

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

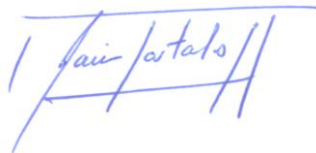
**Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos derivados de la piel de
anfibios ecuatorianos**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología

FRANCIS ANDREA HERRERA ACURIO

Quito, 2023

Yo, Jaime Costales Cordero, PhD, certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de las Srta. Francis Andrea Herrera Acurio ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Jaime Costales Cordero, PhD.

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

Quito, 2023

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar mi trabajo de disertación y a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento y las enseñanzas dadas en transcurso de la Carrera de Microbiología.

A la Mtr, Miryan Rivera Íñiguez, por su apoyo y guía durante todo el proyecto de disertación y por darme la oportunidad de unirme al grupo de investigación del Laboratorio en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA). Igualmente, al Dr. Jaime Costales Cordero por ser el Director de este proyecto, sin su guía este trabajo estaría incompleto.

A Camila Nuñez por su apoyo incondicional durante la elaboración de esta investigación al igual que durante toda la carrera. A Carolina Proaño quien gracias a sus investigaciones previas sobre Dermaseptinas se hizo posible estandarizar un protocolo implementado en esta disertación.

A mi familia por el apoyo incondicional en mi desarrollo a nivel personal y académico, quienes me incentivaron a seguir con lo que me gusta y no me dejaron caer. A mis amigos que hice a lo largo de toda la carrera agradezco por su apoyo y las nuevas experiencias ganadas, a esas diez personas que considero como una segunda familia.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	7
Introducción.....	8
Metodología.....	12
Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	12
Prueba hemolítica.....	14
Análisis de datos	15
Resultados.....	15
Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	15
Concentración Mínima Bactericida (MBC).....	17
Prueba hemolítica.....	17
Discusión	18
Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	18
Prueba hemolítica.....	20
Conclusiones.....	21
Agradecimientos.....	22
Bibliografía.....	22

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Efectos de inhibición de los péptidos	17
Figura 2. Porcentaje de hemólisis de DRS-SP9 en muestra sanguínea de caballo.....	18

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las Dermaseptinas SP5 y SP9	16
Tabla 2. Bioactividad de DRS-SP5 y DRS-SP9 contra bacterias multirresistentes	17
Tabla 3. Actividad bactericida de las DRS-SP5 y DRS-SP9 en <i>E. coli</i>	17
Tabla 4. Porcentaje de hemólisis de DRS-SP9 en muestra sanguínea de caballo	18

TÍTULO

Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos derivados de la piel de anfibios ecuatorianos

Autores

Herrera Francis¹, Costales Jaime A.², Rivera Miryan¹

¹Laboratorio de Investigación en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios, Centro de Investigación para la Salud en América Latina, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador.

²Centro de Investigación para la Salud en América Latina, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador

Resumen

Las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes representan un grave problema de salud pública en todo el mundo. Entre las bacterias que producen estas infecciones se encuentran *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (C-ORSA), *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC) y *Serratia marcescens*. La resistencia de estas bacterias a los antibióticos existentes evidencia la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son un conjunto de biomoléculas con alto potencial debido a sus mecanismos de acción contra bacterias. En este artículo se evaluó la efectividad de los péptidos Dermaseptina SP5 y SP9 derivados de la piel de *Agalychnis spurrelli* frente a aislados clínicos de las bacterias resistentes antes mencionadas. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de estos péptidos. Además, se realizó una prueba hemolítica para determinar el

27 grado de hemólisis de cada uno de los péptidos. Los resultados mostraron que los
28 péptidos no tuvieron efecto inhibitorio en *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*.
29 Sin embargo, se observó un efecto inhibitorio en *E. coli*, con una dependencia de la
30 concentración de los péptidos. Los resultados sugieren que la resistencia observada
31 puede deberse a estrategias desarrolladas por las bacterias para evitar la actividad de los
32 AMPs. También se evaluó el grado de hemólisis de Dermaseptina SP9, demostrando su
33 capacidad para no dañar las membranas celulares. En general, se concluyó que las
34 Dermaseptinas SP5 y SP9 tienen potencial como agentes antimicrobianos, pero se
35 necesita más investigación para comprender sus mecanismos de acción y efectividad
36 contra una amplia gama de bacterias resistentes.

37 **Introducción**

38
39 Las infecciones causadas por microorganismos como bacterias, hongos, parásitos,
40 entre otros, representan un grave problema de salud pública para todo el mundo (1). Hoy
41 en día, se ha visto que los patógenos han ido adquiriendo resistencia a los antibióticos
42 que son usados como procedimiento contra estas infecciones. De hecho, muchas
43 bacterias son multirresistentes (2). Dentro del grupo de bacterias multirresistentes están:
44 *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (C-ORSA), *Escherichia coli* productora
45 de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* productora de
46 carbapenemasa (KPC) y *Serratia marcescens*.

47 En primer lugar, *Staphylococcus aureus* es la principal especie patógena de su
48 género y puede causar infecciones tanto en entornos hospitalarios como en la
49 comunidad. Esta bacteria se puede identificar fácilmente mediante pruebas de
50 coagulasa, por su actividad fosfatasa alcalina, entre otras. Esta bacteria ha desarrollado

51 resistencia a ciertos antibióticos de la familia de las penicilinas entre las que están la
52 meticilina y oxacilina (3). Esta resistencia se atribuye a la producción de proteínas
53 fijadoras de penicilina²-a (PLP 2^a), estas se unen a los antibióticos de la familia y evita
54 que estos actúen sobre la bacteria (4). Por otro lado, se han descrito tres mecanismos de
55 resistencia en *S. aureus* y uno de ellos es la producción de β -lactamasas que generan
56 esta resistencia a la oxacilina (C-ORSA).

57 Por otra parte, *Escherichia coli*, es considerada como el agente más frecuente de
58 infecciones del tracto urinario y de la meningitis neonatal (5). Esta bacteria ha
59 desarrollado resistencia a los antibióticos debido a la producción de betalactamasas de
60 espectro extendido (BLEE), enzimas que pueden hidrolizar a los antibióticos de la
61 familia de las cefalosporinas, evitando así su efectividad contra la bacteria (6). Debido
62 a su alta prevalencia y su importancia en la salud pública es crucial abordar la
63 prevención y el manejo de las infecciones causadas por *E. coli* (7).

64 Otra de las bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos es
65 *Klebsiella pneumoniae*. Es importante mencionar que la diseminación de esta especie
66 bacteriana productora de carbapenemasa (KPC) se ha convertido en punto de interés
67 clínico debido a los graves problemas que causa en el tratamiento de infecciones (8).
68 Las KPC son enzimas que se han identificado como la principal causa de la actividad
69 contra un amplio espectro de β -lactámicos (9). Para hacer frente al desafío de controlar
70 la propagación de KPC, se recomienda enfocarse en la prevención y el manejo de
71 infecciones en los hospitales, así como en el desarrollo de nuevos antibióticos y terapias
72 alternativas (10).

73 Finalmente, *Serratia marcescens* se considera la especie patógena humana con
74 mayor prevalencia debido a su alta incidencia de cepas multirresistentes (11). La

75 virulencia de esta bacteria está relacionada con la capacidad de crecimiento y de
76 supervivencia que esta posee fuera del huésped. Además, *S. marcescens* presenta un alto
77 nivel de resistencia adquirida a ciertos antibióticos y agentes antisépticos, lo que le
78 permite persistir en ambientes hospitalarios y causar infecciones nosocomiales (12). Un
79 estudio publicado por Melgarejo (2022), reveló la resistencia de *S. marcescens* a
80 colistina, un antibiótico usado como último recurso en el tratamiento de infecciones
81 causadas por bacterias multirresistentes (13).

82 En la actualidad, las farmacéuticas no están invirtiendo en la creación de nuevos
83 fármacos destinados a controlar infecciones causadas por bacterias multirresistentes
84 (14). Esta falta de inversión ha llevado a una situación crítica que obliga a priorizar la
85 búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y el tratamiento efectivo de estas
86 infecciones. Unos excelentes candidatos son los péptidos antimicrobianos (AMPs, por
87 su siglas en inglés), un conjunto de biomoléculas con alto potencial de uso clínico.
88 Gracias a sus mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y baja probabilidad
89 de generación de resistencia (15), estos péptidos presentan una capacidad inhibidora
90 significativa contra bacterias, hongos, parásitos y virus.

91 Los AMPs se encuentran en una gran variedad de seres vivos. Entre ellos, llaman
92 la atención los producidos en las glándulas granulares de la piel de anfibios, pues al ser
93 parte de su inmunidad innata, son capaces de combatir agentes patógenos (16). En el
94 Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) del
95 Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) de la Pontificia
96 Universidad Católica del Ecuador (PUCE), se han descrito varios péptidos
97 antimicrobianos entre los que se destacan las Dermaseptinas extraídas de la piel de
98 *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). Estas Dermaseptinas han demostrado ser

99 eficientes en el control de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*
100 (17,18).

101 Una de las ventajas del uso de AMPs es que suelen generar menos resistencia
102 bacteriana en comparación con los antibióticos, debido a que atacan a las bacterias
103 mediante múltiples mecanismos de acción. Además, estos péptidos son menos tóxicos
104 para las células humanas, lo que los convierte en una alternativa recomendable (19).

105 Las Dermaseptinas son un grupo de péptidos antimicrobianos de cadena corta,
106 constituidas por 22 a 28 aminoácidos (20). Son catiónicos, es decir, están cargados
107 positivamente y son anfipáticos en disolventes apolares. Por otra parte, poseen una
108 estructura secundaria en forma de α -hélice (21).

109 Como lo mencionan Huan y colaboradores (2020), los AMPs tienen mecanismos
110 de acción que les permiten actuar como bactericidas o bacteriostáticos. Estos
111 mecanismos se inician por la interacción electrostática entre el péptido antimicrobiano,
112 cargado positivamente, y la membrana de los patógenos, cargada negativamente. Por
113 consiguiente, se han propuesto tres modelos que pretenden explicar los posibles
114 mecanismos de acción de los AMPs: a) el modelo de alfombra, que se basa en la
115 acumulación de AMPs sobre la superficie de la membrana celular para destruirla, similar
116 a un efecto de “detergente”; b) el modelo de duela de barril, en el cual los AMPs se
117 agregan entre sí para insertarse en la bicapa de la membrana celular, formando
118 multímeros con una organización en paralelo a los fosfolípidos para, luego, formar un
119 canal; y c) el modelo de poro toroidal, en que los AMPs se incrustan verticalmente en
120 la membrana celular para, luego, doblarse y formar un orificio circular. En resumen,
121 péptidos como las Dermaseptinas terminan formando verdaderos poros en la membrana
122 bacteriana, lo que provoca una verdadera lisis celular, causada por la interacción de estos

123 péptidos catiónicos con la membrana bacteriana, tal como lo mencionan Cuesta et al.
124 (2019).

125 En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo aportar datos que demuestren la
126 actividad bactericida y/o bacteriostática de dos nuevos péptidos como las Dermaseptinas
127 SP5 y SP9 sobre bacterias multirresistentes de interés en la salud pública, como son
128 *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (C-ORSA), *Escherichia coli* productora
129 de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* productora de
130 carbapenemasa (KPC) y *Serratia marcescens*. Es importante mencionar que esta
131 investigación pretende proporcionar una posible solución al problema de resistencia
132 bacteriana, al utilizar como alternativa los péptidos antimicrobianos obtenidos de las
133 secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli*, como las Dermaseptinas SP5 y SP9,
134 capaces de inhibir el crecimiento de aislados bacterianos resistentes a los antibióticos
135 de uso terapéutico (23). Además, evaluar el nivel de hemólisis que estos péptidos tienen
136 sobre los eritrocitos de mamíferos.

137 **Metodología**

138 **Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

139

140 La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en
141 inglés) de los péptidos sintéticos Dermaseptinas SP5 y SP9, obtenidos de la piel de
142 *Agalychnis spurrelli* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (C-ORSA),
143 *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE),
144 *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC y *Serratia marcescens*, se realizó aplicando
145 el protocolo descrito previamente por Proaño-Bolaños et al. (2016).

146 En primer lugar, se reactivaron los aislados microbianos con el fin de obtener
147 microorganismos viables sin modificaciones morfológicas ni fisiológicas; esto un día
148 previo a la realización del ensayo. Posteriormente, se inoculó de 20 a 30 µl de la bacteria
149 stock en 25 ml de Agar Müller-Hinton (MHB) y se incubó a una temperatura de 37 °C
150 durante la preparación del material.

151 Se prepararon diluciones seriadas de los péptidos sintéticos Dermaseptinas SP5 y
152 SP9, disolviendo 1,5 mg en 30 µl de DMSO para obtener concentraciones de 512, 256,
153 128, 64, 32, 16, 4, 2 y 1 mg/L en tubos eppendorf. Después de cada dilución, se realizó
154 una mezcla vigorosa mediante vortex y un breve spin. Ya con las diluciones seriadas
155 listas, se midió la absorbancia de la bacteria stock buscando un valor de 0,5 en la escala
156 de McFarland. Una vez obtenida la absorbancia deseada, se diluyeron 200 µl de la
157 bacteria en 19,8 ml de MHB en una placa Petri de vidrio previamente autoclavada.

158 A continuación, se añadieron 2 µl de cada dilución del péptido en una placa estéril
159 de poliestireno para microtitulación, con tapa, de 96 pocillos con el fondo plano,
160 realizando siete repeticiones para cada dilución. Con el objetivo de garantizar la
161 reproducibilidad, se realizaron tres placas por ensayo. Posteriormente, se agregaron 198
162 µl de la bacteria diluida en cada pocillo, obteniendo un volumen final de 200 µl. Para
163 asegurar la precisión de los resultados, se incluyeron dos controles. El control positivo
164 consistió en 2 µl de DMSO en lugar del péptido y 198 µl de la bacteria, mientras que el
165 control negativo consistió en 200 µl de MHB. Finalmente, se incubaron las placas a 37
166 °C y se procedió a su lectura al día siguiente para su análisis.

167 Por separado, se tomaron 100 µl de la bacteria diluida y se agregaron a 900 µl de
168 Solución Salina Amortiguadora (PBS) autoclavada en tubos eppendorf con el fin de
169 obtener seis diluciones seriadas. Luego, se dividió una placa Petri con MHB en seis
170 partes iguales y se colocaron tres gotas de las diluciones anteriores en cada una de las

171 divisiones correspondientes a las seis diluciones seriadas. Este paso se realizó con el fin
172 de verificar si el aislado bacteriano se encontraba en su fase de crecimiento exponencial.

173 Para la lectura de placas, se utilizó un lector de placas (BioTek) ajustando a una
174 longitud de onda de 560 nm, lo que permitió obtener los valores de absorbancia de cada
175 pocillo. Además, para determinar si la actividad de los péptidos es bactericida o
176 bacteriostática se prepararon las cajas Petri necesarias con medio MHB y se dividieron
177 en cuatro secciones horizontales. En cada sección se sembraron los cultivos bacterianos
178 con los que se determinó el MIC y se añadió 5 µl de las diferentes concentraciones del
179 péptido; se usó una Micropipeta Multicanal para realizar las siete repeticiones de cada
180 concentración.

181 **Prueba hemolítica**

182

183 Para la determinación del grado hemolítico de cada uno de los péptidos sintéticos
184 de interés, se realizó una prueba hemolítica usando como protocolo el descrito por
185 Proaño-Bolaños y colaboradores (2016). Se preparó una suspensión de sangre de caballo
186 al 2% en PBS. Se probaron las mismas concentraciones usadas en la obtención del MIC,
187 siendo la más alta 512 mg/L y la más baja 1 mg/L.

188 En tubos cónicos, se combinaron 200 µl de la suspensión de sangre con 200 µl de
189 cada péptido diluido, y se incubaron a 37 °C durante dos horas. Posteriormente, las
190 muestras se centrifugaron a 1000 (920) rpm durante cinco minutos, se descartó el
191 sobrenadante y se realizaron tres lavados con 5 ml de PBS hasta obtener un sobrenadante
192 completamente limpio. Posterior al lavado, se preparó una solución al 5% mezclando 1
193 ml de glóbulos rojos (RBC) con 19 ml de PBS, obteniendo así 50 ml de solución.

194 A continuación, se añadirán 200 µl de las diluciones seriadas de cada péptido junto
195 con 200 µl de la solución de RBC al 5%. Se utilizaron 200 µl de la solución de RBC al

196 5% con 195 µl de PBS y 5 µl de Triton X-100 como control positivo, y se realizaron
197 por quintuplicado. Para el control negativo, se agregaron 200 µl de la solución de RBC
198 al 5% más 200 µl de PBS, también en quintuplicado y se incubó por dos horas a 37 °C.

199 Después de la incubación adicional, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante
200 cinco minutos. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a una placa estéril de
201 poliestireno para microtitulación, con tapa, de 96 pocillos con el fondo plano y se
202 procedió a medir la lisis de glóbulos rojos utilizando un lector de absorbancia (BioTek)
203 a una longitud de onda de 570 nm.

204 **Análisis de datos**

205

206 Los valores obtenidos en la lectura de la MIC serán usados para realizar curvas
207 mediante la prueba Kruskal Wallis (24). Por otro lado, los valores obtenidos del lector
208 de absorbancia (BioTek) se usarán para el cálculo del porcentaje de hemólisis de cada
209 ensayo, usando la fórmula descrita en el protocolo de Proaño-Bolaños et al. (2016)

$$210 \quad \%hemólisis = \frac{(A - AO)}{(AX - AO)} \times 100$$

211 Donde A es la densidad óptica de la solución peptídica, AO es la lectura del
212 control negativo y AX la lectura del control positivo.

213 **Resultados**

214 **Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

215 Para los ensayos se utilizaron dos péptidos sintéticos, Dermaseptina SP5 y SP9
216 (Tabla 1), obtenidos a partir de secreciones cutáneas de anfibios ecuatorianos frente a
217 cuatro bacterias multirresistentes de interés clínico. Dentro del grupo de bacterias
218 multirresistentes están: *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (C-ORSA),

219 *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE),
 220 *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC) y *Serratia marcescens*.

221 **Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las Dermaseptinas SP5 y SP9**

222	Parámetros	DRS-SP5	DRS-SP9
223	Longitud	27 aa	28 aa
	Peso molecular	2668,07	2999,53

224 Los resultados expuestos en la Figura 1 y Tabla 2 revelan un efecto inhibitorio de las
 225 Dermaseptinas SP5 y SP9 sobre *Escherichia coli* (Figura 1 B y D). Esté efecto
 226 inhibitorio está presente en las concentraciones 256 mg/L y 128 mg/L respectivamente.
 227 Sin embargo, se observó una ausencia de actividad inhibitoria de ambos péptidos sobre
 228 *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*.



240 **Figura 1. Efectos de inhibición de los péptidos** contra (A) DRS-SP5 sobre 88 C-
 241 ORSA, (B) DRS-SP5 sobre *E. coli* BLEE, (C) DRS-SP9 sobre 88 C-ORSA, (D) DRS-
 242 SP9 sobre *E. coli* BLEE, (E) DRS-SP9 sobre KPC y (F) DRS-SP9 sobre *S.*
 243 *marcescens*.

244 **Tabla 2. Bioactividad de DRS-SP5 y DRS-SP9 contra bacterias multirresistentes**

Péptido	Microorganismo	Bioactividad
DRS-SP5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nula
	<i>Escherichia coli</i>	256 mg/L
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nula
	<i>Serratia marcescens</i>	Nula
DRS-SP9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nula
	<i>Escherichia coli</i>	128 mg/L
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nula
	<i>Serratia marcescens</i>	Nula

245 **Concentración Mínima Bactericida (MBC)**

246

247 Los resultados de la Tabla 3 muestran que, además de exhibir un efecto inhibitorio
 248 sobre *Escherichia coli*, las Dermaseptinas SP5 y SP9 poseen una actividad bactericida
 249 desde las 24 horas de incubación.

250 **Tabla 3. Actividad bactericida de las DRS-SP5 y DRS-SP9 en *E. coli***

Péptido	Microorganismo	Actividad Bactericida
DRS-SP5	<i>Escherichia coli</i>	Presente
DRS-SP9	<i>Escherichia coli</i>	Presente

251
252
253

254 **Prueba hemolítica**

255

256 En el presente estudio, se examinó el porcentaje de hemólisis de péptidos
 257 sintéticos extraídos de *Agalychnis spurrelli* en una muestra de sangre de caballo. Como
 258 se puede observar en la Figura 2 y Tabla 3, los valores obtenidos para el porcentaje de
 259 hemólisis del péptido DRS SP-9 demuestran una baja o nula actividad de lisis de
 260 glóbulos rojos en las diferentes concentraciones.

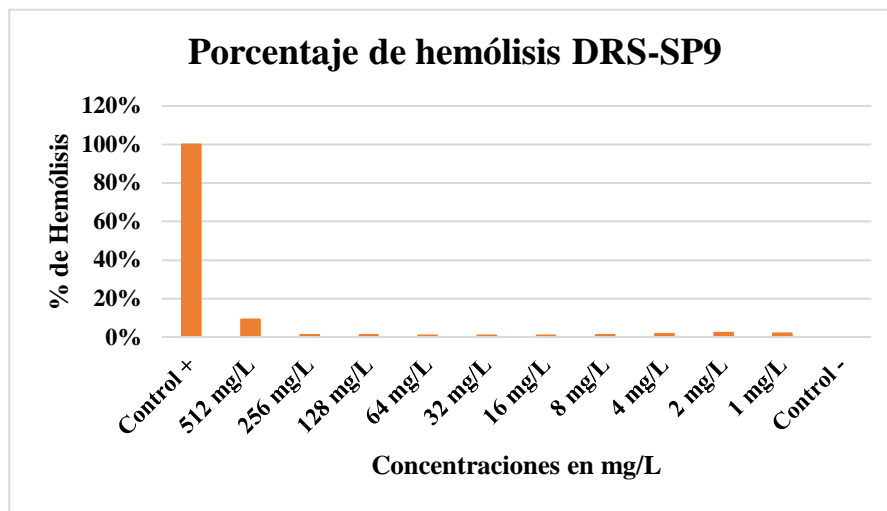


Figura 2. Porcentaje de hemólisis de DRS-SP9 en muestra sanguínea de caballo

Tabla 4. Porcentaje de hemólisis de DRS-SP9 en muestra sanguínea de caballo

Control +	512 mg/L	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	Control -
100%	9,1%	1,1%	1,2%	1%	1%	1%	1,2%	1,5%	2,1%	2%	0%

Discusión

Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se la define como la concentración más baja de un agente microbiano que presenta la capacidad de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de un período de incubación adecuado (25).

Tal como se puede constatar en la Figura 1 y Tabla 2, en las que se demuestra el efecto inhibitorio de las Dermaseptinas SP5 y SP9, sobre la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, se observa una inhibición en concentraciones específicas: 256 mg/L y 128 mg/L, respectivamente. Estos péptidos a estas MIC demostraron ser bactericidas (Tabla 3) mas no bacteriostáticos, lo que demuestra que son péptidos sumamente eficientes.

Como lo mencionan Bartels et al. (2019), las Dermaseptinas son capaces de perforar la membrana bacteriana por lo que se puede deducir que el mecanismo de

282 acción de estos péptidos sobre *E. coli* fue la lisis bacteriana. Cabe destacar que el efecto
283 inhibitorio está directamente relacionado con las concentraciones de los péptidos, ya
284 que se necesita una concentración mínima de AMPs para que se ejecuten los
285 mecanismos de acción que provocará esta lisis de la célula bacteriana (27). Por lo que,
286 se puede deducir que a concentraciones inadecuadas de AMPs, la actividad sobre las
287 bacterias se verá afectada completamente, resultando en la ausencia significativa del
288 efecto antimicrobiano del péptido analizado.

289 Pese a ser bacterias Gram negativas al igual que *E. coli*, en el caso de *Klebsiella*
290 *pneumoniae* y *Serratia marcescens* no se observó ningún efecto inhibitorio de los
291 péptidos en estudio (Tabla 2). Esta falta de actividad de las Dermaseptinas SP5 y SP9
292 sobre *Klebsiella pneumoniae* puede explicarse con el hecho de que esta especie cuenta
293 con una cápsula de polisacáridos más gruesa lo que se considera como el factor de
294 virulencia más importante que esta especie bacteriana posee, esta característica le otorga
295 una mejor impermeabilidad frente a diferentes proteínas, incluyendo a los AMPs.
296 Finalmente, al ser una cápsula mucosa aporta cierta dificultad en el acceso del péptido
297 antimicrobiano hacia la membrana externa (28,29).

298 *Serratia marcescens*, especie bacteriana sobre la que tampoco actuaron los
299 péptidos, es necesario tomar en cuenta que la membrana de esta presenta una baja
300 permeabilidad lo que la protege de diferentes estímulos estresantes externos como los
301 compuestos antimicrobianos (30). Por otra lado, *S. marcescens* posee como factor de
302 virulencia la secreción de múltiples enzimas hidrolíticas con roles importantes en la
303 virulencia de la bacteria (31). Entre ellas se pueden encontrar varias proteasas las cuales
304 son capaces de romper los enlaces peptídicos de los AMPs lo que puede recaer en una
305 pérdida de actividad antimicrobiana por parte de las Dermaseptinas SP5 y SP9 sobre
306 *Serratia marcescens* (32)

307 En el caso de *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram positiva, se observó una
308 ausencia de actividad inhibitoria con respecto a las Dermaseptinas SP5 y SP9 (Tabla 2),
309 al igual que en *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. Según Yeaman y Yount (2003), esta
310 falta de actividad inhibitoria puede atribuirse a la ausencia de una membrana externa, lo
311 que podría estar disminuyendo la superficie de interacción electrostática entre los
312 péptidos y la bacteria. Por otra parte, la ausencia de inhibición de *S. aureus* por las
313 Dermaseptinas SP5 y SP9 puede ser justificada por la sensibilidad que presentan los
314 péptidos antimicrobianos a la digestión por proteasas, enzimas secretadas por esta
315 bacteria, que al igual que *S. marcescens* estas proteasas extracelulares constituyen un
316 factor de virulencia (33,34).

317 **Prueba hemolítica**

318 En este estudio se evaluó el grado hemolítico de las Dermaseptinas SP5 y SP9 en
319 una muestra de sangre de caballo, con el objetivo de proporcionar nuevas alternativas
320 para el tratamiento de infecciones bacterianas que son de interés clínico y se pudo
321 constatar que estos dos péptidos antimicrobianos presentan un bajo porcentaje de
322 hemólisis a las concentraciones en las que son capaces de inhibir el crecimiento
323 bacteriano (Figura 2) (Tabla 4).

324 Es de suma importancia que cualquier sustancia terapéutica cause la menor
325 actividad hemolítica posible, es decir, una mínima lisis de la membrana de los eritrocitos
326 que pueda dar lugar a la liberación de hemoglobina y causar anemia en el paciente (35).
327 Esta relevancia se centra en garantizar la seguridad del paciente, mantener la efectividad
328 del tratamiento y prevenir posibles efectos adversos.

329 **Conclusiones**

- 330 • Las Dermaseptina SP5 y SP9 muestran actividad inhibitoria en concentraciones de
331 256 mg/L y 128 mg/L, respectivamente, contra la bacteria Gram negativa *E. coli*
332 (Tabla 2).
- 333 • Estas Dermaseptinas son bactericidas a las MIC que lograron determinarse, ya que
334 causan la lisis bacteriana (Tabla 3).
- 335 • Las bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, no son
336 sensibles a las Dermaseptinas SP5 y SP9, pues estos péptidos son incapaces de
337 inhibir su crecimiento (Tabla 2).
- 338 • *Klebsiella pneumoniae* presenta una cápsula de polisacáridos más gruesa que le
339 confiere mayor impermeabilidad a los péptidos antimicrobianos, dificultando su
340 acceso a la membrana bacteriana.
- 341 • *Serratia marcescens* tiene una baja permeabilidad y secreta enzimas hidrolíticas
342 que pueden afectar la actividad antimicrobiana de las Dermaseptinas SP5 y SP9.
- 343 • *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram positivo, no tuvo actividad inhibitoria de las
344 Dermaseptinas SP5 y SP9. Esto puede atribuirse a la falta de una membrana externa
345 en la bacteria, así como a la sensibilidad de los péptidos antimicrobianos a la
346 digestión por proteasas secretadas por la bacteria.
- 347 • Las Dermaseptinas no tienen actividad hemolítica a concentraciones iguales o
348 inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) (Tabla 4).
- 349 • En definitiva, se puede concluir que las Dermaseptinas SP5 y SP9, poseen
350 características relevantes que los convierten en potenciales principios activos en la
351 formulación de productos farmacéuticos alternativos contra *Escherichia coli*
352 multirresistente.

353 **Agradecimientos**

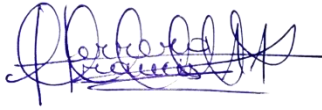
354 Agradezco a Camila Nuñez y Mateo Salazar por su colaboración y apoyo durante todo
355 el proyecto de investigación. A la Mtr. Miryan Rivera por brindar la oportunidad de
356 trabajar en el Laboratorio de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) del
357 Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL). El permitir utilizar
358 sus instalaciones y recursos fue fundamental para la obtención de resultados. A la
359 Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento y respaldo durante
360 toda la carrera de Microbiología.

361 **Bibliografía**

- 362 1. Bonilla Jiménez S, Navarrete MA, Valdivieso Rivera F, Morán Marcillo G, Proaño
363 Bolaños C. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA
364 SECRECIÓN CUTÁNEA DE LA RANA ARBORÍCOLA, Phyllomedusa
365 ecuatoriana (Phyllomedusinae). ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica
366 Ecuatoriana. 2020 Apr 25;7(1).
- 367 2. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. 2021.
- 368 3. Camarena JJ, Sánchez R. INFECCIÓN POR Staphylococcus aureus RESISTENTE
369 A METICILINA. 2017.
- 370 4. Soloaga R, Corso A, Gagetti P, Faccone D, Galas M, Grupo Colaborador MRSA.
371 Detección de meticilino-resistencia en Staphylococcus aureus: Comparación de
372 métodos convencionales y aglutinación con MRSA-Screen latex. 2004.
- 373 5. García MM. Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido:
374 resistencia. Sanidad Militar. 2013 Dec;69(4):244–8.
- 375 6. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. Rev Cubana Med.
376 2013;52(3).
- 377 7. Tejada Llacsá PJ, Huarcaya JM, Melgarejo GC, Gonzales LF, Cahuana J, Pari RM,
378 et al. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un
379 hospital de referencia nacional. Anales de la Facultad de Medicina. 2015 Jul
380 10;76(2):161.
- 381 8. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A,
382 Domínguez M, et al. KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal
383 carbapenemasa en enterobacterias. Revista chilena de infectología. 2017
384 Oct;34(5):476–84.
- 385 9. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing Klebsiella
386 pneumoniae, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. Antimicrob
387 Agents Chemother. 2015 Oct;59(10):5873–84.

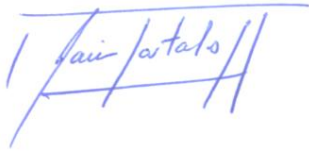
- 388 10. Organización Panamericana de la Salud. Precauciones de control de infecciones en
389 brotes de bacterias productoras de carbapenemasas [Internet]. 2012. Available
390 from:
391 [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=bl](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog)
392 [og](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog)
- 393 11. Sopovski DS, Gielda L, Bates S, Spaulding M, Ting WTE. ANTIMICROBIAL
394 RESISTANCE IN SERRATIA MARCESCENS THE PURDUE UNIVERSITY
395 GRADUATE SCHOOL STATEMENT OF COMMITTEE APPROVAL. 2019.
- 396 12. Giovanetti MCY, Morales Parra GI. Perfil de resistencia antimicrobiana de *Serratia*
397 *marcescens* en el departamento del Cesar-Colombia. *PortalesMedicos.com*. 2016
398 Oct 24;
- 399 13. Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, et al.
400 Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after
401 Colistin Administration in a Hospital Setting. *J Clin Microbiol*. 2013
402 Jul;51(7):2295–302.
- 403 14. World Health Organization. Lack of new antibiotics threatens global efforts to
404 contain drug-resistant infections. 2020.
- 405 15. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 2010 Mar;14(1):55–67.
- 406 16. De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto JMa, Díaz León MÁ, García Pérez AP.
407 *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. *Revista Mexicana de Ciencias*
408 *Farmacéuticas* [Internet]. 2015;46(2):7–16. Available from:
409 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57946148002>
- 410 17. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquinga F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C,
411 et al. Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree
412 frog *Agalychnis spurrelli*. *J Mol Model*. 2019 Sep 17;25(9):260.
- 413 18. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic
414 approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in
415 the splendid leaf frog, *Cruziophyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016 Sep;146:1–13.
- 416 19. Gonzalez Curiel IE, Rivas-Santiago B. Los péptidos antimicrobianos y sus
417 beneficios en el tratamiento de las úlceras de pie diabético. *Salud(i)Ciencia*. 2019
418 Apr 30;23(3):1–10.
- 419 20. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquinga F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C,
420 et al. Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree
421 frog *Agalychnis spurrelli*. *J Mol Model*. 2019 Sep 17;25(9):260.
- 422 21. Mor A, Nicolas P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog
423 skin. *Eur J Biochem*. 1994 Jan;219(1–2):145–54.
- 424 22. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design,
425 Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020 Oct
426 16;11.
- 427 23. Caicedo A. Análisis se secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas
428 de susceptibilidad en bacterias patógenas [Tesis de Licenciatura]. [Quito]:
429 Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2007.

- 430 24. Osborn Carol E. Statistical Applications for Health Information Management. 2nd
431 ed. Jones & Bartlett Learning, editor. 2005. 1–390 p.
- 432 25. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of
433 Antimicrobial Chemotherapy. 2001 Jul 1;48(suppl_1):5–16.
- 434 26. Bartels EJH, Dekker D, Amiche M. Dermaseptins, Multifunctional Antimicrobial
435 Peptides: A Review of Their Pharmacology, Effectivity, Mechanism of Action, and
436 Possible Future Directions. Front Pharmacol. 2019 Nov 26;10.
- 437 27. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and
438 Resistance. Pharmacol Rev. 2003 Mar 1;55(1):27–55.
- 439 28. Varela YY, Labrador I, Araque M. Fenotipo hiper mucoviscoso de *Klebsiella*
440 *pneumoniae* hipervirulenta: Lo nuevo de un viejo enemigo. Avances en
441 Biomedicina [Internet]. 2020 Jan 6;8(1):21–35. Available from:
442 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331365744003>
- 443 29. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella*
444 *pneumoniae*. Future Microbiol. 2014 Sep;9(9):1071–81.
- 445 30. De Castro C, Parrilli M, Holst O, Molinaro A. Extraction and Chemical Analysis of
446 Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides. In: Microbe-Associated Molecular
447 Patterns in Innate Immunity. 2010. p. 89–115.
- 448 31. Lazzaro M. Factores de virulencia de *Serratia marcescens* [Doctorado].
449 [Argentina]: Universidad Nacional de Rosario; 2019.
- 450 32. Joo HS, Fu CI, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides.
451 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2016 May
452 26;371(1695):20150292.
- 453 33. Oñate-Garzón JF, Manrique-Moreno M, Patiño González E. Actividad
454 antimicrobiana de péptidos catiónicos diseñados a partir de un péptido neutro. Acta
455 Biolo Colomb. 2017;22(2):157–64.
- 456 34. Kolar SL, Antonio Ibarra J, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, et
457 al. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence
458 via the global modulation of virulence-determinant stability. Microbiologyopen.
459 2013 Feb 11;2(1):18–34.
- 460 35. Hernández Ortega Y, Mollineda Diogo N, González Mosquera DM. Estudio de la
461 actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa*
462 *purpurascens* Cav. . REDVET. 2006;7(10).
- 463



Francis Andrea Herrera Acurio

Quito, 16 de junio de 2023



Jaime Alfredo Costales Cordero, PhD

Quito, 16 de junio de 2023

Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito, 16 de junio de 2023

Mgtr. Diego Guevara Capelo S.J.

Quito, 16 de junio de 2023