagar *Salmonella*. Instructions for use. Revisado: 4 de mayo de 2018. ([http://www.chromagar.com/fichiers/1455283300NT\\_EXT\\_004\\_V7.0\\_SA.pdf?PHPSESSID=f70251cb5fe9df09dc3d5212d97ba7b2](http://www.chromagar.com/fichiers/1455283300NT_EXT_004_V7.0_SA.pdf?PHPSESSID=f70251cb5fe9df09dc3d5212d97ba7b2)).
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., Weilan, H. E., Norton, R. S., y Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*, Vol. 359(1), págs.35-45.
- Cruz, A. (2002). Bulimia. *Selector*.
- De Ahumada-Vázquez, J. I., Falcón, M. L. S., y Molina, J. S. S. (2002). Farmacología práctica: para las diplomaturas en ciencias de la salud (enfermería, fisioterapia, podología) con autoevaluación. *Ediciones Díaz de Santos*.
- De La Fuente, M., Chahuán, I., Gutiérrez, R., Díaz-Jiménez, D., Olivares, M., Vidal, R., Simian, D., Figueroa, C., Quera, R., Hermoso, M. A., y Hermoso, M. A. (2017). Presence of intracellular *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease. *Revista Médica de Chile*, Vol. 145(9), págs.1129-1136.
- De la Fuente-Salcido, D., Margarita, N., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., y García-Pérez, A. P. (2015). Evaluation of the activity of antimicrobial agents against the challenge of bacterial resistance. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 46(2), págs.7-16.
- DRUGBANK. (8 de julio de 2018). Novobiocin. Recuperado: 20 de julio de 2018. (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01051>).
- DRUGBANK. (20 de julio de 2018). Ceftriaxone. Recuperado: 20 de julio de 2018. (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01212>).
- Errecalde, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública (No. V538 ERRu). *FAO*. Págs. 67.

- Escobar, E., Flores, L., y Rivera, C. (2008). Antibacterial peptides from *Hadruioides mauryi* and *Centruroides margaritatus*. *Revista Peruana de Biología*, Vol. 15(1), págs. 139-142.
- Falconer, S. B., Czarny, T. L., y Brown, E. D. (2011). Antibiotics as probes of biological complexity. *Nature Chemical Biology*, Vol. 7(7), págs. 415.
- Fernández-Riverón, F., López-Hernández, J., Ponce-Martínez, L. M., y Machado-Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, Vol. 32(1).
- Fetsch, A. (2017). *Staphylococcus aureus*. *Academic Press*. Vol. 12, págs. 316.
- Flores-Villaseñor, H., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltrán, J., Sicairos, N., y Bolscher, J. G. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc<sub>in</sub>, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals*, Vol. 23(3), págs. 569-578.
- García-Martos, P., Fernández-del Barrio, M.T., y Paredes-Salido, F. (1997). Microbiología aplicada. *Díaz de Santos, S.A.* Vol. 1, págs. 526.
- García, F., Villegas, E., Espinosa-Solís, G. P., Rodríguez, A., Paniagua-Solís, J., Sandoval-López, G., Possani, N., y Corzo, G. (2013). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbial activity in the presence of commercial antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, págs. 3-10.
- Gutiérrez, P., y Orduz, S. (2003). Péptidos antimicrobianos: Estructura, función y aplicaciones. *Actualidades Biológicas*, Vol. 25(78), págs. 5-15.
- He, J., Starr, C. G., y Wimley, W. C. (2015). A lack of synergy between membrane-permeabilizing cationic antimicrobial peptides and conventional antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, Vol. 1848(1), págs. 8-15.
- Hernández-Chavarría, F. (2002). Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica. *Euned*. Págs. 3-11.
- Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C., y Maffia, P. C. (2018). Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. *Frontiers in Chemistry*, págs. 6.
- Hwang, I. S., Hwang, J. S., Hwang, J. H., Choi, H., Lee, E., Kim, Y., y Lee, D. G. (2013). Synergistic effect and antibiofilm activity between the antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria. *Current Microbiology*. Vol. 66(1), págs. 56-60.
- Jiménez-Sánchez, K. (2015). Pruebas Bioquímicas. "EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CON ANTIBIÓTICOS COMERCIALES PARA LA INHIBICIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN INFECCIÓN DE PIED DIÁBETICO". Tesis de maestría. *UAEM*. Págs. 119.
- Karp, G. (2009). Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. *The McGraw Hill Companies*. Págs. 765.

- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A. y Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 115(15), págs. E3463-E3470.
- Kocsis, Béla. (14 de octubre 2014). *Staphylococci and Streptococci*. Semmelweis University Institute of Medical Microbiology. Revisado: 20 de julio de 2018. ([http://semmelweis.hu/mikrobiologia/files/2014/10/FGM\\_06.pdf](http://semmelweis.hu/mikrobiologia/files/2014/10/FGM_06.pdf)).
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., y Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 8(6), págs. 423.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., y Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*. Vol. 8(1), págs. 4.
- Li, D., Yang, Y., Tian, Z., Lv, J., Sun, F., Wang, Q., Liu, Y., y Xia, P. (2017). Synergistic antibiotic effect of looped antimicrobial peptide CLP-19 with bactericidal and bacteriostatic agents. *Oncotarget*, Vol. 8(34), págs. 55958.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 3(1), págs. 10-18.
- Luna-Negret, Y., Muguercia-Bles, A., y Antúnez-Coca, J. (2017). Parenteral antibiotic therapy prescription in a general surgery service of Santiago de Cuba. *MediSan*. Vol. 21(09), págs. 2018-2023.
- Marcellini, L., Borro, M., Gentile, G., Rinaldi, A. C., Stella, L., Aimola, P., y Mangoni, M. L. (2009). Esculentin-1b (1–18)—a membrane-active antimicrobial peptide that synergizes with antibiotics and modifies the expression level of a limited number of proteins in *Escherichia coli*. *The FEBS journal*, Vol. 276(19), págs.5647-5664.
- Martínez-Paula, J. (2017). Resultados y discusiones. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE VARIANTES CORTAS DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO C<sub>54</sub>. Tesis de licenciatura. *UAEM*. Págs. 69.
- Marquette, A., y Bechinger, B. (2018). Biophysical investigations elucidating the mechanisms of action of antimicrobial peptides and their synergism. *Biomolecules*, Vol. 8(2), págs. 18.
- Mexican, Biodiversity. (2009). Bacteria. National Commission for Knowledge and Use of Biodiversity. Revisado: 2 de febrero de 2018. ([http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/Bacterias/bacteria.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/Bacterias/bacteria.html)).
- Mohamed, M. F., Hammac, G. K., Guptill, L., y Seleem, M. N. (2014). Antibacterial activity of novel cationic peptides against clinical isolates of multi-drug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from infected dogs. *PloS one*, Vol. 9(12), págs. 16-259.
- Molina-López., J. (16 de mayo de 2015). Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAM. Revisado: 31 de enero de 2018. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>).

- Molina-López, J. y Eslava-Campos, C. A. (3 de agosto de 2015). *Escherichia coli* diarrogénica. UNAM. Revisado: 21 de febrero de 2018. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>).
- Molina-López, J. y Manjarrez-Hernández, Á. (7 de enero de 2015). Infecciones de vías urinarias - *Escherichia coli*. UNAM. Revisado: 21 de febrero de 2018. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/enfermedades-vias-urinarias.html>).
- Ocampo, P. S., Lázár, V., Papp, B., Arnoldini, M., Zur Wiesch, P. A., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pál, C., Ackermann, M., y Bonhoeffer, S. (2014). Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.58(8), págs. 4573-4582.
- Panda, S., y Chandra, G. (2012). Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformation*, Vol. 8(18), págs. 891.
- Papp-Wallace, K., Senkfor, B., Gatta, J., Chai, W., Taracila, M., Shanmugasundaram, V., Han, S., Zaniewski, R., Lacey, B., Tomaras, A., Skalweit, M., Harris, M., Rice, L., Buynak, J., y Bonomo, R. (2012). Early Insights into the Interactions of Different  $\beta$ -Lactam Antibiotics and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors against Soluble Forms of *Acinetobacter baumannii* PBP1a and *Acinetobacter* sp. PBP3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Págs. 5687–5692
- Pérez-Zazueta, G., y Quiroga, G. (2013). Industria farmacéutica unidad de inteligencia de negocios. ProMéxico Inversión y Comercio. *Secretaría de Economía*. Revisado: 6 de abril de 2018. 8. ([https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820\\_DS\\_Farmaceutica\\_ESP.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820_DS_Farmaceutica_ESP.pdf)).
- Ponce, S. J. y Francke, O. F. (2004). Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* Marx (1890) (Scorpiones: Buthidae) de la depresión del Balsas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. Págs. 12.
- ProMéxico. (2016). DIAGNÓSTICO SECTORIAL. ProMéxico Inversión y Comercio. *Secretaría de Economía*. Revisado: 4 de abril de 2018. (<http://www.promexico.gob.mx/documentos/diagnosticos-sectoriales/farmaceutico.pdf>).
- Rajasekaran, G., Kim, E. Y., y Shin, S. Y. (2017). LL-37-derived membrane-active FK-13 analogs possessing cell selectivity, anti-biofilm activity and synergy with chloramphenicol and anti-inflammatory activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. Vol. 1859(5), págs. 722-733.
- Rasheed, M. U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., y Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol. 56(4), págs. 341-346.
- Regmi, S., Choi, Y. H., Choi, Y. S., Kim, M. R., y Yoo, J. C. (2017). Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. *Folia Microbiologica*, Vol. 62(2), págs. 127-138.
- Regmi, S., Seok Choi, Y., Choi, Y. H., Kyun Kim, Y., Sik Cho, S., Yoo, J. C., y Suh, J. W. (2017). Antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* CSB138: characterization, killing kinetics, and synergistic potency. *International Microbiology*. Vol. 20(1), págs. 43-53.

- Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology, ASMMicrobeLibrary.
- Rishi, P., Preet, S., Bharrhan, S., y Verma, I. (2011). In vitro and in vivo synergistic effects of cryptdin 2 and ampicillin against *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 55(9), págs. 4176-4182.
- Rivera, C., Flores, L., Pantigoso, C., y Escobar, E. (2010). Isolation and characterization of antibacterial peptide from *Centruroides margaritatus venom*. *Revista Peruana de Biología*, Vol. 17(1), págs. 129-132.
- Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., y Desgarennes, C. P. (2007). Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*, Vol. 51(2), págs. 57-67.
- Rodríguez-Solís, A. J. (2012). Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index. Tesis de doctorado. *Instituto en Biotecnología, UNAM*.
- Rodríguez-Solís, A. J., Villegas-Villarreal, E. C., y Corzo-Burguete, G. A. (2014). Venenos arácnidos: su sorprendente poder insecticida y su rara capacidad antibiótica. *Tema del mes*. Págs. 23.
- Rodríguez, A., Villegas, E., Montoya-Rosales, A., Rivas-Santiago, B., y Corzo, G. (2014). Characterization of antibacterial and hemolytic activity of synthetic pandinin 2 variants and their inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one*. Vol. 9(7).
- Rodríguez, A., Villegas, E., Satake, H., Possani, L. D., y Corzo, G. (2011). Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index. *Amino Acids*. Vol. 40(1), págs. 61-68.
- Salas V., C. R. (2014). Características generales del género *Escherichia*. En Elaboración y evaluación del material didáctico variedades enterovirulentas de *Escherichia coli*. Facultad De Estudios Superiores De Zaragoza, UNAM. Págs. 55-57.
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., y García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: *OmniaScience*. Págs.77-100.
- SIGMA-ALDRICH. (2013). 70439 Oxidase Test. SIGMA-ALDRICH. Revisado: 18 de julio de 2018. (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/70439dat.pdf>)
- Sánchez, M. L. (2016). Mechanisms of action of antimicrobial peptides and resistance mechanisms of pathogens. *Bioquímica y Patología Clínica Revista de la Asociación Bioquímica Argentina*. Volumen 80. Págs. 36-43.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., y Villegas, M. V. (2011). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infection*. Vol. 12(3).
- Téllez, G. A., y Castaño, J. C. (2010). Antimicrobial peptides. *Infection*. Vol. 14(1), págs. 55-67.
- Tekin, E., Beppler, C., White, C., Mao, Z., Savage, V. M., y Yeh, P. J. (2016). Enhanced identification of synergistic and antagonistic emergent interactions among three or more drugs. *Journal of The Royal Society Interface*. Vol. 13, págs. 119.
- Tracey-A., Taylor; Chandrashekhar -G., y Unakal. (October, 2018). *Staphylococcus Aureus*. StatPearls [Internet], NCBI. Revisado: 27 de noviembre de 2018. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>).

- Ulvatne, H., Karoliussen, S., Stiberg, T., Rekdal, Ø., y Svendsen, JS (2001). Los péptidos antibacterianos cortos y la eritromicina actúan sinérgicamente contra *Escherichia coli*. *Diario De Quimioterapia Antimicrobiana*, Vol. 48 (2), págs. 203-208.
- Veitía-Velázquez, J., Salgado-de Velázquez, J., y Valery-Márquez, F. (2008). Combination of antibiotics in pediatrics. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. Vol. 71(3), págs. 96-102.
- Vega, S. C., Martínez, D. A., Chalá, M. D. S., Vargas, H. A., y Rosas, J. E. (2018). Design, Synthesis and Evaluation of Branched RRWQWR-Based Peptides as Antibacterial Agents Against Clinically Relevant Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9, págs.329.
- Velásquez-Chávez, T.E.; Valencia-Castro, C.M.; Linaje-Treviño, M.S.; Pacheco-Cano, R.D.; Salcedo-Hernández, R.; Barboza-Corona, J.E. y De la Fuente-Salcido, N.M. (2013). POTENCIAL BIOTERAPEÚTICO DE BACTERIOCINAS DE *Bacillus thuringiensis* PRODUCIDAS EN CONDICIONES OPTIMAS DE CULTIVO. *XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Nuevo León, págs. 6.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P., y Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers In Microbiology*. Vol. 7, págs. 173.
- WHO. (27 de febrero de 2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. Revisado: 6 de marzo de 2018. (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>).
- WHO. (5 de febrero de 2018). WHO Antibiotic resistance. World Health Organization. Revisado: 8 de marzo de 2018. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>).
- WHO. (2001). WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization. Revisado: 15 de marzo de 2018. ([http://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf)).
- WHO. (2016). *Escherichia coli* infections. World Health Organization. Revisado: 15 de marzo de 2018. ([http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ecoli/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ecoli/en/)).
- WHO. (5 de febrero de 2018). Antibiotic resistance. World Health Organization. Revisado: 20 de marzo de 2018. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>).
- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 49(4), págs. 585-586.
- Xiang, J., Zhou, M., Wu, Y., Chen, T., Shaw, C., y Wang, L. (2017). The synergistic antimicrobial effects of novel bombinin and bombinin H peptides from the skin secretion of *Bombina orientalis*. *Bioscience Reports*, Vol. 37(5).
- Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R., y Rolff, J. (2016). Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 60(3), págs.1717-1724.

Zavala, J. T., Diaz Sánchez, J. G., Vega, S., Alarcón, C., Ruiz Sánchez, D., y Romero, C. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. Vol. 47, págs. 6-7.

## 11. ANEXOS

### ANEXO A. Cuadros de ajedrez de las mezclas propuestas de PAM + AB.

#### a. Mezclas propuestas de Css54 [15E]<sup>+4</sup>+Ampicilina en *S. aureus* ATCC 25923

Css54 [15E] <sup>+4</sup> A	Ampicilina B				
	$\mu\text{M}$	<b>0.0105</b>	<b>0.0210</b>	<b>0.0420</b>	<b>0.0840</b>
	<b>12.5</b>	12.5/0.0105	12.5/0.0210	12.5/0.0420	12.5/0.0840
	<b>6.25</b>	6.25/0.0105	6.25/0.0210	6.25/0.0420	6.25/0.0840
	<b>3.12</b>	3.12/0.0105	3.12/0.0210	3.12/0.0420	3.12/0.0840
	<b>1.56</b>	1.56/0.0105	1.56/0.0210	1.56/0.0420	1.56/0.0840

#### b. Mezclas propuestas de Css54 [15E]<sup>+4</sup>+Ampicilina en *E. coli* ATCC 25922

Css54 [15E] <sup>+4</sup> A	Ampicilina B				
	$\mu\text{M}$	<b>0.1884</b>	<b>0.4038</b>	<b>0.8347</b>	<b>1.6694</b>
	<b>25</b>	25/0.1884	25/0.4038	25/0.8347	25/1.6694
	<b>12.5</b>	12.5/0.1884	12.5/0.4038	12.5/0.8347	12.5/1.6694
	<b>6.25</b>	6.25/0.1884	6.25/0.4038	6.25/0.8347	6.25/1.6694
	<b>3.12</b>	3.12/0.1884	3.12/0.4038	3.12/0.8347	3.12/1.6694

#### c. Mezclas propuestas de Css54 [14]<sup>+5</sup>+Ampicilina en *S. aureus* ATCC 25923

Css54 [14] <sup>+5</sup> A	Ampicilina B				
	$\mu\text{M}$	<b>0.0105</b>	<b>0.0210</b>	<b>0.0420</b>	<b>0.0840</b>
	<b>6.25</b>	6.25/0.0105	6.25/0.0210	6.25/0.0420	6.25/0.0840
	<b>3.12</b>	3.12/0.0105	3.12/0.0210	3.12/0.0420	3.12/0.0840
	<b>1.56</b>	1.56/0.0105	1.56/0.0210	1.56/0.0420	1.56/0.0840
	<b>0.78</b>	0.78/0.0105	0.78/0.0210	0.78/0.0420	0.78/0.0840

#### d. Mezclas propuestas de Css54 [14]<sup>+5</sup>+Ampicilina en *E. coli* ATCC 25922

Css54 [14] <sup>+5</sup> A	Ampicilina B				
	$\mu\text{M}$	<b>0.1884</b>	<b>0.4038</b>	<b>0.8347</b>	<b>1.6694</b>
	<b>25</b>	25/0.1884	25/0.4038	25/0.8347	25/1.6694
	<b>12.5</b>	12.5/0.1884	12.5/0.4038	12.5/0.8347	12.5/1.6694
	<b>6.25</b>	6.25/0.1884	6.25/0.4038	6.25/0.8347	6.25/1.6694
	<b>3.12</b>	3.12/0.1884	3.12/0.4038	3.12/0.8347	3.12/1.6694

**ANEXO B.** Resultados obtenidos de la evaluación de las mezclas de PAM + AB. Usando la metodología de dilución en medio líquido.

**a. Resultados para C<sub>ss</sub>54 [15E]<sup>+4</sup>+Ampicilina en *E. coli* ATCC 25922**

C <sub>ss</sub> 54 [15E] <sup>+4</sup> A	Ampicilina B				
	μM	0.1884	0.4038	0.8347	1.6694
25	C	C	C	C	C
12.5	C	C	C	C	C
6.25	C	C	C	C	C
3.12	C	C	C	C	C

C: Crecimiento bacteriano

**b. Resultados para C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>+Ampicilina en *S. aureus* ATCC 25923**

C <sub>ss</sub> 54 [14] <sup>+5</sup> A	Ampicilina B				
	μM	0.0105	0.0210	0.0420	0.0840
12.5	C	C	C	C	C
6.25	C	C	C	C	C
3.12	C	C	C	C	C
1.56	C	C	C	C	C

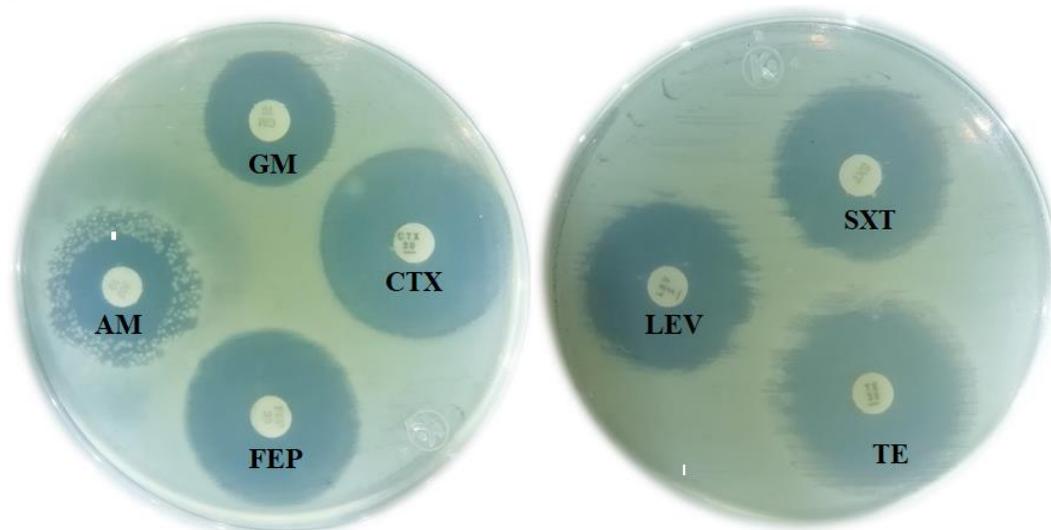
C: Crecimiento bacteriano

**c. Resultados para C<sub>ss</sub>54 [14]<sup>+5</sup>+Ampicilina en *E. coli* ATCC 25922**

C <sub>ss</sub> 54 [14] <sup>+5</sup> A	Ampicilina B				
	μM	0.1884	0.4038	0.8347	1.6694
25	C	C	C	C	C
12.5	C	C	C	C	C
6.25	C	C	C	C	C
3.12	C	C	C	C	C

C: Crecimiento bacteriano

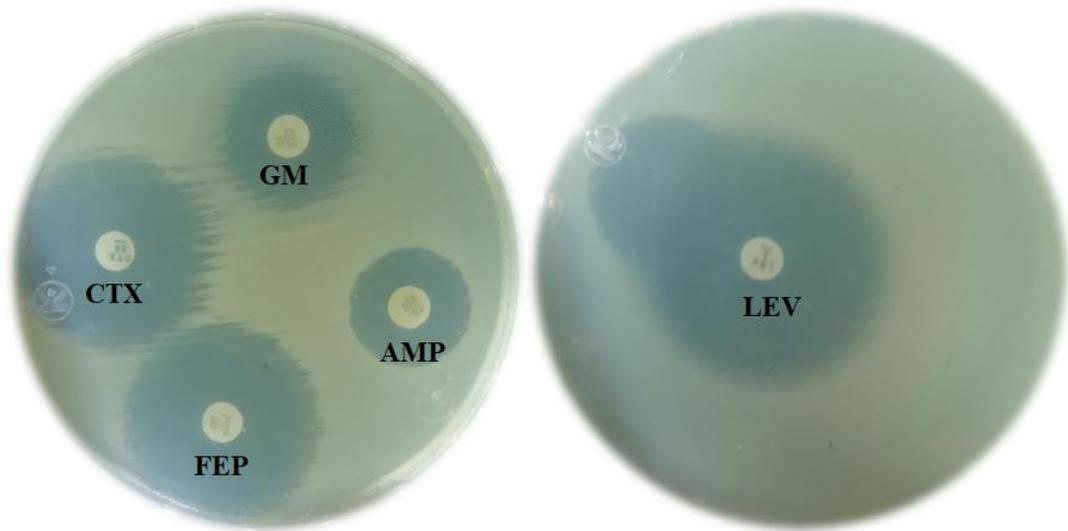
**ANEXO C.** Resultados experimentales de la determinación de susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, de ATCC y de aislados clínicos; a antibióticos comerciales.



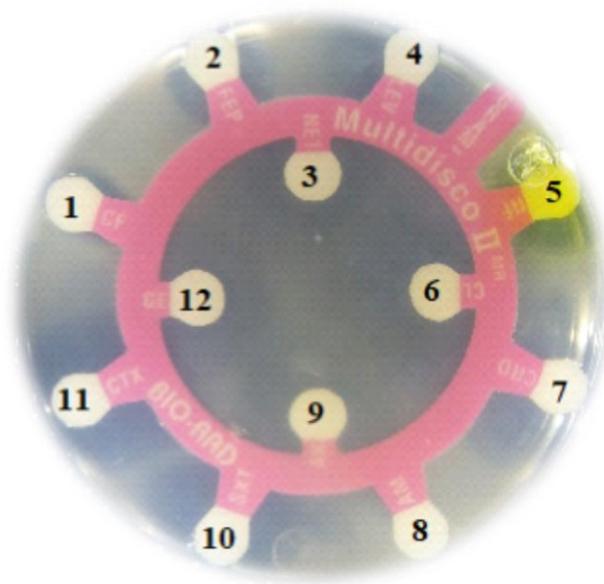
**C.1.** Resultados experimentales de la susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 25923, con unidiscos de antibióticos comerciales: Ampicilina (AM), Cefepime (FEP), Cefotaxima (CTX), Gentamicina (GM), Levofloxacin (LEV), Sulfametoxazol-Trimetoprima (SXT) y Tetraciclina (TE); mediante la técnica de Kirby-Bauer.



**C.2.** Resultados experimentales de la susceptibilidad de *S. aureus* de aislado clínico, con sensidiscos de antibióticos comerciales Bio-rad: 1. Ampicilina (AM), 2. Tetraciclina (TE), 3. Sulfametoxazol-Trimetoprima (SXT), 4. Cefotaxima (CTX), 5. Gentamicina (GE), 6. Cefuroxima (CXM), 7. Cefepime (FEP), 8. Dicloxacilina (DC), 9. Penicilina (PE), 10. Cefalotina (CF), 11. Levofloxacin (LEV) y 12. Eritromicina (E); mediante la técnica de Kirby-Bauer.

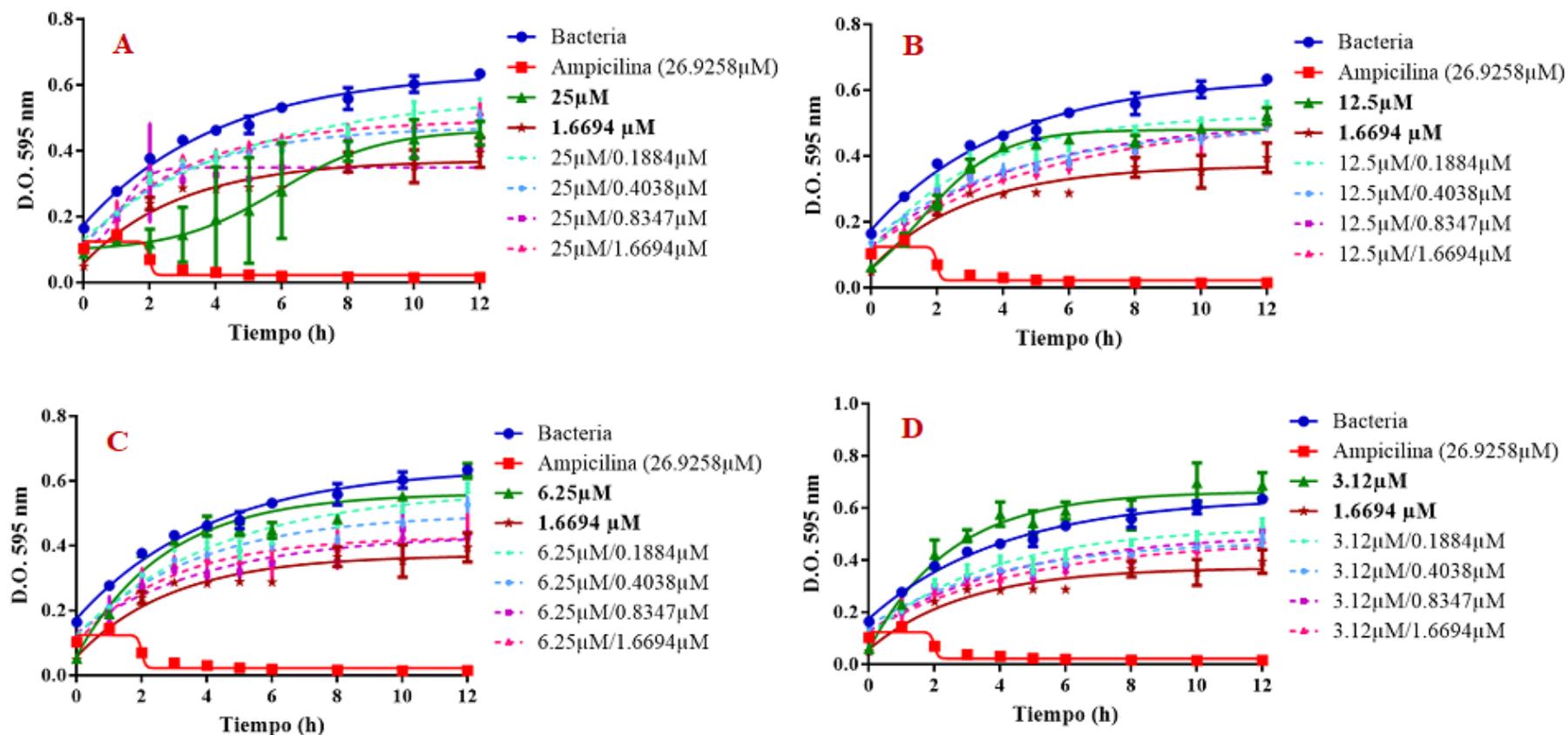


**C.3.** Resultados experimentales de la susceptibilidad de *E. coli* ATCC 25922, con unidiscos de antibióticos comerciales: Ampicilina (AM), Cefepime (FEP), Cefotaxima (CTX), Gentamicina (GM) y Levofloxacin (LEV); mediante la técnica de Kirby-Bauer.

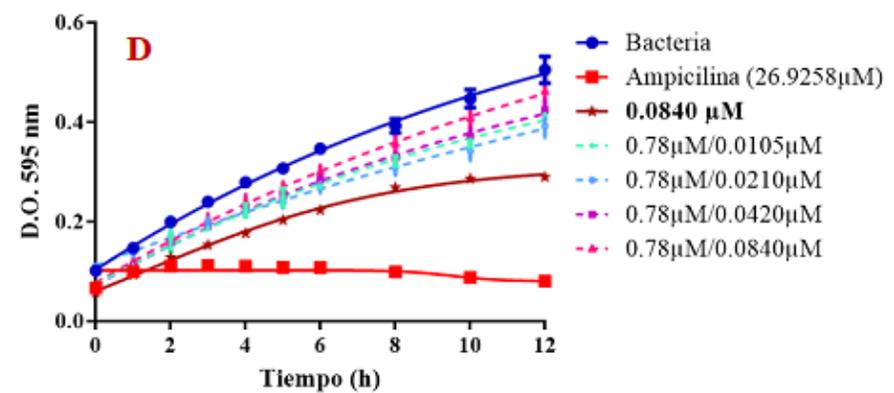
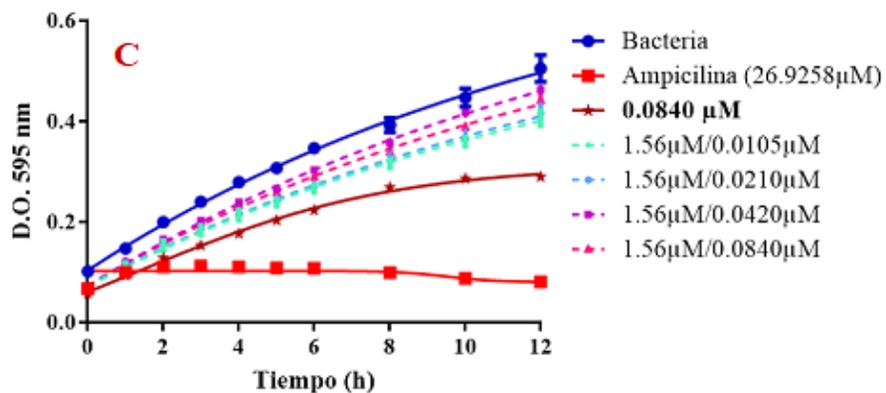
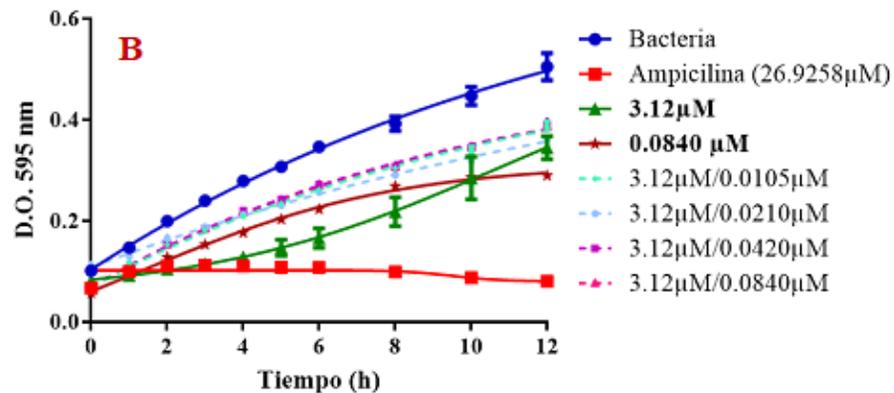
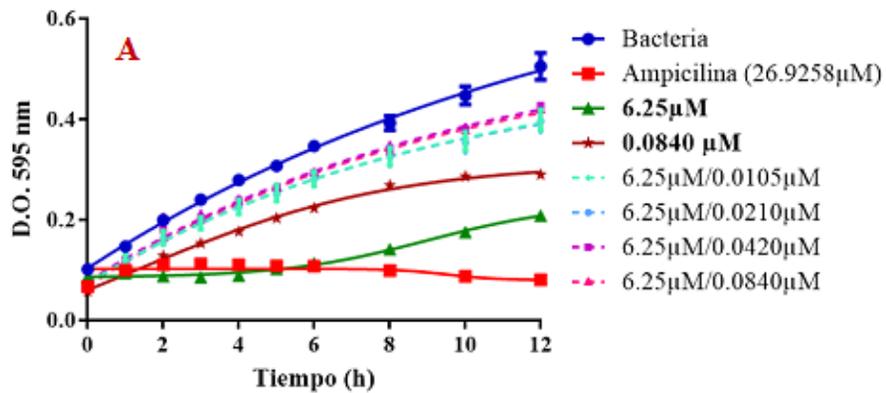


**C.4.** Resultados experimentales de la susceptibilidad de *E. coli* de aislado clínico, con sensidiscos de antibióticos comerciales Bio-rad: 1. Cefalotina (CF), 2. Cefepime (FEP), 3. Netilmicina (NET), 4. Levofloxacin (LEV), 5. Nitrofurantoina (NF), 6. Cloranfenicol (CL), 7. Ceftriaxona (CRO), 8. Ampicilina (AM), 9. Amikacina (AK), 10. Sulfametoxazol-Trimetoprima (SXT), 11. Cefotaxima (CTX) y 12. Gentamicina (GE); mediante la técnica de Kirby-Bauer.

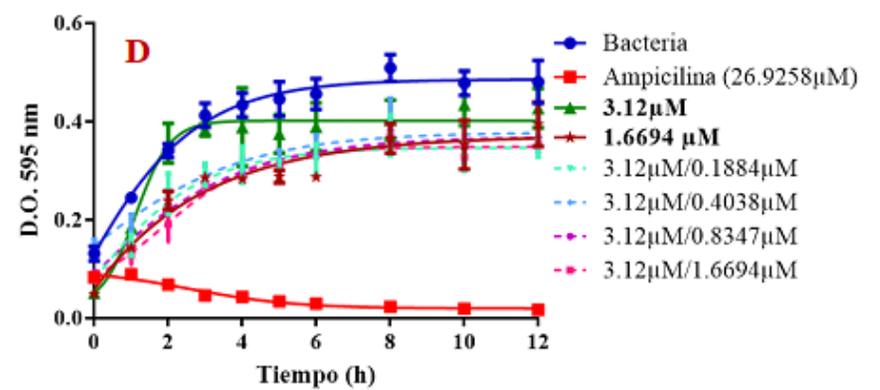
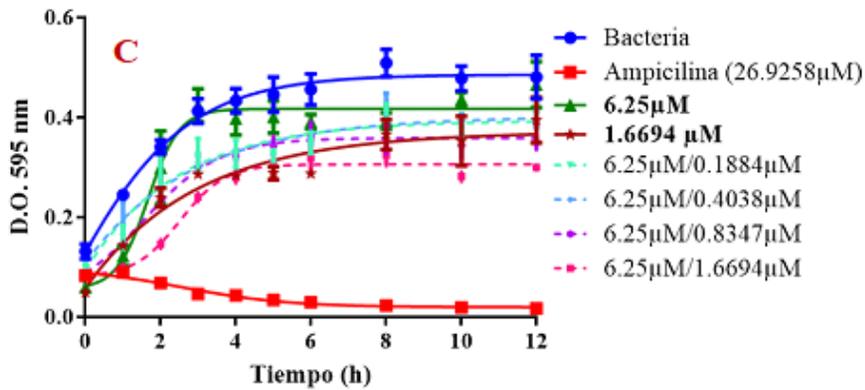
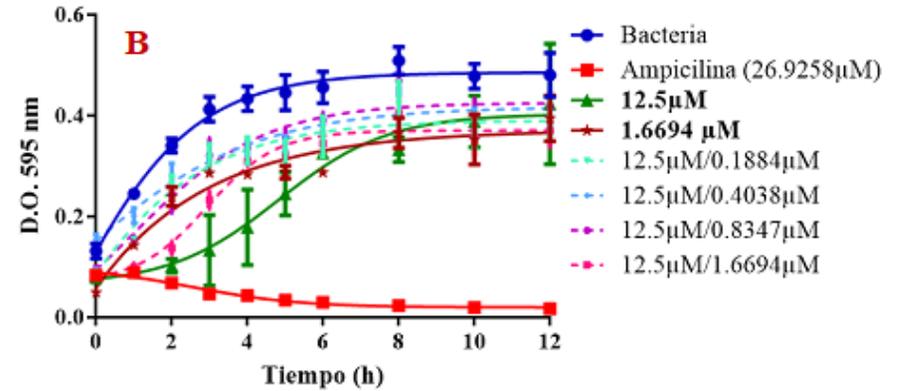
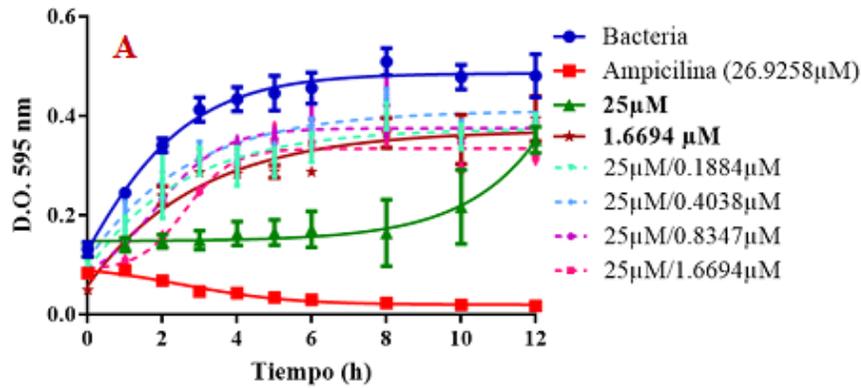
**ANEXO D.** Gráficas de las combinaciones de las diferentes concentraciones de C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> + ampicilina en *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922.



**D.1.** Gráficas de las combinaciones de las diferentes concentraciones de C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> + ampicilina en *E. coli* ATCC 25922. A) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> a una concentración de 25 μM, B) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> a una concentración de 12.5 μM, C) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> a una concentración de 6.25 μM y D) combinaciones C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> a una concentración de 3.12 μM.



**D.2.** Gráficas de las combinaciones de las diferentes concentraciones de Css54[14]<sup>+5</sup> + ampicilina en *S. aureus* ATCC 25922. A) combinaciones de Css54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 6.25 μM, B) combinaciones de Css54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 3.12 μM, C) combinaciones de Css54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 1.56 μM y D) combinaciones Css54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 0.78 μM.



**D.3.** Gráficas de las combinaciones de las diferentes concentraciones de C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> + ampicilina en *E. coli* ATCC 25922. A) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 25 μM, B) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 12.5 μM, C) combinaciones de C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 6.25 μM y D) combinaciones C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup> a una concentración de 3.12 μM.

**ANEXO E.** Tablas de parámetros fisicoquímicos de PAMs que fueron evaluados en combinación con Ampicilina.

**a. Tabla de parámetros fisicoquímicos de péptidos, que tienen efectos sinérgicos en combinación con ampicilina**

Sinérgico											
Péptido	Fuente	Secuencia	No aa	Carga neta	H%	GRAVY	PM	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	BI	PI	Referencia
LFcin 17-30	Bovina	FKCRRWQWRWKMKKL G	16	+7	43	-1.544	2237.76	16500	3.31	11.75	(Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010)
LFampin 265-284	Bovina	DLIWKLLSKAQEKFGKN KSR	20	+4	35	-1.020	2389.83	5500	2.47	10.17	(Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010)
P9	Sintético	YRWARWRR	9	+5	44	-2.244	1435.7	17900	5.66	12	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
Cryptdin-2	Ratón	LRDLVCYCRARGCKGRE RMNGTCRKGHLLYMLC CR	35	+7	42	-0.403	4136.02	3355	2.81	9.61	(Rishi <i>et al.</i> , 2011)
Arenicin-1	Arenicola marina	RWCVYAYVRVRGVLVR YRCW	21	+6	52	-0.071	2760.33	15595	2.61	10.85	(Choi y Lee, 2012)
Magainin II	Hibrido péptidico	KWKLFFKIKFLHSAKKF	17	+8	47	-0.582	2177.75	5500	1.12	10.78	(He <i>et al.</i> , 2015)
VAYR	Sintético	RRGWVLALYLRYGRR	15	+5	40	-0.627	1935.31	8480	3.33	11.83	(He <i>et al.</i> , 2015)
Pleurocidin	Pez	GWGSFFKKAHVVGKHV GKAALTHYL	25	+4	44	-0.068	2711.17	6990	0.2	10.18	(Choi y Lee, 2012)
Bombinina HL	Sintético	LLGPVLGLVSNVLGGLL	17	0	58	1.865	1634.04	0	-2.36	5.52	(Xiang <i>et al.</i> , 2017)
CLP-19	Sintético	CRKPTFRRLKWKIKFKF KC	19	+9	42	-0.968	2514.18	5625	2.99	11.17	(Li <i>et al.</i> , 2017)
CSpK14	Bacillus	HYDPGDDSGNTG	12	-3	0	-1.900	1234.16	1490	3.39	3.93	(Regmi <i>et al.</i> , 2017)
Coprisa	Escarabajo	VTCDVLSFEAKGIAVNH SACALHCIALRKKGGSC QNGVCVCRN-NH <sub>2</sub>	43	+3	51	0.358	4477.25	0	0.96	8.67	(Hwang <i>et al.</i> , 2013)

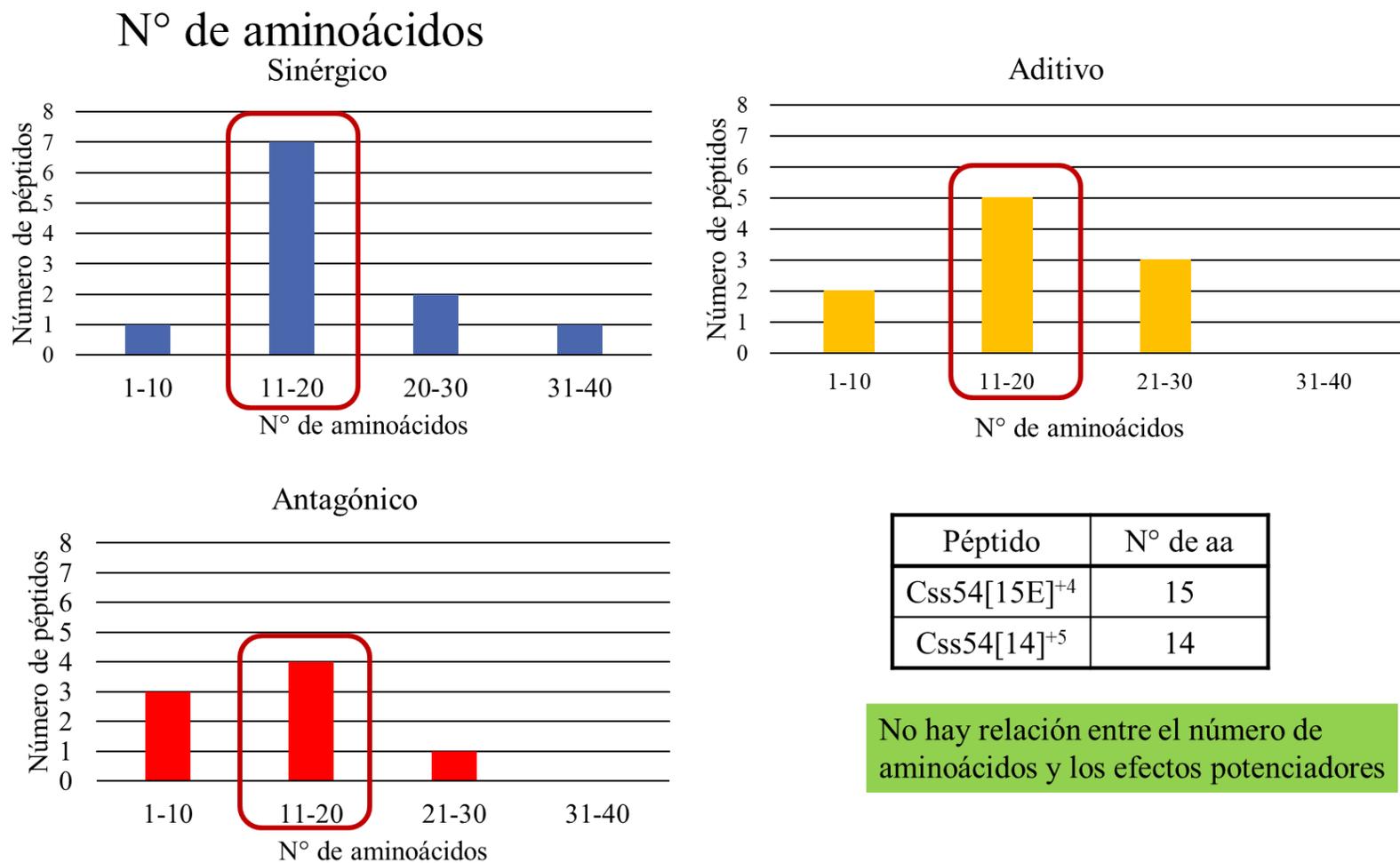
**b. Tabla de parámetros fisicoquímicos de péptidos, que tienen efectos aditivos en combinación con ampicilina**

Aditivo											
Péptido	Fuente	Secuencia	No aa	Carga neta	H%	GRAVY	PM	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	BI	PI	Referencia
Indolicidin	Bovino	ILPWKWPWWPWRR	13	+4	53	-1.069	1907.30	27500	1.06	5.52	(He <i>et al.</i> , 2015)
ARVA	Sintético	RRGWLALRLVLAY	13	+3	61	0.531	1586.95	6990	1.09	11.71	(He <i>et al.</i> , 2015)
Melittin	Aveja	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	26	+6	46	0.273	2847.49	5500	0.57	12.02	(He <i>et al.</i> , 2015)
UP-5	Sintético	NH <sub>2</sub> -RBRBR-COOH	5	+3	40	-1.580	780.93	0	7.76	12.3	(Almaaytah <i>et al.</i> , 2018)
P18	Sintético	NH <sub>2</sub> -PAWFKARRWAWRMLKKA-COOH	18	+7	61	-0.667	2273.78	16500	1.95	12.31	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
P15	Sintético	NH <sub>2</sub> -FK-Bip-RRWQWRMKKLGA-COOH	15	+7	46	-1.187	2114.1	11000	3.08	12.31	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
P12	Sintético	NH <sub>2</sub> -RRWQWRMKKLGA-COOH	12	+6	41	-1.625	1882.4	11100	3.89	12.31	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
P6	Sintético	NH <sub>2</sub> -WRWRWR-CONH <sub>2</sub>	6	+4	50	-2.700	1043.9	16650	6.29	12.3	(Ulvatne <i>et al.</i> , 2001)
BHL-bombina	Rana	GIGGALLSFGKSALKGLAKGLAEHF	25	+2	48	0.556	2442.89	0	-0.53	9.7	(Xiang <i>et al.</i> , 2017)
Pin2	Escorpión	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD	24	+3	50	0.329	2612.11	5500	0.05	10	(García <i>et al.</i> , 2013)

c. Tabla de parámetros fisicoquímicos de péptidos, que tienen efectos antagónicos e combinación con ampicilina

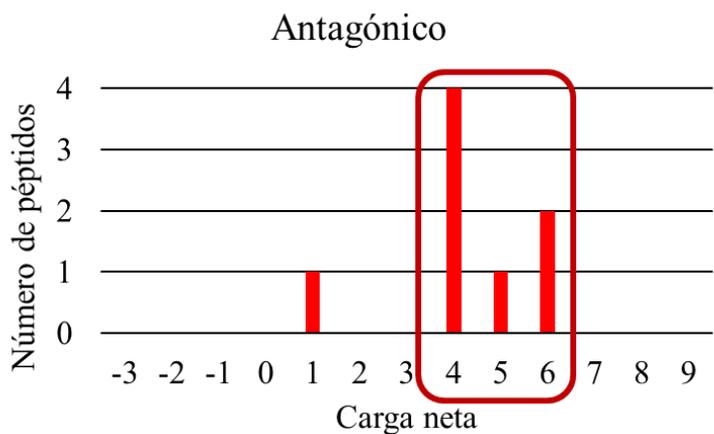
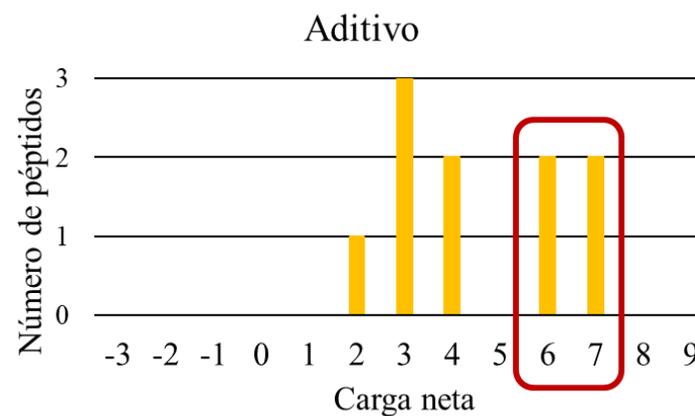
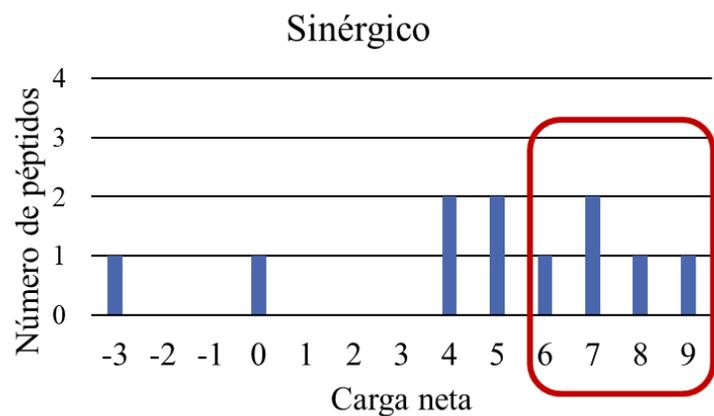
Antagónico											
Péptido	Fuente	Secuencia	No aa	Carga neta	H%	GRAVY	PM	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	BI	PI	Referencia
VVRG	Sintético	WVLVLRLLGY	9	+1	66	1.411	1118.39	6990	-1.22	8.75	(He <i>et al.</i> , 2015)
La 47	Araña	SWKSMAKKLKEYME KLKQRA	20	+6	35	-1.360	2484.02	6990	2.69	10.12	(García <i>et al.</i> , 2013)
MelitAP-27	Sintético	KFKKLFKKLSPVIGA VLKVLT	21	+6	53	0.609	2358.01	0	-0.29	10.70	(Almaaytah <i>et al.</i> , 2016)
CM11	Sintético	WKLFFKILKVL-NH2	11	+4	63	0.582	1415.85	5550	-0.62	10.48	(Amani <i>et al.</i> , 2015)
Esc (1-18)	Sintético	GIFSKLAGKKLKNLLI SG - NH 2	18	+4	44	0.383	1887.32	0	-0.08	10.48	(Marcellini <i>et al.</i> , 2009 )
RR	Sintético	WLRRIKAWLRR	11	+5	54	0.891	1553.9	11100	4	12.48	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)
IK8 “D isoforma”	Sintético	IRIKIRIK	8	+4	50	0.15	1040.28	0	2.65	12.02	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)
KFF (3K)	Sintético	KFFKFFKFFK	10	+4	60	0.12	1413.7	0	0.43	10.48	(Mohamed <i>et al.</i> , 2014)

**ANEXO F.** Comparaciones de los parámetros fisicoquímicos de los PAMs que se han combinado con Ampicilina y han obtenido efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos.



**F.1.** Comparación del número de aminoácidos de los PAMs con efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos; con el número de aminoácidos de los péptidos cortos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>.

## Carga neta

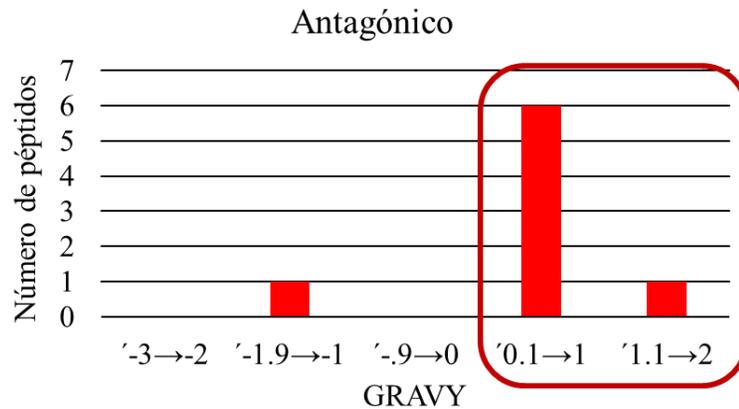
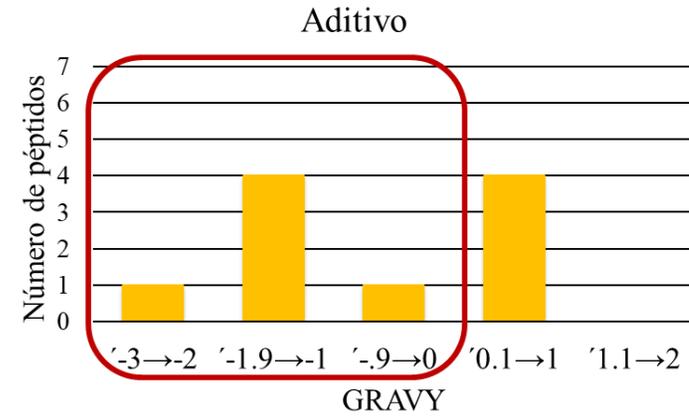
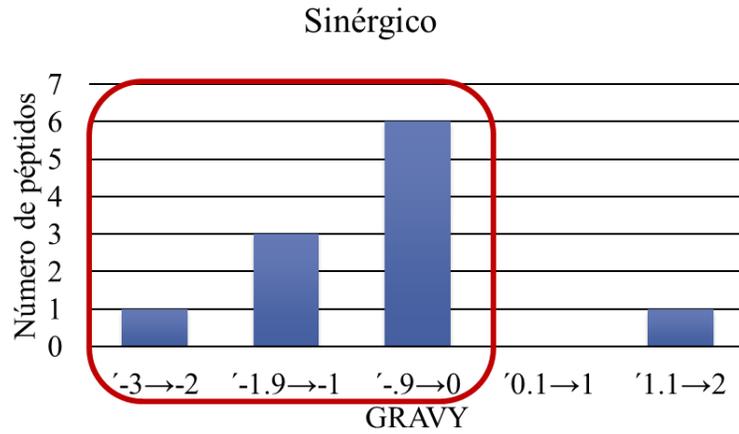


Péptido	Carga neta
Css54[15E] <sup>+4</sup>	+4
Css54[14] <sup>+5</sup>	+5

Las cargas netas son mayores, podría ser un parámetro fisicoquímico responsable de los efectos potenciadores

**F.2.** Comparación de la carga neta de los PAMs con efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos; con la carga neta de los péptidos cortos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>.

# GRAVY

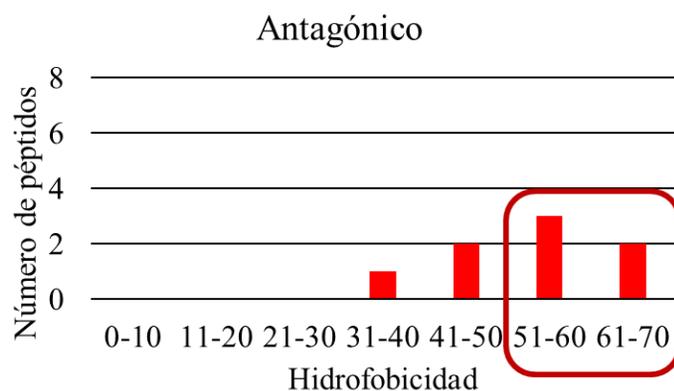
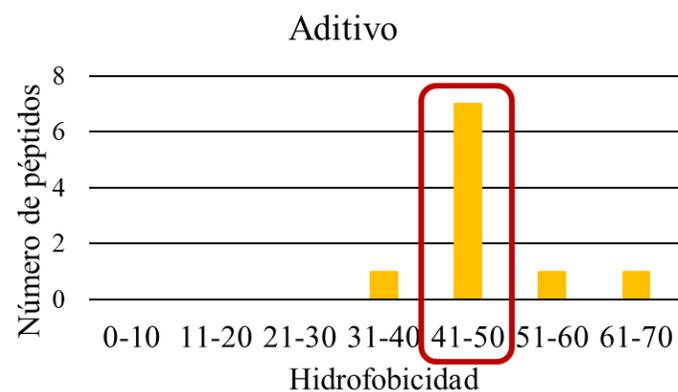
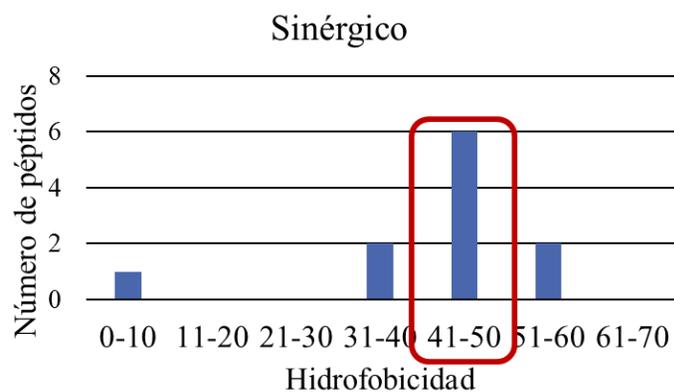


Péptido	GRAVY
Css54[15E] <sup>+4</sup>	0.193
Css54[14] <sup>+5</sup>	0.457

El GRAVY de los péptidos con efectos sinérgico y aditivo, son valores negativos. A menor GRAVY, hidrofiliidad más fuerte.

**F.3.** Comparación del GRAVY de los PAMs con efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos; con el GRAVY de los péptidos cortos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>.

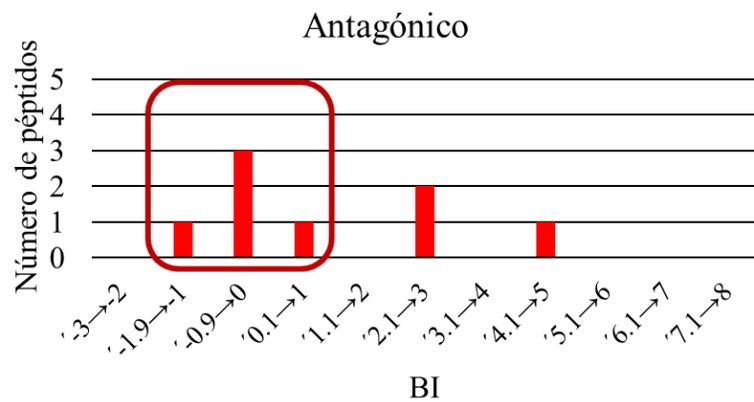
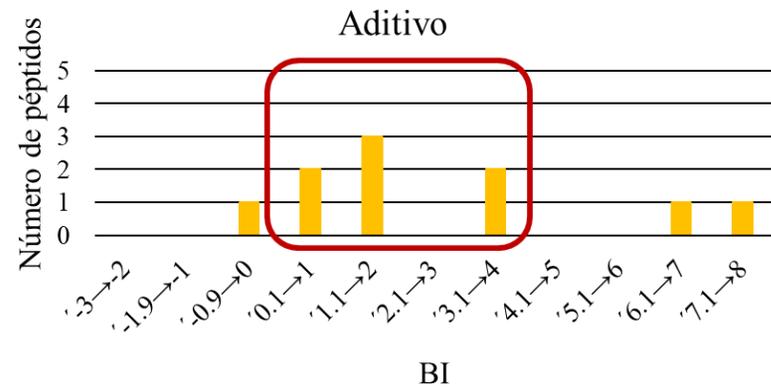
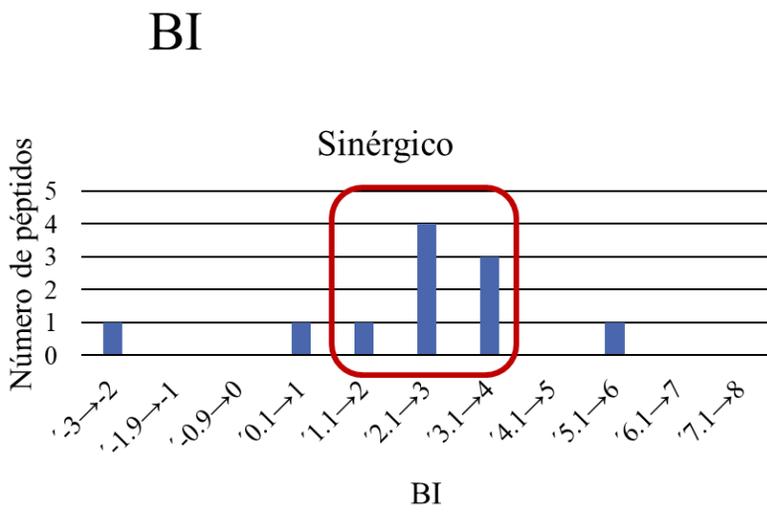
# Hidrofobicidad



Péptido	Hidrofobicidad
Css54[15E] <sup>+4</sup>	60
Css54[14] <sup>+5</sup>	64

La hidrofobicidad de los péptidos con efectos sinérgico y aditivo, son menores; por lo tanto son más hidrofílicos.

F.4. Comparación de la hidrofobicidad de los PAMs con efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos; con la hidrofobicidad de los péptidos cortos C<sub>ss</sub>54[15E]<sup>+4</sup> y C<sub>ss</sub>54[14]<sup>+5</sup>.



Péptido	GRAVY
Css54[15E] <sup>+4</sup>	0.53
Css54[14] <sup>+5</sup>	0.08

El BI de los péptidos con efectos sinérgicos y aditivos, son en su gran mayoría mayores a las BI de nuestras variantes cortas.

**F.5.** Comparación del BI de los PAMs con efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos; con el BI de los péptidos cortos Ccss54[15E]<sup>+4</sup> y Ccss54[14]<sup>+5</sup>.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 7 de Octubre de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete  
Dr. Jesús Silva Sánchez

Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS

Alumno que la presenta a revisión: **JOHANA MARTINEZ PAULA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 de Octubre de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete  
Dr. Jesús Silva Sánchez

Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS

Alumno que la presenta a revisión: **JOHANA MARTINEZ PAULA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 de Octubre de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete  
Dr. Jesús Silva Sánchez

Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS

Alumno que la presenta a revisión: **JOHANA MARTINEZ PAULA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 8 de Octubre de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete  
Dr. Jesús Silva Sánchez

Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS

Alumno que la presenta a revisión: **JOHANA MARTINEZ PAULA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 de Octubre de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete  
Dr. Jesús Silva Sánchez

Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE  
COMBINACIONES DE PÉPTIDOS CORTOS Y ANTIBIÓTICOS

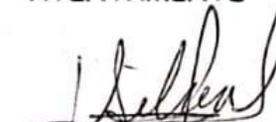
Alumno que la presenta a revisión: **JOHANA MARTINEZ PAULA**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DR. JESÚS SILVA SANCHEZ