



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO
DERIVADO DE LA QUIMIOCINA CCL13 (CDAP-4) EN
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE
Pseudomonas aeruginosa.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. ANAÍ DE JESÚS FUENTES RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA †
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA
[Universidad Autónoma del Estado de Morelos.](#)

Ciudad universitaria, CDMX. Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Antes de los agradecimientos personales; doy gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), institución que me brindó la beca número 406552 para mi manutención, permitiéndome estudiar el posgrado de tiempo completo. Igualmente al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la ayuda económica proporcionada para asistir al XXII Congreso Nacional de Inmunología 2016 en la ciudad de Zacatecas.

A la primera persona que quiero agradecer, es al Dr. Eduardo García Zepeda Q.E.P.D, por darme la oportunidad de reencontrarme con la investigación y por creer en mí aún sin conocerme y alentarme a seguir con el proyecto cuando a veces no salían las cosas como yo esperaba. En segundo lugar a la Dra. Gloria Soldevila por acogernos en su equipo a pesar de todas las dificultades, y por apoyarme en los últimos pasos para la conclusión de este trabajo y graduarme. También agradezco a los Doctores Rogelio Hernández Pando y Fernando Esquivel Guadarrama por sus valiosos consejos y críticas respecto al desarrollo de mi trabajo.

Además doy gracias a mi familia por ser el andamio de mi vida, por su apoyo en este reto de estudiar el posgrado en otra ciudad, a mi mamá Hermila Rodríguez por cuidarme como su “niña” y darme el ejemplo para ser una mujer valiente, a mi papá Jorge Fuentes que aunque me extrañaba, siempre me animó a seguir, a mi hermana Alba por echarme porras y estar siempre para escucharme.

Agradezco infinitamente a mi nueva familia, Sra. Dora Lidia, Sr. Josué, Sofi y Sra. Ana, por acogerme y brindarme apoyo en mi estancia en esta ciudad. A mi Josué por su amor incondicional y por darme palabras de aliento cuando me frustraba y creía no poder.

A mis compañeros de Laboratorio: Cynthia, Claudia, Toño, Scarlet, Laura, Jacobo, Beto, Alonso, Luis, Isma, Nara, Oscar, Aleida, Flor, Violeta, Roxana, Erika, Sandra, Marisol y todo el enorme grupo que ahora conformamos, por sus consejos y críticas constructivas en los seminarios. Agradezco a Gisela DuPont por su ayuda cuando lo necesite en el laboratorio. Todos me apoyaron mucho en mi formación científica. ¡Gracias!

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHLA	Acil-homoserina lactona
AMPs	Péptidos antimicrobianos (Antimicrobial Peptides)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección America de Cultivos Tipo (American Type Culture Type)
CBRL	Chemokine Biology Research Laboratory (Laboratorio de Investigación Biología de Quimiocinas)
CDAP-4	Chemokine Derived Antimicrobial Peptide-4 (Péptido Antimicrobiano Derivado de Quimiocina 4)
c-di-GMP	Monofosfato de guanosina dimérico cíclico
c-di-NMP	Monofosfato de Nucleótido cíclico
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
EPS	Sustancias Poliméricas Extracelulares
FQ	Fibrosis Quística
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
INF- γ	Interferón gamma
LB	Medio Luria-Bertoni
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido Lipoteicoico
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1)
MCP-4	Monocyte Chemotactic Protein 4 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 4)
NF κ B	Factor Nuclear Kappa B
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1
PBS	Tampón de Fosfatos Salino
PMN	Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconocimiento de Patrones
QS	Quorum-sensing
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
STING	Stimulator of interferon genes (proteína estimulador de genes interferón)
TFP	Pili Tipo IV
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TSB	Caldo Soya Trypticaseína
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

La presencia de biofilms o biopelículas ha sido asociada con varias enfermedades infecciosas crónicas. La formación de estas estructuras apoya a los microorganismos a evadir la respuesta inmune y a protegerse contra ambientes y sustancias hostiles como los antibióticos comúnmente usados en la clínica (betalactámicos y aminoglucósidos).

En los últimos años han tomado importancia los péptidos antimicrobianos; compuestos capaces de inhibir o erradicar las biopelículas.

De importancia en este proyecto son las quimiocinas o péptidos derivados de éstas, que pueden actuar similar a los péptidos antimicrobianos. La región carboxilo de las quimiocinas es la responsable de su actividad antimicrobiana.

En este trabajo se evaluó la actividad anti-biopelícula del péptido sintético derivado de la región carboxilo, de la quimiocina CCL13 al que se ha denominado CDAP-4. Se observó que su actividad contra biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa in vitro* es a concentraciones mayores a 27.3 μM . Además CDAP-4, inhibió de un 50 a 60 % la adherencia de la cepa prototipo de *P. aeruginosa* PAO1, y de un aislado clínico con fenotipo mucoide de la misma especie a 109.4 μM . Adicionalmente CDAP-4 disminuyó la biomasa de biopelículas preformadas y previno la adherencia de *P. aeruginosa* PAO1 en placas de poliestireno pre-tratadas con el péptido. Por otra parte, CDAP-4 redujo hasta un 50% los halos de motilidad “swarming” de *P. aeruginosa* PAO1 a concentraciones debajo de la concentración inhibitoria; asimismo CDAP-4 aumentó el área de los halos de motilidad “twitching” para *P. aeruginosa* PAO1 y la disminuyó para el aislado clínico de *P. aeruginosa* 5278. Se observó, que CDAP-4 disminuyó las UFC intracelulares en células monocíticas THP-1, después de incubarse durante tres horas. Mientras que, en los cultivos de biopelículas y células THP-1, concentraciones de CDAP-4 desde 13.7 μM . redujeron las UFC recuperadas posterior a tres horas de tratamiento. El péptido CDAP-4 afecta el establecimiento de biopelículas de *P. aeruginosa* por medio de mecanismos relacionados con la motilidad y mejora la actividad bactericida de las células THP-1.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
¿QUÉ ES UNA BIOPELÍCULA?	1
BIOPELÍCULA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
MOTILIDAD Y BIOPELÍCULAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
“Swimming”	9
“Swarming”	9
“Twitching”	11
RESPUESTA INMUNE CONTRA PATÓGENOS.....	13
RESPUESTA INMUNE CONTRA BIOPELÍCULAS	17
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	21
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y FAGOCITOSIS.....	27
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CONTRA BIOPELÍCULAS.....	27
LAS QUIMIOCINAS.....	30
QUIMIOCINA CCL13.....	33
QUIMIOCINAS Y PÉPTIDOS DERIVADOS COMO ANTIMICROBIANOS. ...	34
ANTECEDENTES.....	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
JUSTIFICACIÓN.....	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS.....	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS PARTICULARES	42
MATERIALES Y METODOS	43
CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	43
CULTIVO DE TRABAJO.....	43
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL PÉPTIDO CDAP-4 FRENTE A CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN MICROPLACAS DE 96 POZOS POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	44

ENSAYO PARA MOTILIDAD “SWARMING”	45
ENSAYO PARA MOTILIDAD “TWITCHING”	45
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	46
CULTIVO DE CÉLULAS THP-1	46
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CDAP-4 EN CO-CULTIVOS DE CÉLULAS THP-1/ BACTERIAS PLANCTÓNICAS.....	46
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CDAP-4 EN CO-CULTIVOS DE CÉLULAS THP-1/ BIOPELÍCULAS.....	47
CONTEO BACTERIANO	48
ESTADISTICA	48
RESULTADOS.....	49
Concentración mínima inhibitoria (CMI) de CDAP-4 sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
Efecto de CDAP-4 en las biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa in vitro</i>	49
Efecto de CDAP-4 en las motilidades “swarming” y “twitching”	53
Efecto de CDAP-4 en las biopelículas observadas por microscopía electrónica de barrido.	56
Efecto de CDAP-4 sobre la capacidad de eliminación de células planctónicas y biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO, por células THP-1.	58
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS.....	82
APÉNDICES	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Figura. 2 Halo de Motilidad swarming de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Figura. 3 Barreras que evitan a los patógenos cruzar epitelios.	14
Figura. 4 Coincidencias generales entre los sistemas inmunes innato y adaptativo.	15
Figura. 5 Esquema de la resistencia a la fagocitosis dentro de la biopelícula.....	18
Figura. 6 Modelo del papel de C-di-NMP en los primeros estadios de infecciones por biopelículas.....	21
Figura. 7 Múltiples funciones de los péptidos antimicrobianos	26
Figura. 8 Acciones inmunomoduladoras de péptidos antimicrobianos.....	26
Figura. 9 Efecto del péptido 1018 en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por microscopía electrónica de barrido.....	29
Figura. 10 Mecanismos involucrados en el efecto anti-biopelículas de AMPs	30
Figura. 11 Clasificación de las quimiocinas según su estructura	30
Figura. 12 Estructura conformacional de CCL13	34
Figura. 13 Modelo estructural in silico de CDAP-4	37
Figura. 14 Análisis de la actividad antimicrobiana de CDAP-4 por microscopía electrónica de transmisión.....	38
Figura. 15 Actividad de CDAP-4 sobre la generación de biopelículas por <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	38
Figura. 16 CDAP-4 afecta la formación de biopelículas de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> in vitro.....	51
Figura. 18 CDAP-4 inhibe la motilidad swarming de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in vitro.....	55
Figura. 19 CDAP-4 afecta la motilidad twitching de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in vitro.....	55
Figura. 20 Observación del efecto de CDAP-4 por Microscopía electrónica de barrido.....	56
Figura. 21 Efecto de CDAP-4 por Microscopía electrónica de barrido 20000 aumentos	57
Figura. 22 CDAP-4 aumenta la capacidad de eliminación de células platónicas y biopelículas de PAO1 por células THP-1	58
Figura. 23 Modelo propuesto del efecto de CDAP-4 en la formación de biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las EPS las bipelículas.....	7
Tabla 2. Receptores Toll-like y sus ligandos.	17
Tabla 3. Características Físicoquímicas de los Péptidos antimicrobianos.	24
Tabla 4. Quimiocinas CC y sus receptores: Clasificación, Expresión Celular y Funciones	31
Tabla 5. Péptidos derivados de quimiocinas (CDPs) usados como antimicrobianos	36
Tabla 6. Propiedades Físicoquímicas de CDAP-4 vs AMP	38
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias para diferentes cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

INTRODUCCIÓN

¿QUÉ ES UNA BIOPELÍCULA?

Las bacterias pueden existir en la naturaleza de dos maneras, la forma planctónica que consiste en individuos de libre flotación o el estado sésil donde las comunidades están adheridas a una superficie conformando las biopelículas (1, 2). Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie que se encuentran infiltrados dentro de una matriz biopolimérica producida por los mismos microorganismos entre canales abiertos de agua (3).

En muchas biopelículas, los microorganismos representan al menos el 10-25% de la masa seca, mientras que la matriz representa el 75-90%. Se infiere que aproximadamente el 99% de las bacterias se encuentran viviendo en comunidades y solo un 1% se encuentra de forma planctónica (2, 4, 5).

La destreza de las bacterias para formar biopelículas es una condición universal. Estas estructuras pueden formarse en ambientes naturales, superficies inertes, materiales industriales, dispositivos médicos, catéteres, implantes, etc. Las biopelículas tienen la característica de ser de 10-1000 veces más resistentes a los antibióticos de uso común que su contraparte plantónica, por lo que dificultan el tratamiento de infecciones (1, 6-8, 10). Se han encontrado biopelículas en superficies corporales como dientes, piel, tracto urinario, pulmón, intestino, miocardio, entre otras. Estas estructuras probablemente sean la causa del 65-80% de todas las infecciones microbianas (9).

Hay numerosos beneficios que las comunidades bacterianas pueden obtener de la formación de biopelículas; una mayor resistencia, posiblemente debido al aumento en la porción de células bacterianas persistentes dentro del biopelículas y una protección física por parte de la matriz contra antibióticos,

desinfectantes, ambientes cambiantes y sistema inmune de un hospedero (4, 7-10).

Formación de una biopelícula

La formación de una biopelícula está dirigida por procesos fisicoquímicos y biológicos diversos. Characklis y Marsharl (2) describieron algunos pasos importantes de este proceso que son detallados a continuación:

a) Capa de acondicionamiento

Se necesita una base en donde las bacterias puedan adherirse y la biopelícula pueda crecer. Algunas superficies son más susceptibles que otras a la adhesión bacteriana. La capa de acondicionamiento, es una estructura que se forma sobre la superficie facilitando la unión bacteriana; esta capa se caracteriza por contener partículas orgánicas e inorgánicas provenientes del medio o el líquido que baña la superficie. Las partículas orgánicas e inorgánicas del medio, modifican las propiedades fisicoquímicas de la superficie, como el potencial electrostático y la tensión superficial permitiendo a las bacterias adherirse fácilmente. Esta estructura, constituye un sustrato que provee a las bacterias de nutrientes y anclaje.

b) Adhesión reversible

Las bacterias planctónicas se transportan del medio a la superficie acondicionada; una fracción es adsorbida en la superficie de manera reversible por fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, interacciones estéricas o apéndices como el flagelo. Son varios los fenómenos que afectan la adhesión de las bacterias a una superficie, principalmente la orientación con las bacterias se unen a la superficie, la energía disponible, la temperatura y la presión del medio o líquido en donde se encuentran sumergidas. Se creó que las bacterias con superficies celulares hidrofóbicas interaccionaran con mayor facilidad a superficies hidrofóbicas, mientras que los microorganismos con superficies hidrofílicas les será más difícil unirse a las superficies (11).

c) Adhesión irreversible

La desorción bacteriana de la superficie después de que se ha dado el primer contacto es muy probable, pues la energía de activación de este fenómeno es baja; aún así, las bacterias logran adherirse de manera irreversible permaneciendo inmobilizadas. Se ha demostrado que los responsables de la unión irreversible son los apéndices bacterianos (flagelos, fimbrias y pilis). Los flagelos, pilis y fimbrias de las bacterias permiten superar la repulsión electrostática contactando con la superficie de la capa de acondicionamiento e incitando la unión superficie-bacteria.

d) Crecimiento de la población

Las bacterias adheridas comienzan a crecer exponencialmente a un ritmo dependiente de la disponibilidad de nutrientes y la naturaleza del ambiente. Las células hijas se extienden hacia afuera y hacia arriba para formar grupos o microcolonias; en este momento los fenómenos fisicoquímicos de adhesión dejan de ser los principales y dan lugar al proceso biológico, como la excreción de polisacáridos y polímeros para la adhesión intercelular. Estas acciones de crecimiento e interacciones bacterianas crean una estructura similar a una “seta”.

e) Desarrollo de la biopelícula

Después de que las bacterias se dividen exponencialmente, llegan a la fase estacionaria en la biopelícula, en la cual la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte. Cuando hay altas concentraciones de células, diferentes mecanismos señal se activan (autoinductores), importantes para la comunicación célula-célula fenómeno denominado “quórum-sensing” (QS).

En una biopelícula, la difusión de nutrientes es lenta, resultando en una comunidad bacteriana en la que algunas células son metabólicamente inactivas, influenciadas por la confinación en un espacio limitado.

La biopelícula termina con su ruptura, como consecuencia de que la comunidad produce enzimas que degradan los polisacáridos que las mantienen unidas y liberan bacterias superficiales activas que pueden colonizar nuevos sustratos, completando un ciclo adhesión-cohesión-biopelícula.

“Quorum-sensing”

El QS es un proceso de comunicación célula-célula que dirige el comportamiento colectivo bacteriano en respuesta a un aumento del tamaño poblacional y de la composición del medio. Se han descrito tres sistemas QS para *P. aeruginosa*: LasI, RhIR y PQS (señal quinolona de *Pseudomonas*). Los sistemas LasI y RhIR sintetizan moléculas de N-acilhomoserina lactona (AHL); N-butanoil-L-homoserino lactona y N-(3-oxo-dodecanoil-L-homoserino lactona respectivamente. Por otro lado el sistema PQS usa como señal a 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, estas moléculas son denominadas autoinductores, porque su acumulación estimula su propia síntesis en mayor proporción. (12)

La función de los autoinductores es controlar la expresión sincronizada de factores de virulencia en la comunidad, como la exotoxina A, la elastasa, proteasas, piocianina, además de genes relacionados con la motilidad en grupo y la formación de biopelículas. (12)

Otras moléculas importantes producidas por este mecanismo QS son los ramnolípidos, estas moléculas funcionan como surfactantes y son necesarios para la formación de la biopelícula (13).

BIOPELÍCULA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es una bacteria gram-negativa, se considera un patógeno oportunista que vive en el suelo y agua; su adaptabilidad a diferentes ambientes y su resistencia a los antibióticos le permite sobrevivir en ambientes naturales y sintéticos, pudiendo colonizar dispositivos médicos, catéteres, prótesis, lentes de contacto, implantes y sondas. Además, es importante en infecciones nosocomiales

y de personas inmunocomprometidas ya que puede crecer en heridas de diabéticos, quemaduras o vías respiratorias de pacientes con ventilación mecánica y con fibrosis quística (FQ) (14,15). Esto último es de importancia ya que el ambiente en los pulmones con FQ es propicio para que *P. aeruginosa* modifique su fenotipo a uno mucoso y pueda desarrollarse en biopelículas. Por ello, *P. aeruginosa* ha sido un buen modelo para el estudio de estas comunidades microbianas (14).

La biopelícula de *P. aeruginosa* (Fig.1), como la mayoría de estas comunidades lo conforman las bacterias y la matriz. La matriz, es un gran conjunto de moléculas que como analogía, puede decirse que constituyen la “casa de las bacterias”, la matriz cubre las células bacterianas dentro de la biopelícula (7).

La formación de una biopelícula de *P. aeruginosa*, comienza con la adhesión de una bacteria a la superficie, seguida por la motilidad asociada a una superficie y la formación de microcolonias. Las microcolonias evolucionan en biopelículas maduras junto con la secreción de exopolisacáridos. La arquitectura de las biopelículas de *P. aeruginosa* depende de la producción de la matriz formada por los polisacáridos, Pel, Psl y alginato (se explica más adelante en el texto), ADN extracelular, proteínas, fimbrias como Cup A, Cup B y Cup C que median la adhesión bacteriana durante el inicio, así como la lectina Lec B. (124)

La matriz polimérica impide la difusión de algunos antibióticos por protección física, además disminuye la difusión del oxígeno, por lo tanto se induce un gradiente de que da lugar a distintas subpoblaciones bacterianas según su metabolismo favoreciendo bacterias persistentes. Las bacterias dentro de la biopelícula aumentan la expresión de enzimas como betalactamasas (AmpC) o de factores de resistencia como transportadores de antibióticos (MexA, MexB, OprM). La secreción de autoinductores estimula la producción de los ramnolípidos que inducen necrosis en neutrófilos. Como paso final hay bacterias planctónicas que se liberan de la biopelícula madura para colonizar nuevas superficies. (124)

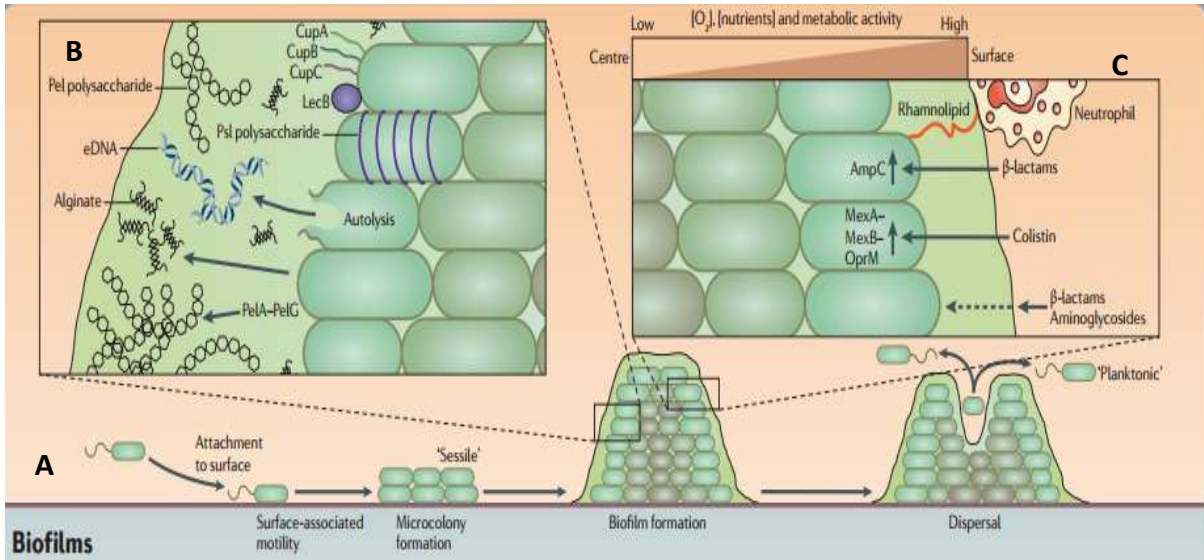


Figura. 1. Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. **A)** Etapas de la formación de la biopelícula. **B)** Componentes de la Matriz extracelular. **C)** Diferentes mecanismos de protección de la biopelícula: resistencia a antibióticos, gradientes de oxígeno, síntesis de ramnolipidos. Fuente: Hauser and Ozer. Nature. (2011) (124)

La matriz exapolimérica

Los microorganismos en una biopelícula se encuentran infiltrados dentro de su propio material extracelular formado por un conjunto de diferentes tipos de biopolímeros llamados EPS (sustancias poliméricas extracelulares) que forman los andamios de la estructura tridimensional de las biopelículas y le confieren sus propiedades de adhesión, cohesión y protección a los microorganismos de la desecación, biocidas, oxidantes, algunos antibióticos, cationes metálicos, radiación UV y contra las defensas del sistema inmune del hospedero (8, 10, 16, 17). La función de las EPS (Tabla 1) es proveer estabilidad, formar un polímero cohesivo y tridimensional que interconecta e inmoviliza transitoriamente a las células permitiendo la intercomunicación célula-célula. Esta matriz está compuesta de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, pigmentos (piocianina y pioverdina), estructuras bacterianas como pilis, fimbrias, flagelos así como microvesículas extracelulares (4, 17).

Tabla 1. Funciones de las EPS en la biopelícula⁴

Función	Importancia	Componentes relacionados
Adhesión	Permite la permanencia a largo plazo de la biopelícula en superficies.	Polisacáridos, proteínas, ADN, moléculas anfifílicas.
Agregación de células bacterianas y cohesión	Establece puentes entre células por inmovilización de poblaciones bacterianas, favoreciendo altas densidades y el reconocimiento célula-célula.	Polisacáridos, proteínas, ADN.
Retención de Agua	Mantiene un microambiente altamente hidratado alrededor de los microorganismos impidiendo su desecación.	Polisacáridos hidrófilos y proteínas.
Barrera protectora	Confiere resistencia a defensas del sistema inmune específicas y no específicas, así como tolerancia a antimicrobianos, por impedimento estérico o al atrapar moléculas.	Polisacáridos, proteínas
Donador y aceptor de electrones	Permite la actividad redox en la matriz.	Proteínas que forman los pilis, pigmentos como la piocianina en <i>P. aeruginosa</i> .

Existen otras proteínas asociadas a la matriz que reconocen fracciones de carbohidratos, facilitando las interacciones matriz-célula o célula-célula dentro de la biopelícula de *P. aeruginosa* denominadas lectinas (LecA y Lec B) que involucradas en la formación de la biopelícula. Esta bacteria presenta flagelos, pili tipo IV (TFP siglas en inglés) y fimbrias, considerados también componentes de la

matriz, y que tienen un papel como elemento adhesivo en interacciones superficie-célula haciéndolas irreversibles (18).

P. aeruginosa forma biopelículas por la producción de tres exopolisacáridos distintos: alginato, Pel (su nombre se debe a la película gruesa que se forma cuando se sobreexpresa el operon *pel*) y Psl (nombre que proviene de: “locus” de síntesis de polisacárido, por sus siglas en inglés) (4,6, 8).

El alginato es producido por cepas mucoides de *P. aeruginosa*, aisladas frecuentemente de pulmones de pacientes con fibrosis quística (FQ). El polisacárido Psl es importante en las primeras etapas de formación de la biopelícula secretándose antes que el alginato (6). Estos polisacáridos protegen a *P. aeruginosa* aumentando la fuerza de cohesión y formando una barrera fisicoquímica para diferentes amenazas del ambiente donde se encuentre (17).

Los ambientes hostiles pueden activar señales que alteren la producción de estos polisacáridos. Por ejemplo, concentraciones subinhibitorias de muchos antibióticos no funcionan como microbicidas pero si activan señales que cambian la expresión génica para la sobreproducción de alginato (19-21).

En pacientes enfermos de FQ, caracterizada por deficiencias en una proteína encargada del transporte de cloro en las células epiteliales (regulador de la conductancia transmembrana CFTR), existe una alteración de las concentraciones iónicas en órganos como el pulmón. El desequilibrio iónico en el pulmón propicia un ambiente que favorece el cambio de fenotipo de *P. aeruginosa* a uno mucoides dando lugar a sobreproducción de alginato. La sobreproducción de alginato está relacionada con mutaciones en el gen *mucA*, el cual codifica para un factor anti-sigma de AlgT; importante en la expresión del operón de biosíntesis del alginato (22). Se ha observado que este fenotipo mucoides presenta una mayor resistencia a los antibióticos, respecto a los no mucoides, además de ser más eficaces en la formación de microcolonias dando lugar a biopelículas maduras más estructuradas (22).

P. aeruginosa produce pigmentos como la piocianina y pioverdina que también tienen un papel en el desarrollo de la biopelícula: la piocianina ayuda a mantener la viabilidad celular en los biopelículas, pues funciona como un intercambiador de electrones donde los aceptores como el O₂ o el nitrato tienen difusión limitada manteniendo una tasa basal de respiración (23). Igualmente, la piocianina puede unirse al ADN extracelular aumentando su viscosidad y mejorando la biopelícula (24).

MOTILIDAD Y BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Otro punto significativo en la formación de biopeículas, son los mecanismos de motilidad bacteriana. Aunque las bacterias no móviles también son capaces de formar biopelículas, el estudio de este mecanismo en la formación de biopelículas es importante para bacterias gram-negativas como *P. aeruginosa*. Mutantes deficientes en cualquiera de los apéndices necesarios para moverse (flagelo, pilis) son menos eficientes en la creación de biopelículas (25).

P. aeruginosa posee tres tipos principales de movimiento según la viscosidad del medio donde se encuentre, estos son: “swimming” en ambientes acuosos, “twitching” en superficies sólidas, “swarming” en medios semisólidos o viscosos. Tanto el “swimming” como el “swarming” son dependientes del flagelo, pero para el “twitching” es necesaria la expresión del pili tipo IV (TFP) (25).

“Swimming”

P. aeruginosa tiene un flagelo polar que funciona como propulsor para nadar en medios líquidos, lo presentan las bacterias en su estado planctónico y es guiado principalmente por gradientes de nutrientes (quimiotaxis). Esta motilidad está implicada en el primer paso de adherencia a la superficie, permitiendo que la bacteria pase de un medio líquido a una base sólida o más viscosa (27).

“Swarming”

P. aeruginosa puede moverse a lo largo de superficies semisólidas o viscosas gracias a un fenómeno denominado “swarming”. Este mecanismo implica movimientos rápidos y coordinados de una población bacteriana, “parecidos a los de una parvada”. Se ha descrito que el QS controla esta motilidad por la expresión de enzimas que producen biosurfactantes, llamados ramnolípidos (26). El “swarming” es dependiente del flagelo, la densidad celular, la cantidad de nutrientes y de las condiciones de humedad de la superficie. Es necesario el contacto e interacción con un sustrato sólido para que este movimiento se induzca, por lo que representa un estilo complejo de adaptación en respuesta al ambiente. *P. aeruginosa* presenta frecuentemente un crecimiento representado por una colonia con dendritas (Fig. 2), las bacterias migran lejos del punto de inoculación, por lo que se ha propuesto que el “swarming” es orientado quimiotácticamente (26-30).



Figura 2. Halo de motilidad “swarming” de *Pseudomonas aeruginosa*. La estructura comúnmente formada por varias cepas de esta bacteria es una colonia central de donde emergen dendritas alrededor. Fuente: Foto del control de un aislado clínico de *P. aeruginosa* cultivado en el laboratorio Dr. Gloria Soldevila.

Como se mencionó, para que la bacteria se mueva por este mecanismo es necesario que haya condiciones específicas en el medio. En particular, *P. aeruginosa* se ha adaptado para crear un ambiente favorecedor donde pueda desarrollarse en ese sentido; la presencia de surfactantes denominados ramnolípidos que son secretados por la comunidad bacteriana y su secreción regulada por el QS, permiten a las bacterias moverse a través de las superficies

ayudando a vencer la tensión superficial del agua que las rodea y modular el patrón de movilidad. Lo anterior, hace posible la extensión de la comunidad bacteriana sobre superficies dando pie a que migre, se adhiera y se disperse del sitio inicial de colonización (13, 26-30).

La trascendencia de este tipo de motilidad en la formación de biopelículas es que se creó, está involucrada en los primeros pasos del establecimiento de la éstas. Es considerado un paso de transición entre la adhesión y la formación de comunidades (31, 32). Mutantes carentes del flagelo, fueron incompetentes para moverse en “swarming” y mostraron baja capacidad para adherirse a placas de diferentes plásticos. Se ha propuesto, que el flagelo es necesario para la unión irreversible a la superficie en la primera etapa del desarrollo de la biopelícula, además de ser requerido para la propulsión, tiene un rol mecano-sensor de superficies. En hospederos, su blanco de unión es la mucina. Se ha observado que el primer paso para colonizar pacientes con FQ es la motilidad por medio del flagelo. (32-34).

Dos estatores flagelares Mot AB y Mot CD también tienen un papel en la adherencia inicial irreversible. Se ha descrito que mutaciones en genes que codifican para estas proteínas crean cepas defectuosas para hacer biopelículas (29).

Asimismo las bacterias en este estado “swarming” sobre-expresan varios genes relacionados con factores de virulencia, como sistemas de secreción tipo III, proteasas extracelulares, transportadores de hierro, por lo que son más resistentes a antibióticos como polimixina B, gentamicina y ciprofloxacina, confiriéndoles mayor sobrevivencia (26, 27).

“Twitching”

Una vez que la bacteria se ha adherido irreversiblemente a una superficie, comienza la expansión clonal y la agregación bacteriana dirigida por la movilidad e interacción célula-célula dando pie a la formación de microcolonias y

posteriormente una capa uniforme que madura hacia una biopelícula en forma de seta (13).

Estos pasos seguidos a la adhesión primaria son permitidos gracias a la motilidad “twitching”, una forma de movilidad en superficies solidas mediada por el pili tipo IV, que ocurre por la extensión, unión a la superficie y retracción sucesiva de esta estructura (35). El “twitching” representa el medio principal de colonización por comunidades bacterianas en medios con bajo contenido de agua, ya sea en un hospedero o materiales inertes, propiciando la vida en biopelículas. *P. aeruginosa* exhibe motilidad “twitching” en la superficie intersticial del agar, plástico o vidrio y cuando se deja creciendo en agar toda la noche pueden observarse halos de hasta 3 cm de diámetro. Se ha relacionado el tamaño de los halos con una medida semicuantitativa de la actividad “twitching” (35).

Las bacterias usan este mecanismo de movilidad en superficie ya sea para salir de las microcolonias o agregarse en ellas para apoyar a la formación de biopelículas maduras (36).

Tanto el “swarming” como el twitching son mecanismos de naturaleza comunitaria, implicando contacto célula-célula, de hecho las interacciones celulares en el “swarming” son responsabilidad del TFP, limitando el movimiento en solitario y favoreciendo el comunitario. La unión a superficies por el TFP parece ser no específica en el extremo de éste; aunque en células eucariotas epiteliales, lo hace formando puentes disulfuro en su región carboxilo a motivos de glicoesfingolípidos acilados GM1 y GM2 (36).

La estimulación de la motilidad “twitching” por diferentes mecanismos tiene un impacto negativo en la formación de un biofilm bien estructurado generando biopelículas delgadas y planas carentes de microcolonias (33). Estudios con mutantes deficientes en la biosíntesis de TFP demostraron que igualmente no hay desarrollo de microcolonias y únicamente se formó una monocapa en la superficie (25).

El TFP interacciona con el polisacárido Psl de la matriz de la biopelícula de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 mejorando la adhesión. Estas interacciones han permitido estudiar los patrones de migración que llevan a la formación de microcolonias (37).

Se han propuesto diferentes estrategias globales para atacar bacterias patógenas productoras de biopelículas (38).

1. Evitar la unión microbiana a una superficie
2. Interrumpir el desarrollo de ésta
3. Afectar la estructura con el fin de mejorar la penetración de antimicrobianos
4. Interferir con la maduración de la biopelícula e inducir su dispersión y degradación.

RESPUESTA INMUNE CONTRA PATÓGENOS

La respuesta inmune en mamíferos es un conjunto de acciones resultado de la activación y regulación de diferentes órganos, células y moléculas que los protegen de agentes extraños que pueden causarles daño. Toda molécula que sea capaz de inducir una respuesta inmune le llamamos antígeno (Ag).

Hay barreras que defienden de estos agentes extraños (Fig. 3), principalmente de microorganismos patógenos. Los epitelios constituyen una barrera que preservan los órganos y superficies internas libres de ellos.

Para su estudio la respuesta inmune generalmente se divide en dos sistemas relacionados: sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo o adquirido.

La respuesta inmune innata es de cinética rápida y por lo tanto confiere protección inmediata, la adaptativa, segunda línea de defensa, protege en un estado tardío de la infección y de re-infecciones por la generación de anticuerpos (Ab). Ambas repuestas convergen en algunos puntos para crear un sistema integral de defensa inmune (Fig. 4).

	Piel	Intestino	Pulmones	Ojos/nariz
Mecánica	Células epiteliales unidas mediante zonas de oclusión			
	Flujo longitudinal de aire o líquido		Movimiento de moco por los cilios	Lágrimas Cilios nasales
Química	Ácidos grasos	pH bajo		Enzimas en lágrimas (lisozima)
		Enzimas (pepsina)		
	Péptidos antibacterianos			
Microbiológica	Microbioma normal			

Figura 3. Barreras que evitan a los patógenos cruzar epitelios. Los epitelios de superficie proporcionan barreras físicas, también producen sustancias microbicidas que inhiben el crecimiento de patógenos como péptidos antimicrobianos (β -defensinas en piel, vías respiratorias, vías urinarias o α -defensinas en intestino delgado) y microbiológicas contra infecciones. Modificado de: Murphy and Travers. (2009)(39)

La inmunidad innata actúa eficazmente contra algunos patógenos, su efectividad está restringida por un conjunto de receptores que reconocen agentes patógenos (PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos). Estos receptores se han llamado, receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y están presentes en las membranas celulares de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas principalmente.

Entre los PRRs de las células, encontramos a los TLRs (Receptores Toll like) (Tabla 2), estos detectan diferentes componentes de bacterias, hongos, virus etc., así como moléculas de estrés y daño a tejidos DAMPs. Otros receptores importantes en infecciones por patógenos intracelulares son los NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos por sus siglas en ingles), que reconocen moléculas en el citoplasma de la célula (39).

Cuando un patógeno es reconocido por los PRRs de células fagocíticas se activan diferentes respuestas para que el microorganismo pueda ser atrapado, endocitado y destruido en una vesícula intracelular gracias a un conjunto de enzimas, moléculas microbicidas como los péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (ROS). Para poder eliminar totalmente a los patógenos por

fagocitosis se requiere del reclutamiento de más células al sitio de infección. Las células activadas que tuvieron el primer contacto con PAMPs a través de diferentes vías de traducción de señales, activan generalmente un factor de transcripción llamado NFκB (factor nuclear kappa beta), que aumenta la expresión y síntesis de quimiocinas, las cuales movilizan a células desde el torrente sanguíneo hasta el lugar de daño.

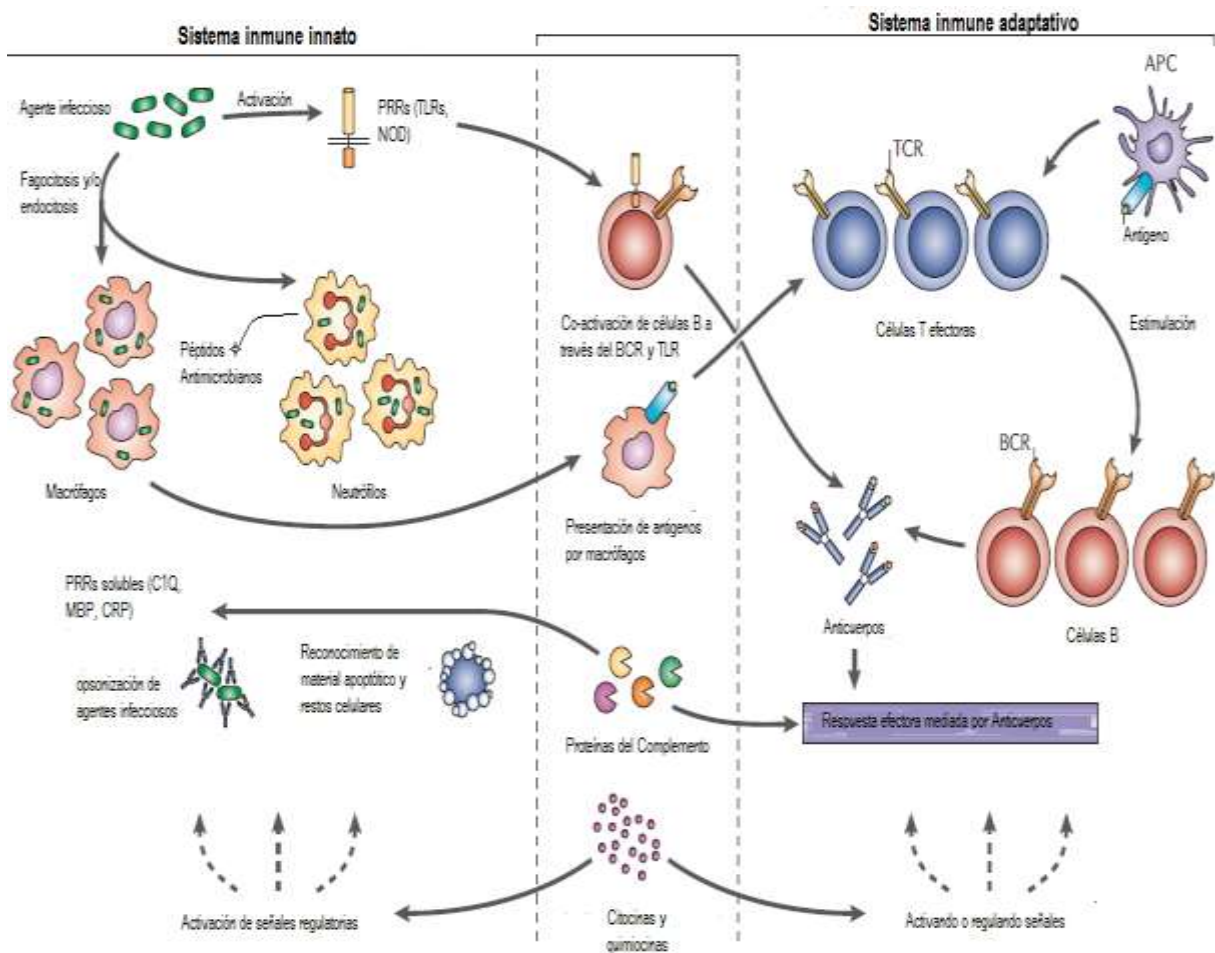


Fig. 4. Coincidencias generales entre los sistemas inmunes innato y adaptativo. Descripción en el texto. Modificado de: Gregersen and Behrens. (2006) (40)

La liberación de citocinas como TNF-α, IL-1 entre otras, también incrementa, aumentando la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos. La

secreción de citocinas y quimiocinas permite el reclutamiento de células y proteínas del plasma al lugar de la infección gracias al incremento de la permeabilidad vascular, fenómeno denominado “inflamación”.

En la fase inicial de la inflamación las células más importantes son los neutrófilos y macrófagos, posteriormente llegan al sitio los monocitos que se diferencian a macrófagos manteniendo la respuesta inmune.

Un grupo de proteínas plasmáticas que también llegan al lugar como respuesta a la inflamación en conjunto son denominadas complemento, este sistema actúa en cascada de reacciones proteolíticas para eliminar al patógeno por diferentes vías ya sea por lisis o por opsonización (revestimiento de un corpúsculo por proteínas que facilitan su fagocitosis por unión a receptores en células fagocíticas).

La inmunidad adaptativa representada por los linfocitos T y B se relaciona con la inmunidad innata principalmente por el reconocimiento de antígenos (Ag) en receptores de monocitos, macrófagos y células dendríticas denominados MHC (Complejo principal de histocompatibilidad). Las moléculas de MHC son de dos clases, la clase I presenta péptidos de Ag derivados de proteínas sintetizadas en el citosol o de virus. Por otro lado la clase MHC II presenta péptidos originarios de agentes patógenos fagocitados y degradados por monocitos, macrófagos o células dendríticas principalmente.

Por su parte las células B reconocen a los Ag solubles en el medio aparte de en las células presentadoras, los linfocitos B se transforman en su forma efectora, la célula plasmática; la cual produce Anticuerpos (Ac) que son proteínas y que tendrán como blanco el Ag inicial del patógeno.

Tabla 2. Receptores Toll-like y sus ligandos⁴¹.

TLR	Ligando microbiano	Ligando endógeno
TLR1	Péptidoglicano, lipopéptidos	----
TLR2	Lipopéptidos, ácido lipoteicoico (LTA), glicolípidos, zymosan (componente de la pared de hongos y levaduras)	----
TLR3	dsARN, siARN	mARN
TLR4	Lipopolisacárido (LPS), proteína de fusión de RSV	Proteína de choque térmico 70, oligosacáridos, ácido hialurónico, defensinas 2
TLR5	Flagelina	----
TLR6	Lipopéptidos, LTA, zymosan	----
TLR7/TLR8	Cadenas sencillas de ARN	----
TLR9	CpG, ADN	Complejos de cromatina

RSV: Virus sincitial respiratorio, siARN: ARN pequeño interferente

RESPUESTA INMUNE CONTRA BIOPELÍCULAS

Como ya se mencionó, la vida de *P. aeruginosa* en comunidades le confiere protección contra diferentes amenazas, una de ellas el sistema inmune. Aunque principalmente coloniza hospederos deficientes en su respuesta inmune, diferentes estudios *in vitro* han demostrado que células del sistema inmune innato o anticuerpos de personas sanas, son incapaces de afectar a biopelículas (Fig. 5), (16, 42-47).

Los principales componentes de las biopelículas que impiden la acción de las defensas del hospedero, son los polisacáridos de la matriz. Se ha encontrado que el polisacárido Pls afecta indirectamente la señalización de NF-κB activada por flagelina, causando reducción en la producción de IL-8 (125). En otro estudio se demostró que Pls, disminuyó la fagocitosis y la respuesta oxidativa en

neutrófilos y macrófagos (THP-1), como consecuencia de la baja deposición del complemento en bacterias que expresaban PIs (42).

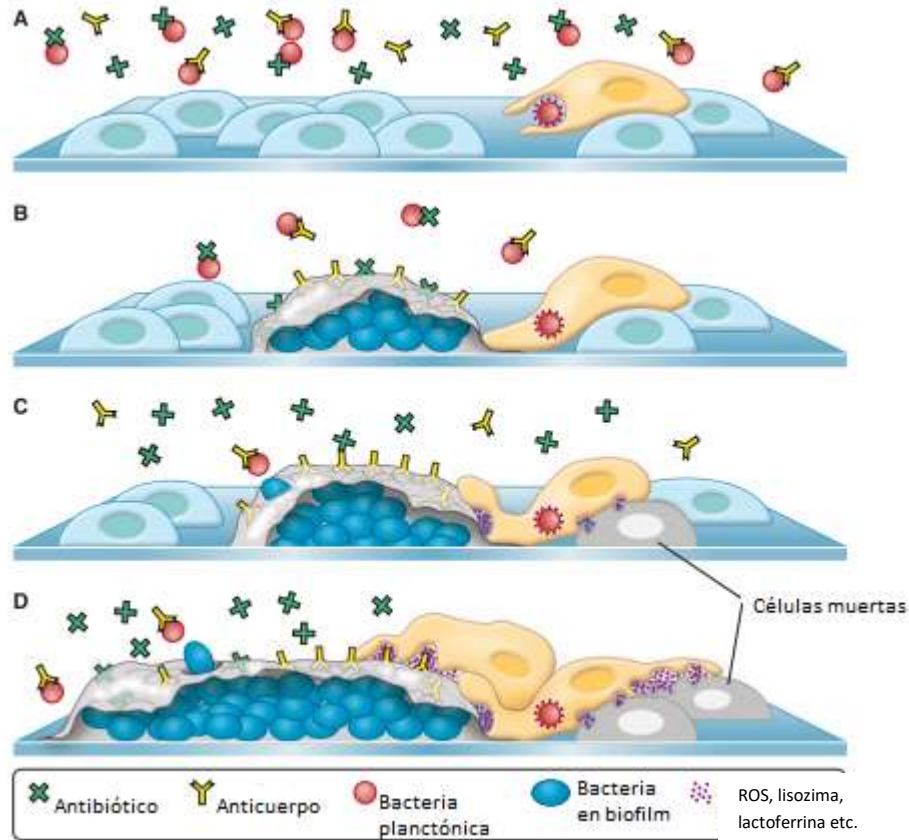


Figura 5. Esquema de la resistencia a la fagocitosis dentro de la biopelícula. A) Célula fagocítica activada contra bacteria planctónica. B-D Anticuerpos, antibióticos y fagocitos contra la biopelícula C-D) Componentes tóxicos del biofilm induciendo liberación de enzimas u otros componentes antimicrobianos. ROS: Especies reactivas de oxígeno. Modificado de: Leid J. Microbe. (2009) (48)

Las primeras células en llegar cuando *P. aeruginosa* ha colonizado son los neutrófilos, los ramnolípidos liberados por el biofilm causan necrosis de los neutrófilos por lo tanto son ineficientes en aclarar la infección. Las moléculas de QS como AHL afectan la migración de los neutrófilos. En infecciones relacionadas con el uso de catéteres, los mecanismos de defensa del biofilm, como la matriz, la liberación de ramnolípidos y autoinductores (AHL), hacen que la infección sea persistente (43).

Por su parte, el alginato puede captar los radicales libres liberados por los neutrófilos y macrófagos activados impidiendo su acción sobre las bacterias (44). Las cepas deficientes en la producción de alginato son más fácilmente fagocitadas por leucocitos activados por IFN- γ (16).

La necrosis de los neutrófilos a causa de los ramnolípidos secretados por la biopelícula, produce una liberación de ADN, actina y proteínas granulares, este proceso estimula aún más la formación de biofilms. El ADN y la F-actina liberada por los neutrófilos proveen un medio idóneo para el desarrollo de nuevas biopelículas, promoviendo la formación de algo parecido a la capa de acondicionamiento (45).

El eADN (ácido desoxirribonucleico extracelular) que compone la matriz del biofilm, puede activar también, a los neutrófilos de una manera TLR9 independiente; recordemos que los motivos CpG (citosina-fosfato-guanina) no metilados interactúan con el TLR9 activando una cascada de señales que estimulan la respuesta de los neutrófilos (46). Cuando las biopelículas son tratadas con DNasa I y posteriormente interactúan con neutrófilos, la liberación de IL-8 y IL-1 β es menor que cuando las células están en contacto con biofilms íntegros (alto contenido de eADN) (46). La producción de estructuras extracelulares compuestas de ADN y proteínas antimicrobianas producidas por los neutrófilos (NETs: trampas extracelulares de neutrófilos), disminuye cuando la biopelícula carece de eADN no hidrolizado.

Aunque los polimorfonucleares (PMN) fallan en eliminar la infección, secretan algunos componentes antimicrobianos que pueden tener efecto en el biofilm, no obstante, el microambiente donde se lleva a cabo la infección no es favorecedor para la erradicación de la biopelícula (47). Por ejemplo la lactoferrina secretada por los PMN y presente en algunas secreciones ha demostrado ser capaz de prevenir la formación de biopelículas por quelación de hierro y aumento de la motilidad “twitching” (49), igualmente la catelicidina LL-37 expresada en neutrófilos y células epiteliales ha demostrado erradicar a biofilms *in vitro* (50-54).

Una molécula importante producida por la biopelícula que se ha propuesto afecta al sistema inmune es el segundo mensajero c-di-GMP. Una producción alta de c-di-GMP aumenta el desarrollo de biopelículas y reprime la expresión de factores de virulencia (55). Se ha extrapolado este concepto a lo que podría suceder cuando la bacteria comienza a producir biopelículas en el tejido del hospedero; el switch de un estado planctónico a un estilo de vida comunitario depende de la producción de c-di-GMP.

En muestras de esputo de pacientes con FQ, hay una alta concentración de c-di-GMP producido por *P. aeruginosa* (57).

Algunos estudios muestran que el c-di-GMP y c-di-AMP provocan una respuesta inmune innata caracterizada por la activación de la producción de IFN (interferón) de tipo I (58-59). La producción de altos niveles de c-di-GMP durante el desarrollo de la biopelícula puede servir como una señal de alerta reconocida por el sistema inmune a través de la unión de c-di-GMP a STING (Estimulador de genes de interferón) (59). La unión del segundo mensajero a este sensor de dinucleótidos STING, trae como consecuencia la activación del factor de transcripción IRF3, requerido para activar la transcripción de IFN de tipo I y que protege contra bacterias extracelulares (Fig 6). La hipótesis que existe propone una reprogramación de la respuesta inmune innata; los macrófagos reclutados a la interfase biopelícula-hospedero pueden ser polarizados hacia el fenotipo M2 con propiedades antiinflamatorias, mientras que la matriz de la biopelícula constituye una barrera contra la fagocitosis, reconocimiento por anticuerpos o del complemento y puede inducir muerte de macrófagos (56).

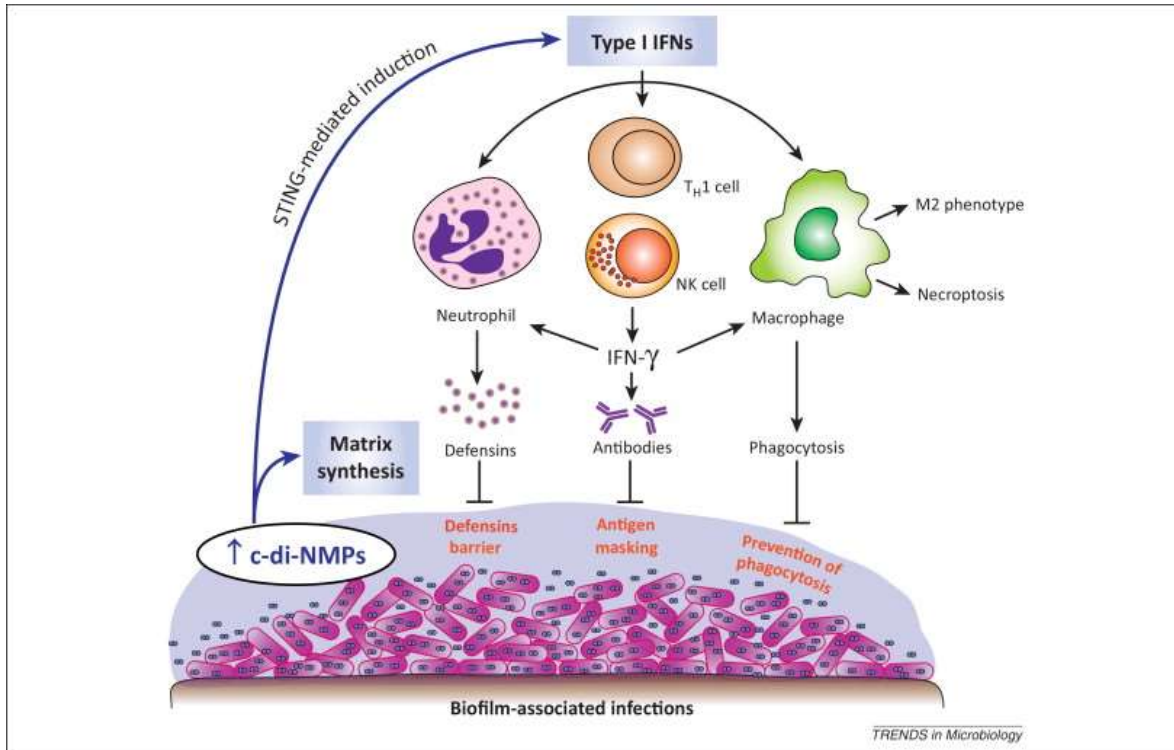


Fig 6. Modelo que muestra el papel de c-di-NMP durante los primeros estadios de infecciones relacionadas con biopelículas. Las células del hospedero han desarrollado una vía para sensar c-di-NMP estimulando la producción de IFN tipo I muerte y reprogramación de macrófagos a fenotipo M2. Fuente: Valle J. et al. Trends in Microbiology. (2013) (56)

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

En los últimos años se han explorado diferentes moléculas con potencial microbicida, dentro de ellas se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMPs). Estas moléculas son abundantes en la naturaleza y actúan también como inmunomoduladores durante la respuesta inmune innata (61).

Son moléculas catiónicas de entre 10 - 100 aminoácidos, con carga neta positiva generalmente de +2 a +9, la cual le es conferida por lisina, arginina e histidina, además su estructura la compone también una porción aproximada de 50% de residuos hidrofóbicos (62, 64).

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos (Tabla 3) les permiten plegarse en una estructura anfífilica (posee un extremo hidrofílico y

otro hidrofóbico) en tres dimensiones que consigue interactuar con las membranas y les otorga su actividad antimicrobiana (65). En teoría toda secuencia peptídica con una carga neta positiva y unos cuantos aminoácidos hidrofóbicos tendrá actividad antimicrobiana en un medio *in vitro*, la naturaleza anfipática de estos péptidos se relaciona con su actividad antimicrobiana. Las concentraciones fisiológicas de cationes divalentes como calcio, magnesio, cationes monovalentes como sodio y potasio así como por glicosaminas, glucanos y mucinas antagonizan en grados variables la actividad antimicrobiana de los péptidos por desestabilizar su conformación debido a las fuerzas electrostáticas (62).

Estos péptidos pueden clasificarse en cuatro grupos estructurales:

1. Hoja β estabilizados por dos o cuatro puentes disulfuro (beta-defensina, plectasina).
2. Péptidos α -hélice (LL-37, cecropina).
3. Estructuras extendidas ricas en glicina, prolina, triptófano, arginina o histidina (indolicina).
4. Péptidos "loop", con un puente disulfuro (tanatina).

Modificaciones postransduccionales como glicosilación, circularización, y amidación de extremos de los péptidos antimicrobianos en residuos de serina, treonina y cisteína crea péptidos más estables y menos susceptibles a las proteasas del procesamiento de antígeno y por lo tanto hace difícil la obtención de anticuerpos contra ellos (62).

Los péptidos antimicrobianos catiónicos son atraídos por fuerzas electrostáticas de las superficies bacterianas con cargas negativas en la membrana externa en gram-negativas. Los responsables de estas cargas son los fosfolípidos aniónicos y los grupos fosfato del LPS (62, 64, 65).

Se han elucidado diferentes mecanismos, por los cuales, estos péptidos actúan como antimicrobianos, desde su acción en blancos intracelulares, disminuyendo la actividad enzimática, interacciones con el ADN y el ARN que

disminuyen la síntesis de proteínas o de la pared celular. El mecanismo principal es la desestabilización directa de la fluidez de la membrana y del gradiente de potencial. Microscópicamente, se pueden observar los poros así como estructuras en forma de burbuja que sobresalen de la membrana de las bacterias, denominados “blebs”; tres modelos han sido propuestos para explicar la desestabilización de la membrana citoplasmática (Fig. 7) (62, 64-67):

Modelo de Barril: Cuando la proporción péptido/lípido es muy alta en la bicapa, los péptidos comienzan a orientarse perpendicularmente formando un poro revestido de péptidos, donde la parte hidrofílica está orientada hacia el centro del poro y como consecuencia hay desequilibrio osmótico.

Poros Toroidales: Concentraciones limitantes de péptidos, forman poros transitorios en donde los fosfolípidos se curvan hacia adentro del poro, los péptidos terminan en ambos lados de la bicapa, disipando gradientes de electrones.

Modelo de Carpeta: La acumulación de moléculas peptídicas en la membrana se orientan paralelamente en la superficie de la membrana cubriéndola como una “carpeta”. Esto hace que los péptidos sean atraídos a las cabezas de los fosfolípidos, y cuando las concentraciones son muy altas el resultado es la ruptura de la membrana. Los péptidos por su naturaleza anfipática actúan como un detergente formando micelas eventualmente.

Además de actuar como antimicrobianos directos afectando la membrana citoplasmática o en blancos intracelulares bacterianos, los AMPs inducen diferentes respuestas relacionadas con células de la inmunidad innata (monocitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliales). La inmunomodulación por los péptidos antimicrobianos resulta en un control de la inflamación, promoción de la reparación de heridas e inicio de respuestas inmunes adaptativas. (63)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de muchos péptidos antimicrobianos *in vitro* generalmente es mayor que las concentraciones fisiológicas basales. En mamíferos estos péptidos tienen generalmente actividad antimicrobiana débil a condiciones fisiológicas y su capacidad para modular la

respuesta inmune a través de una variedad de mecanismos parece ser la más importante (68). Estos péptidos regulan la expresión génica del hospedero aumentando la liberación de quimiocinas y regulando la actividad de células inmunes (66-68).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos.⁶⁵

Característica	Observaciones
Tamaño	Son moléculas de bajo peso molecular de entre 10 a 100 aminoácidos (AA).
Secuencia	Generalmente contienen AA básicos como Lisina y Arginina e hidrófobos como Alanina, Leucina, Fenilalanina o Triptófano. Las relaciones hidrofobicidad: residuos cargados pueden ser 1:1, 2:1
Carga	Péptidos altamente catiónicos son más activos que los neutros o menos positivos (entre +2 a +9)
Estructura Conformacional	Incluyen α -hélices, hojas β antiparalelas. Los α -hélice anfipáticos son más activos que otros sin estructura secundaria definida.
Hidrofobicidad	Permite a los péptidos según su coeficiente de partición colocarse en la bicapa lipídica.
Anfipaticidad	Los residuos de AA hidrofílicos se alinean de un lado y los hidrofóbicos en el lado opuesto en una molécula helicoidal.
Punto isoeléctrico alto	Sus puntos isoeléctricos son cercanos a 10, así que son activos a pH fisiológico.

Los efectos de los AMPs son complejos, incluyendo tanto anti-inflamatorios como proinflamatorios en estudios *in vivo* e *in vitro*.

Las propiedades inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos comprenden (Fig 8):

1. Reducción en los niveles de citocinas proinflamatorias producidas en respuesta a LPS.
2. Regulación de la expresión de citocinas, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.
3. Estimulación de la angiogénesis.
4. Aumento de la regeneración de heridas.
5. Reclutamiento de leucocitos.
6. Diferenciación de macrófagos y leucocitos.

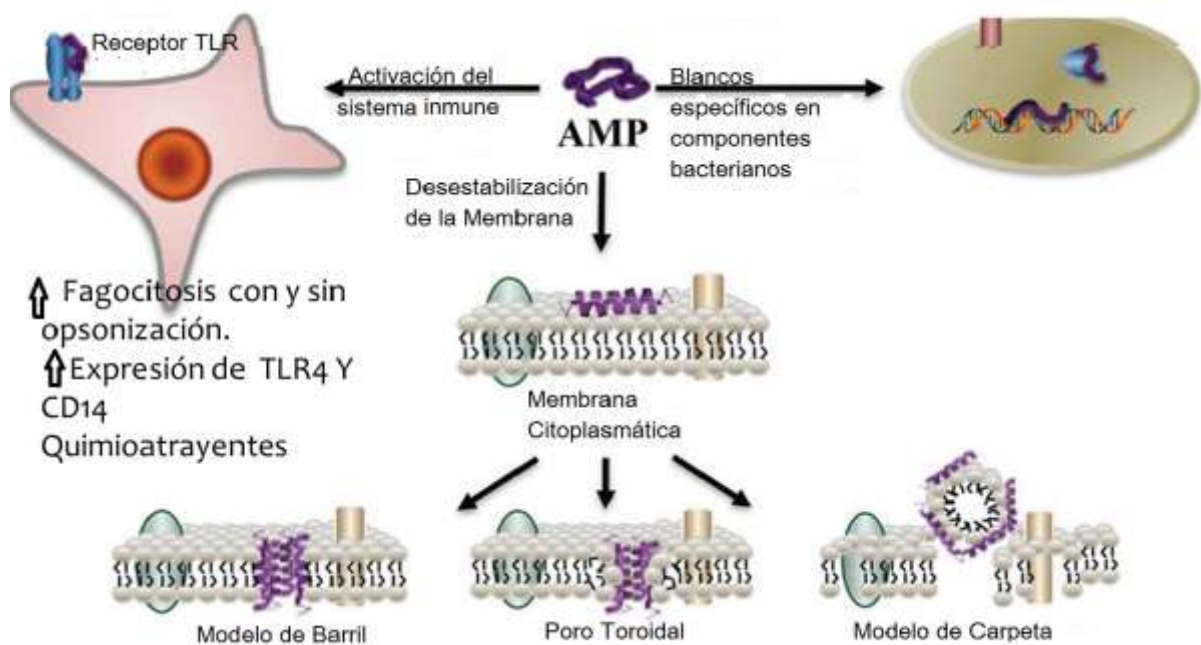


Fig 7. Múltiples funciones de los péptidos antimicrobianos. Antimicrobianos directos e inmunomodulación. TLR: receptor Toll like. Modificado de: Oyinloye B. et al. *Current Drug Targets*. (2014) (63).

Por ejemplo LL-37 tiene la habilidad de regular la expresión de genes inhibiendo total o parcialmente los pro-inflamatorios, mientras que regula positivamente las vías de citocinas anti-inflamatorias.

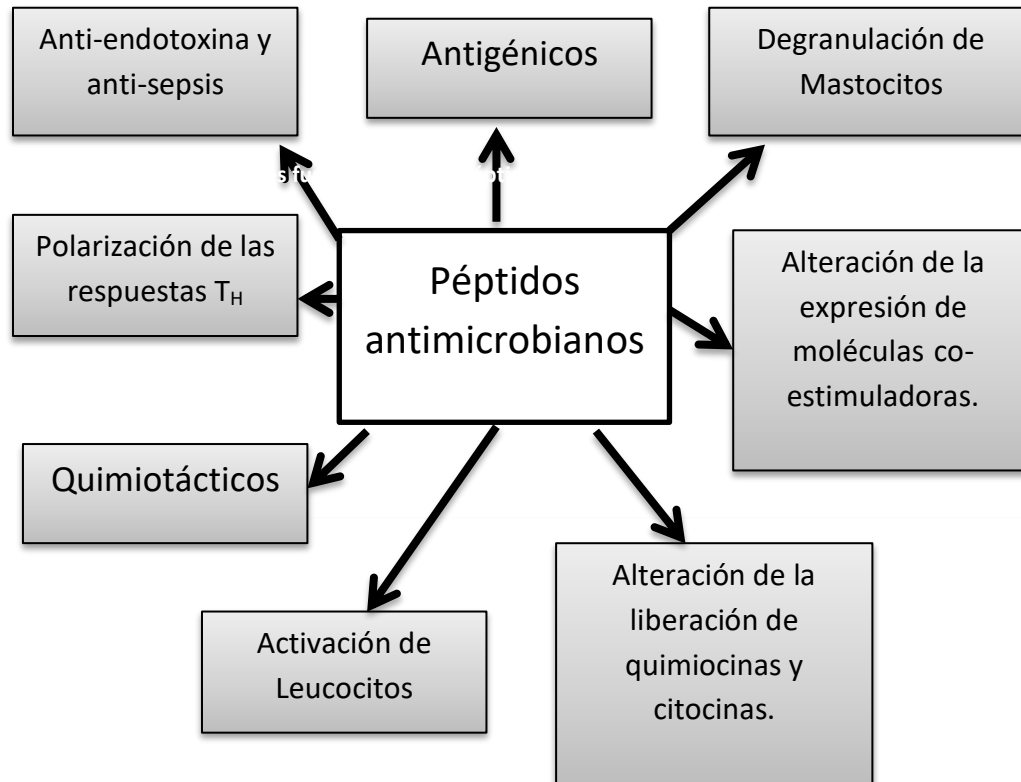


Figura 8. Acciones inmunomoduladoras de péptidos antimicrobianos. Modificado de: Hilchie A, et al. Nature Chemical Biology. (2013) (66).

Algunos AMPs funcionan como agentes anti-sépticos impidiendo la activación de macrófagos por LPS o LTA e inhibiendo la síntesis de TNF- α , pero también estimulan la expresión de genes de quimiocinas y sus receptores como IL-8, MCP-1, CXCR4, CCR2 (69).

Las β -defensinas han mostrado ser quimioatrayentes de células que expresan el receptor CCR6 y CCR2, aunque sin inducción de flujo de calcio intracelular, pero LL-37 incrementa el flujo de calcio a través del receptor CXCR2 en monocitos y neutrófilos (70).

Otros péptidos antimicrobianos como IDR-1002 e IDR-1, que son péptidos sintéticos derivados de la catelicidina, aumentaron la producción de las quimiocinas, CCL2, CXCL8, CXCL1 y CCL7 en macrófagos derivados de la médula ósea y en células de lavado peritoneal de ratón, así como en células mononucleares de sangre periférica humanas en modelos de infección por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (71).

Aunque las bacterias han generado mecanismos de evasión hacia estas moléculas, es mucho menor la resistencia a péptidos antimicrobianos respecto a los antibióticos comunes, gracias a la variabilidad de su mecanismo de acción.

Los AMPs han cobrado importancia como fármacos duales antimicrobianos-inmunomoduladores a partir de los cuales se ha trabajado en mejorar su estructura y acción de forma sintética, además de estudiar su sinergismo con antibióticos (72, 73).

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y FAGOCITOSIS

Los AMPs también funcionan como inmunomoduladores haciendo más eficiente la fagocitosis de patógenos por macrófagos, por ejemplo se ha demostrado que LL-37 opsoniza bacterias gram-negativas y gram-positivas fomentando su fagocitosis vía Mac-1 (antígeno de macrófagos 1, es un complemento de CR3 un PRR) y elevando la expresión de Fc γ R (receptor específico para la región Fc de la inmunoglobulina IgG), CD14 (correceptor de TLR4 para reconocimiento de LPS) y TLR4 en macrófagos. Además aumentó la fagocitosis de bacterias opsonizadas con IgG y no opsonizadas por células THP-1 por un mecanismo dependiente de TLR4 (54, 69, 75-77).

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CONTRA BIOPELÍCULAS

Los péptidos catiónicos como las defensinas, lactoferrina e histatinas han mostrado tener potente actividad contra biopelículas; se han producido péptidos sintéticos tomando como base los producidos por los organismos vivos, mejorando su actividad antimicrobiana y conservando su función inmunomoduladora. Se puede encontrar una tabla donde se recopilan los péptidos antimicrobianos contra biopelículas en la referencia 78. Algunos AMPs actúan sinérgicamente al usarse junto con antibióticos contra biopelículas. Existe una secuencia consenso en estos AMPs que se cree tiene actividad contra biopelículas: FRIRVRV (78).

De la Fuente Nuñez y colaboradores, demostraron que el péptido 1018 tenía un efecto de amplio espectro a concentraciones subinhibitorias contra biopelículas preformadas, afectando su estructura y a concentraciones letales eliminándolas, afectando un gen relacionado con la respuesta al estrés (79). Otro grupo mostró que este mismo péptido y su combinación con algunos antibióticos como Ciprofloxacina, potenciaba su acción para la erradicación y prevención de biopelículas, disminuyendo las concentraciones inhibitorias de los antibióticos hasta 64 veces (73).

Diferentes péptidos antimicrobianos catiónicos (LL-37, CAMA (cecropina(1-7)-melitina A(2-9)amida), melitina, beta defensina 2 humana, y magainina) solos y en combinación con antibióticos disminuyeron la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y destruyeron a las biopelículas preformadas incluso a concentraciones subinhibitorias (80).

Igualmente, De la Fuente Nuñez y colaboradores (81), definieron otro péptido sintético catiónico 1037 derivado de LL37 como anti-biopelículas, el cual previene la adherencia en superficies inertes de hasta un 50% de biomasa bacteriana, principalmente de bacterias gram-negativas (*P. aeruginosa* y *Burkholderia cenocepacia*) cultivadas en presencia del péptido. Este péptido inhibió la motilidad “swimming” y “swarming” (relacionadas con la formación del biofilm) así como la expresión de genes relacionados con la motilidad. La acción del péptido en la motilidad tipo “twitching” implicada en promover el desensamble de la biopelícula era estimulada en presencia de este péptido (81). Este mismo grupo describió otro péptido, 1018, con una actividad anti-biopelícula e inmunomoduladora (82), mostrando por microscopía electrónica de barrido una reducción en el grosor del 50% aproximadamente, así como células bacterianas dañadas (Fig 9).

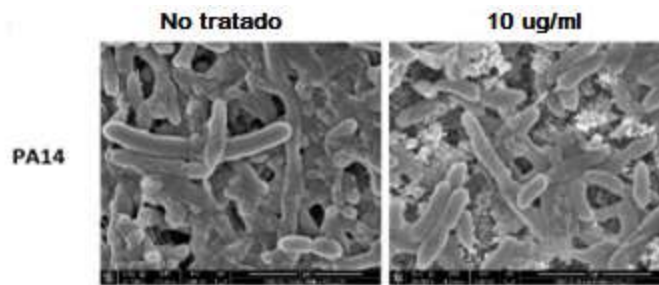


Figura 9. Efecto del péptido 1018 en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* observado por microscopía electrónica de barrido. Se desarrollaron en discos de hidroxiapatita por tres días y tratados con el péptido (10 $\mu\text{g/ml}$) tres veces cada 24 horas, aumento 20000X. Fuente: De La Fuente Nuñez. Antibiotics. (2014) (82).

Se propuesto algunos mecanismos por los cuales estos AMPs cumplen su acción anti-biopelículas (Fig. 10). Principalmente los péptidos antimicrobianos estimulan la motilidad “twitching”, disminuyen las motilidades “swimming” y “swarming”, además de alterar la respuesta de “quorum-sensing”. Promueven un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y modifican la membrana celular (78). Los AMPs por lo tanto inhiben la adhesión bacteriana a la superficie, previenen el establecimiento tempranos del biofilm y además modifican las biopelículas preexistentes.

También se han empleado péptidos antimicrobianos adsorbidos o unidos covalentemente sobre superficies de poliestireno u otros materiales para prevenir el crecimiento bacteriano y el establecimiento de biopelículas (83). Por ejemplo, se ha evaluado poliestireno tratado con un péptido antimicrobiano insertado en la superficie del plástico y su estabilidad en diferentes condiciones (temperatura, pH) resultando en una actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7 entre otras bacterias (84). Un grupo de investigación mostró (85) que algunos péptidos adheridos a placas de celulosa que fueron previamente tratadas con estreptavidina tuvieron un efecto antimicrobiano contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Candida albicans* medido como lumiscencia dependiente del consumo de energía por los microorganismos.

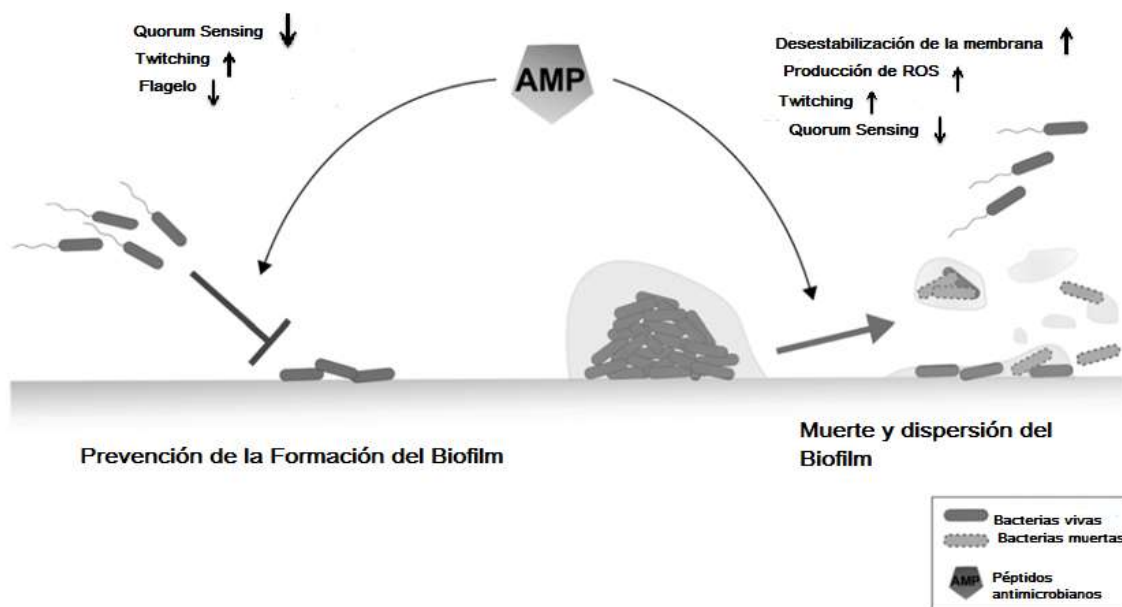


Figura 10. Mecanismos involucrados en el efecto anti-biopelículas de los AMPs. Modificado de: Stempel N, et al. *Current Pharmaceutical Design*. (2014) (78).

LAS QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son proteínas quimiotácticas de bajo peso molecular (7-12kDa) que controlan los patrones migratorios así como la posición de todas las células inmunes. Existen 50 quimiocinas en total de humanos y ratones, además de 20 receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas Gi heterotriméricas (86). Algunos receptores tienen varios ligandos mientras que otros son específicos de una quimiocina. Estas citocinas contribuyen en diversos procesos fisiológicos y patológicos como la embriogénesis, la inflamación, desarrollo del sistema inmune, regeneración de heridas, metástasis y tumorigénesis (87-89).

Las quimiocinas se subdividen en cuatro familias: CXC, CC, C y CX3C, en base a los cuatro residuos de cisteína conservados que las conforman en su extremo amino y a los aminoácidos que las separan. Las quimiocinas CXC (conocidas como α) un residuo aminoácidos separa las dos primeras cisteínas,

mientras las quimiocinas de la familia CC (conocidas como β) las primeras dos cisteínas son adyacentes entre ellas, las quimiocinas C (quimiocinas γ) tienen solo dos cisteínas en su estructura de los cuatro residuos conservados, la familia CX3C (δ) presenta tres residuos de aminoácidos entre los dos primeros residuos de cisteína y un dominio transmembranal parecido a la mucina (87, 90, 91) (Fig.11).

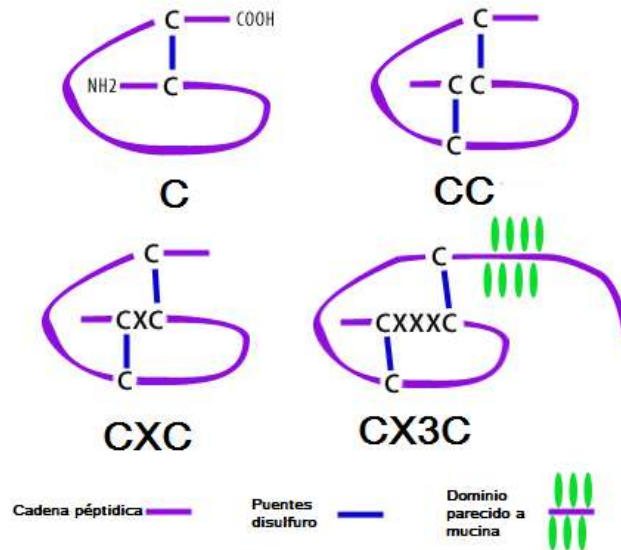


Figura 11. Clasificación de las quimiocinas según su estructura. Se muestran la conformación de cada una (ver descripción en el texto). Modificado de: BioLegend Chemokines and Chemokine Receptors.(2017) (91).

Los receptores de quimiocinas se activan generalmente a través de su extremo amino, localizado en su dominio extracelular. Algunos receptores de quimiocinas pueden sufrir cortes enzimáticos en su porción extracelular, dando lugar a una parte del mismo en su forma soluble. Esta parte soluble del receptor puede competir por la unión de la quimiocina y así modular su respuesta. Existe un mecanismo natural para regular directamente la función de las quimiocinas; hay proteasas que las procesan, generando isoformas antagonistas o agonistas más potentes. (87). En la tabla 4 se muestran solo las quimiocinas de la familia CC, el grupo donde pertenece la quimiocina que da origen a CDAP-4.

Tabla 4. Quimiocinas CC y sus receptores: Clasificación, Expresión Celular y Funciones. *

FUNCIÓN	RECEPTOR	QUIMIOCIINA	EXPRESION
Migración y activación de Mo, LT, LNK, CDI, Eso	CCR1	CCL3(L1),CCL5,CCL7, CCL16	Mo, Fb, LT, LB, CDs Ep, End
Migración y activación de LT, Migración de Mo, Bas, CDs	CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13	Eos, Nt, Mac, Fb, End
Migración y activación de LT (Th ₂), migración de Eos, Bas, Mo	CCR3	CCL5, CCL11, CCL13, CCL15, CCL21, CCL24, CCL26, CCL28	Mo, Timo, Tejido Pulmonar, Intestinal, OLS
Migración y activación de LT (Th ²), migración de Treg, NK, DCs, Homing de LT a piel.	CCR4	CCL17,CCL22	Mo, Timo, Tejido Pulmonar, Intestino, OLS
Migración de Mo, Mac, NK, LT, (Th ₁), timocitos	CCR5	CCL3, CCL4(L1), CCL5, CCL13	Mo, LT, LB, DC, CEnd, CEp, Fb
Migración de CDI, LT Mem, LTh ₁₇ , Homing de LB y DC a GALT	CCR6	CCL20, CCL21	MO, CD, Tejidos Linfoides, CEnd
Migración de Mo,	CCR7	CCL19, CCL21	Tejidos

* Modificado de: García Zepeda E. Comunicación personal. 11/Enero/2016

Mac, CDM, Homing de LT y LB a OLS			Linfoides, CEnd
Migración de Mo, Mac, LT (Th₂), Treg, Homing de LT a piel	CCR8	CCL1, CCL18	Mo, LT, CEp
Migración de Mac, CD, NKT, Timocitos, Homing de LT a Intestino, LB	CCR9	CCL25	CEst (Timo), CEp (Muc Int), DCs
Migración de LT, Homing de LT a piel, Homing de CP IgA a MALT	CCR10	CCL27, CCL28	CEp (Muc Int), DCs, Quer, Cep

Mo: Monocitos, LT: Linfocitos T, Treg: Linfocitos T reguladores, LNK: Linfocitos asesinos naturales, CDI: Células Dendríticas Inmaduras, CDM: Células dendríticas maduras, Eo: Eosinófilos, Bas: Basófilos, Nt: Neutrófilos/Granulocitos, Mac: Macrófagos, Fb: Fibroblastos, LB: Linfocitos B, CEp: Células Epiteliales, CEnd: Células endoteliales, CEst (Timo): Células estromales, Cep (Muc Int): Células Epiteliales de Mucosa Intestinal, MO: Médula ósea, Quer: Queratinocitos, ILC: Células linfoides innatas, GALT: Tejido Linfoide asociado a Intestino, MALT: Tejido Linfoide asociado a mucosas, OLS: Organos Linfoides secundarios.

QUIMIOCINA CCL13

En 1996 se clonó por primera vez un gen humano que según sus características estructurales podía tener actividad como quimiocina y se denominó MCP-4. Su expresión es mayor en intestino delgado, colon y pulmón (92).

Esta proteína tiene 98 aminoácidos cuando está inactiva, pero su forma activa la conforman 75 aminoácidos, después de ser separada de su péptido señal

por una peptidasa. Su estructura terciaria (Fig. 12) la constituyen tres cadenas β anti-paralelas centrales y una α -hélice en su extremo carboxilo terminal.

La parte amino terminal forma un bucle unido al resto de la proteína por puentes disulfuro. Esta quimiocina tiene una carga superficial positiva que le confiere actividad antimicrobiana principalmente contra gram-negativas (93, 94).

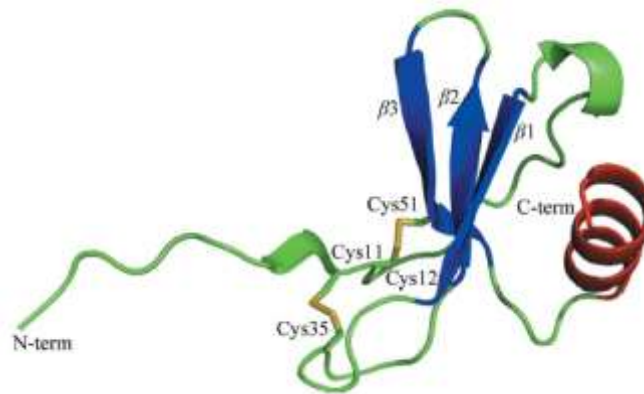


Figura 12. Estructura conformacional de CCL13. Constituida por tres hojas β en color azul, el α -hélice en rojo, los dos puentes disulfuro (Cys11-Cys35 y Cys12-Cys51) representados en amarillo. Fuente: Barinka C and Lubkowski J. Biological Crystallography.⁹⁴ 2007.

QUIMIOCINAS Y PÉPTIDOS DERIVADOS COMO ANTIMICROBIANOS.

Algunos reportes demuestran que las quimiocinas pueden actuar directamente como microbicidas debido a sus características fisicoquímicas que comparten con los AMPs: son catiónicas, proteínas de bajo peso molecular, anfipáticas y con altos valores de punto isoelectrico (95).

La primera quimiocina que mostró ser antimicrobiana fue CXCL7, no en su forma completa, pero si fragmentos de ésta aislados de gránulos de plaquetas. En total, 23 quimiocinas incluyendo sus péptidos derivados se han reportado con actividad antimicrobiana (10 de la familia CXC y 13 de la familia CC). Aquí se mencionan algunas: CXCL7 (derivados de carboxilo terminales), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL6, CXCL14, CCL20, CCL28, CCL13, CCL1, CCL25 (96). Su acción, como la de los AMPs se ve afectada por la concentración de iones en el

medio, concentraciones >100 mM de sodio la disminuye. Para la mayoría de las quimiocinas antimicrobianas, las concentraciones para matar a patógenos son mil veces mayores que la necesaria para la quimiotaxis, por lo tanto su concentración en fluidos biológicos no es suficiente para su actividad antimicrobiana (95).

Leonard T. y colaboradores estudiaron la relación estructura-actividad antimicrobiana de algunos péptidos derivados de quimiocinas como [MIP-3 α (Macrophage inflammatory protein-3 α), IL-8 (Interleucina 8), NAP-2 (Neutrophil activating Protein-2) y TC-1 (Trombocidina)], observando que el péptido MIP-3 α ₅₉₋₇₀ tiene una buena actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. Su conformación en alfa hélice tuvo una fuerte influencia en su actividad. Esta conformación se veía afectada por el disolvente empleado pues se necesitaba un ambiente hidrofílico para formar su estructura secundaria (97).

Aunque no todas las quimiocinas poseen actividad antimicrobiana, algunos péptidos derivados de éstas son capaces de matar bacterias, principalmente derivados de la región carboxilo terminal con altas cantidades de aminoácidos catiónicos (98), (Tabla 5). En la tabla se subraya en rojo el péptido evaluado en este trabajo.

En cuanto a los mecanismos de la acción antimicrobiana de estas no se han elucidado por completo, aunque por microscopía electrónica se ha observado que las quimiocinas inducen lisis bacteriana, disrupción de la membrana y formación de “blebs” (95).

Además, las quimiocinas y los péptidos antimicrobianos distinguen entre las membranas bacterianas y las de las células eucariontes posiblemente por la composición lipídica, en las células eucariontes la parte extracelular de la membrana no tiene carga.

Tabla 5. Péptidos derivados de quimiocinas (CDPs) usados como antimicrobianos⁹⁸

CDP	Quimiocina	Región	Blancos Microbianos
vMIP-II r1-21	vMIP-II	N-terminal	Inhibe la entrada de HIV-1
MIP-3α₅₁₋₇₀	CCL20/ MIP-3 α	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35)
MIP-3α₅₉₋₇₀	CCL20/ MIP-3 α	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35)
TC-1	CXCL7/NAP-2	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35), <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633, <i>S. aureus</i> 42D, <i>Cryptococcus neoformans</i> *IC, <i>Candida glabrata</i> Cl.
IL-8₈₁₋₉₉	CXCL8/IL-8	C-terminal	<i>E. coli</i> MG1655, <i>Salmonella enterica</i> MS10, <i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG 49243, <i>Helicobacter pylori</i> SS1, <i>Streptococcus pyogenes</i> CCUG49246
CCL13₅₇₋₇₅ <u>CDAP-4</u>	CCL13/MCP-4	C-terminal	<i>E. coli</i> ATCC25922, <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028, <i>S. typhi</i> ATCC9993, <i>K. pneumoniae</i> PIMM-UNAM28, <i>P. aeruginosa</i> ATCC15692, <i>P. aeruginosa</i> *IC
RP-1	CXCL4/PF4	C-terminal	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania infantum</i> L. <i>chagasi</i> , L. <i>braziliensis</i> Cl
PMX207, PMX1207	CXCL4/PF4	C-terminal	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 27660, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145, <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883

*IC: aislado clínico

ANTECEDENTES

CDAP-4, un péptido sintético derivado de la parte carboxilo terminal de la quimiocina CCL13 tiene un potencial de superficie positivo (Fig. 13) que puede ser el responsable de su actividad antimicrobiana actuando sobre la membrana bacteriana cargada negativamente. Este péptido tiene 19 residuos aminoacídicos $^{57}\text{KWVQNYMKHLGRKAHTLK}^{75}$ y comparte algunas propiedades fisicoquímicas con los AMPs (Tabla 6) (99).

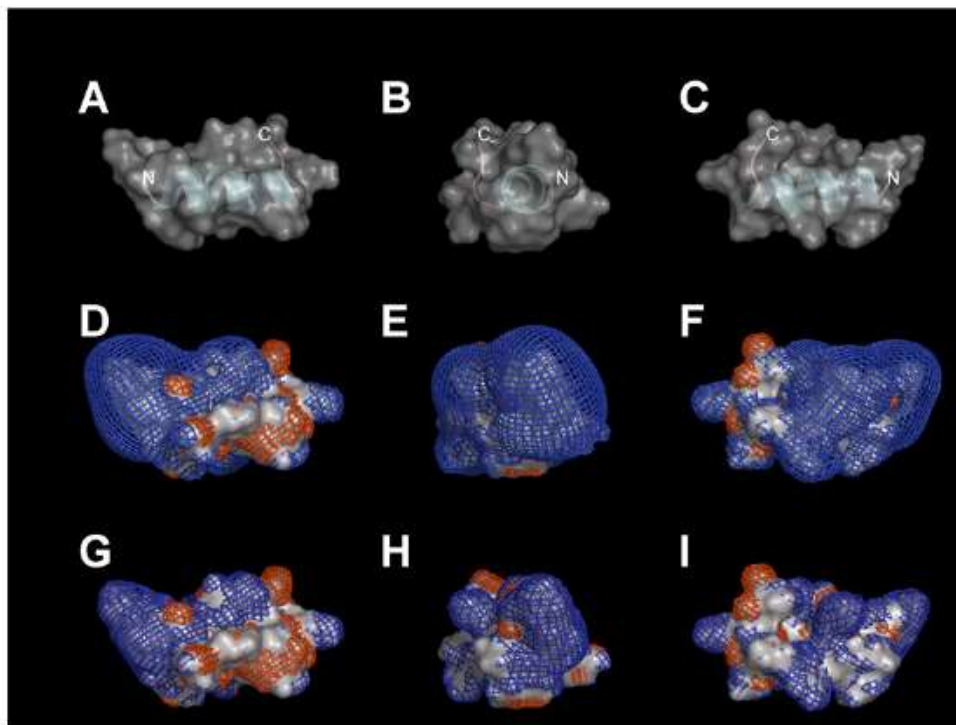


Figura 13. Modelo estructural *in silico* de CDAP-4. (A-B) y potencial electrostático ± 4 del péptido (D-F) en azul se muestra el potencial positivo y en rojo el potencial negativo. (G-I) Potencial electrostático cuando se agrega 150 mM de NaCl. Fuente: Martínez Becerra F. Biochemical and Biophysical Research Communication. (2007) (99)

Por microscopía electrónica de transmisión se observó que la exposición de *P. aeruginosa* a CDAP-4 a una concentración letal causa pérdida del contenido intracelular y lisis. Mientras que a una dosis debajo de la CMI se observa pérdida de la integridad de la membrana (Fig 14).

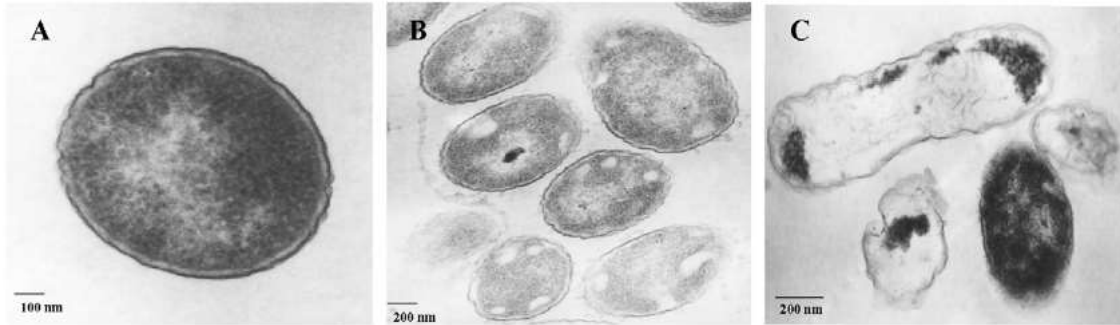


Figura 14. Análisis de la actividad antimicrobiana de CDAP-4 por microscopía electrónica de transmisión. *P. aeruginosa* ATCC 15692 fue tratada con A) 0 μM , B) 0.42 μM , C) 4.2 μM CDAP-4. Fuente: Martínez Becerra F. Biochemical and Biophysical Research Communications. (2007) (99).

En nuestro laboratorio se describió, que la actividad antimicrobiana de CDAP-4 se es afectada por la presencia de NaCl a concentraciones mayores de 150 mM. En cuanto al pH el rango de actividad óptima para CDAP-4 se encuentra de 6 a 8 (100)

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de AMP versus CDAP-4

PROPIEDAD	AMPs	CDAP-4
Tamaño	10 a 100 aminoácidos	19 AA
Carga neta	+2 a +9	+4
Estructura Conformacional	α -hélice y hojas β antiparalelas	α -hélice
Punto isoeléctrico	Cercano a 10	10.58

Tabla elaborada con la revisión bibliográfica de AMP y con los datos presentados en Martínez Becerra F. Biochemical and Biophysical Research Communications. (2007) (99).

Igualmente datos previos, revelaron que CDAP-4 tiene un efecto antibiopelícula *in vitro* contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*, manifestando inhibición hasta del 85 % sobre la adhesión en placas de polivinilo por el método de tinción con cristal violeta (101).

Por otro lado, experimentos preliminares demostraron que CDAP-4 afectaba la actividad fagocítica de células mononucleares, aumentando las bacterias engullidas y haciendo más eficiente la actividad bactericida de células THP-1 y macrófagos (Rodríguez-Gama, Datos no publicados).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La bacteria *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista causante de infecciones tanto agudas como crónicas en pacientes inmunocomprometidos o con fibrosis quística, es uno de los principales microorganismos en infecciones nosocomiales, pues ha desarrollado varios mecanismos de patogenicidad entre ellos la formación de biopelículas que representa un mecanismo de resistencia hacia los antibióticos y perfecta evasión del sistema inmune. Además presenta resistencia intrínseca a varios antibióticos (betalactámicos, carbapenémicos, fluoroquinolonas), por lo que *P. aeruginosa* se convierte en un problema de salud por su difícil erradicación.

Gracias a su crecimiento en biopelículas esta bacteria puede colonizar superficies inertes como dispositivos médicos (catéter, prótesis, sondas), diseminando y empeorando la infección.

Por todo lo anterior es necesario estudiar y desarrollar nuevas moléculas que solas o en conjunto con los antibióticos comunes, posean la capacidad de erradicar las biopelículas.

En los últimos años, la evaluación de péptidos antimicrobianos contra la formación de biopelículas ha tenido resultados favorables, y ya que las quimiocinas y péptidos derivados comparten muchas propiedades en común con los péptidos antimicrobianos, se estudió el efecto de CDAP-4 como posible antibiopelículas.

JUSTIFICACIÓN

Los péptidos antimicrobianos han demostrado ser eficientes contra biopelículas. De manera interesante, las quimiocinas o péptidos derivados de éstas comparten muchas propiedades fisicoquímicas en común con éstos. En nuestro laboratorio se demostró que la quimiocina CLL13 tiene efectos antimicrobianos y para determinar que porción de la proteína era la responsable se emplearon péptidos sintéticos basados en la secuencia de CLL13. Uno de estos péptidos, derivado de la parte carboxilo terminal de CCL13, presentó actividad como péptido antimicrobiano similar a las defensinas. CDAP-4, es efectivo contra *P. aeruginosa* tanto en su forma planctónica como en biopelículas formadas en materiales como el polivinilo, sin embargo no se conoce si su efecto anti-biopelículas es igual en otros materiales ni los mecanismos por los cuales CDAP-4 las inhibe *in vitro*. Por lo tanto es necesario el análisis de los efectos de CDAP-4 en estas estructuras para poder dilucidar los mecanismos y proponer su potencial uso como antimicrobiano.

HIPÓTESIS

El péptido CDAP-4 presentará un efecto inhibitor en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*; afectando mecanismos implicados en la motilidad bacteriana así como favorecerá su eliminación por células monocíticas *in vitro*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del péptido antimicrobiano CDAP-4 en modelos *in vitro* de formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y en su eliminación por células fagocíticas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de CDAP-4 en biopelículas formadas *in vitro* en microplacas por tinción con cristal violeta.
2. Evaluar si las motilidades “swarming” y “twitching”, son afectadas por CDAP-4.
3. Determinar el efecto de CDAP-4 en la biopelícula por microscopía electrónica de barrido.
4. Evaluar el efecto de CDAP-4 en la eficiencia de eliminación de biopelículas por células monocíticas *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS EMPLEADAS

PAO1

Pseudomonas aeruginosa ATCC 39324

Pseudomonas aeruginosa mucoide 5278 Aislado Clínico

CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las cepas empleadas en este trabajo se crecieron en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB, ver apéndice 2) a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante 18 horas (cultivo “overnight”), posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con buffer de fosfatos salino (PBS 0.01M) y se resuspendieron en medio LB fresco con 20% de Glicerol. La suspensión se colocó en crioviales que se guardaron a -70 °C.

CULTIVO DE TRABAJO

La suspensión bacteriana contenida en los crioviales se descongeló, según la cepa a emplear. Se tomaron 10 µl para inocularlos en 10 ml de medio LB fresco. El nuevo cultivo, se incubó durante 18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm.

Pasadas las 18 horas se tomaron 2ml del cultivo de trabajo de las diferentes cepas y se colocaron en tubos eppendorf ®. Los tubos eppendorf ®, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante resultante se eliminó y el botón se lavó con PBS 0.01 M. Posteriormente el botón se resuspendió en 1 ml de PBS 0.01 M. A la suspensión anterior, se le ajustó la absorbancia para que fuera equivalente al estándar de McFarlan No. 0.5 (ver anexo 1). La suspensión ajustada (equivalente a 1×10^8 UFC/ml), se diluyó 1:20 en PBS 0.01 M.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL PÉPTIDO CDAP-4 FRENTE A CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

La CMI se obtuvo por microdilución en caldo. Se realizaron diluciones del péptido (CDAP-4), en medio TSB al 1%, a las concentraciones de 256 µgml⁻¹ (109.4 µM), 128 µgml⁻¹ (54.7 µM), 64 µgml⁻¹ (27.3 µM), 32 µgml⁻¹ (13.7 µM), 16 µgml⁻¹ (6.8 µM), 8 µgml⁻¹ (3.4 µM).

Posteriormente en una placa de poliestireno con 96 pozos de fondo plano, estéril, se colocaron 100 µl de cada una de las diferentes diluciones de CDAP-4; las primeras dos filas de arriba hacia abajo, se llenaron solo con medio TSB 1 %

sin péptido. Estas dos filas se tomaron como el control de esterilidad y el control negativo sin péptido (Ver apéndice 1). A continuación se inoculó cada pozo con 10 μl del cultivo de trabajo (para tener una concentración bacteriana final de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ UFCml}^{-1}$, en cada pozo). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas sin agitación. Después de este tiempo se observaron las placas y se determinó la CMI como la concentración más baja detectada a simple vista, donde se vio inhibido completamente el crecimiento en los pozos. (102)

FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN MICROPLACAS DE 96 POZOS POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Esta prueba se determinó según el protocolo de O'Toole y colaboradores (103) con algunas modificaciones descritas a continuación.

Inhibición en la formación de la biopelícula. En placas de poliestireno estériles, de 96 pozos de fondo plano, se inocularon 100 μl por pozo de las diluciones correspondientes; 256 μgml^{-1} (109.4 μM), 128 μgml^{-1} (54.7 μM), 64 μgml^{-1} (27.3 μM), 32 μgml^{-1} (13.7 μM), 16 μgml^{-1} (6.8 μM), 8 μgml^{-1} (3.4 μM). Las primeras dos filas se llenaron con medio TSB 1% sin CDAP-4, para los controles (ver apéndice 1). Posteriormente, el cultivo de trabajo se diluyó 1:10, para que fuera equivalente a $5 \times 10^5 \text{ UFCml}^{-1}$. Las placas con las diluciones del péptido, se inocularon con 50 μl de la suspensión $5 \times 10^5 \text{ UFCml}^{-1}$. A continuación se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones estáticas. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados a los pozos con PBS 0.01 M, para eliminar el material no adherido.

Las placas se secaron 2 horas a 37°C. Inmediatamente se tiñó con 150 μl de una solución de cristal violeta 0.1% por 15 min; acto seguido, se retiró el exceso de colorante y se lavaron los pozos con agua destilada. Las placas teñidas se secaron a temperatura ambiente y a posteriormente se agregaron 150 μl de etanol al 90 % a cada pozo. Luego se midió la absorbancia con un lector de placas (ver apéndice 3) a 600 nm. Esta absorbancia nos indica indirectamente que tanta biomasa (biopelícula) quedó adherida a la placa.

Erradicación de la biopelícula. La biopelícula se formó en una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, estéril. Se colocaron 100 μl en cada pozo del cultivo de trabajo diluido 1:10, en medio LB ($5 \times 10^5 \text{ UFCml}^{-1}$). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones estáticas. Pasado el tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante con dos lavados de PBS 0.01M. A continuación se pusieron 150 μl de las diluciones del péptido en medio TSB 1%; 256 μgml^{-1} (109.4 μM), 128 μgml^{-1} (54.7 μM), 64 μgml^{-1} (27.3 μM), 32 μgml^{-1} (13.7 μM), 16 μgml^{-1} (6.8 μM), 8 μgml^{-1} (3.4 μM) y medio sin péptido para los controles (Apéndice 1).

Las placas se incubaron posteriormente 24 horas adicionales a 37°C, en condiciones estáticas, pasadas las 24 horas se procedió con el lavado, la tinción y la lectura como se explicó anteriormente.

Inhibición en la adhesión de la biopelícula. Las placas de poliestireno, se trataron previamente con soluciones del péptido en PBS 0.01 M (150 µl/pozo) a diferentes concentraciones: 256 µgml⁻¹ (109.4 µM), 128 µgml⁻¹ (54.7 µM), 64 µgml⁻¹ (27.3 µM), 32 µgml⁻¹ (13.7 µM), 16 µgml⁻¹ (6.8 µM), 8 µgml⁻¹ (3.4 µM) y PBS 0.01 M sin péptido para los controles (apéndice 1). En seguida, se incubaron durante 24 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Al término de la incubación, se eliminó el líquido de cada pozo y se procedió a inocular con 100 µl de una suspensión bacteriana equivalente a 5 x10⁵ UFC/ml por pozo en medio TSB 1 %. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones estáticas y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, para el lavado, tinción y lectura.

ENSAYO PARA MOTILIDAD “SWARMING”

Para evaluar el efecto de CDAP-4 en la motilidad “swarming” de *P. aeruginosa*, se realizó el ensayo descrito por De la Fuente Núñez C. y colaboradores (81) con algunas modificaciones.

De un cultivo “overnight” en medio LB, se tomaron 2 ml, se centrifugaron, lavaron y el “pellet” se resuspendió en PBS 0.01 M. Posteriormente la suspensión bacteriana se ajustó a una A₆₂₀ de 0.6. A continuación se tomaron 2 µl de la suspensión anterior y se inocularon en el centro de una placa Petri de 60 x 15 mm con medio M9 modificado (ver apéndice 2), con o sin el péptido. La gota se dejó secar y las placas petri se incubaron 24 horas a 37°C. El diámetro de los halos de motilidad se midió con el programa ImageJ.

ENSAYO PARA MOTILIDAD “TWITCHING”

El ensayo de motilidad “twitching” se realizó según Deligianni E. y colaboradores (33) con algunas modificaciones.

A partir de un cultivo “overnight” estriado en agar LB (apéndice 2), se tomó una colonia con la punta de un palillo estéril y se inoculó por picadura en el centro de una placa petri de 60 x 15mm con medio LB al 1.2 % de agar, con el péptido a diferentes concentraciones, 10 µg/ml (4.3µM), 20 µg/ml (8.5 µM), 50 µg/ml (21.4 µM) y sin el péptido para el control negativo. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, posteriormente se midió la superficie de los halos de motilidad con el programa imageJ.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se siguió el protocolo descrito en Deligianni E. y colaboradores (33).

Evaluación del efecto en la formación de la biopelícula. En una placa de 6 pozos con cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro, se pusieron 4 ml de una suspensión bacteriana de la cepa PAO1, equivalente a 1×10^6 UFC/ml con el péptido a la CMI (54.7 μ M) y 0.5 CMI en medio LB. Los cubreobjetos sirvieron como superficie de adhesión para bacteria. La placa se incubó durante 24 horas.

Evaluación en biopelículas preformadas. En una placa de 6 pozos, se dejó crecer la biopelícula en cubreobjetos de vidrio de 18 mm durante 24 horas. Pasado el tiempo, los cubreobjetos se colocaron en 4 ml de medio nuevo con el péptido a la CMI ó 0.5 CMI y se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas. Para el control el cubreobjetos se puso con 4 ml de medio LB sin el péptido. Las bacterias adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas, lavadas, deshidratadas, secadas a punto crítico y cubiertas con oro, para ser observadas con un microscopio de barrido JEOL JSM-5410LV, el procesamiento y observación de las muestras se realizó en la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

CULTIVO DE CÉLULAS THP-1

Se cultivaron células THP-1 en placas petri (corning™ de 100 x 20 mm), como medio de crecimiento se usó RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (ver apéndice 2) y antibióticos (Penicilina/ Estreptomicina 100U/ml). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂, hasta obtener una confluencia de 1×10^6 células /ml. El conteo se realizó con cámara de Neubauer. A continuación, se verificó que las células tuvieran una viabilidad mayor a 95% para los ensayos de infección con PAO1.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CDAP-4 EN CO-CULTIVOS DE CÉLULAS THP-1/ BACTERIAS PLANCTÓNICAS

Se tomó como referencia la metodología descrita por Julen M. y colaboradores (104). En tubos eppendorf® se pusieron 2×10^5 células THP-1 en medio RPMI 1640 sin antibióticos, suplementado con 10% de SFB. A cada tubo posteriormente se le agregó 100 μ l de una suspensión bacteriana en PBS 0.01 M, incubada junto con el

péptido a diferentes concentraciones 256 $\mu\text{g/ml}$ (109.4 μM), 128 $\mu\text{g/ml}$ (54.7 μM), 64 $\mu\text{g/ml}$ (27.3 μM), 32 $\mu\text{g/ml}$ (13.7 μM) y un control sin péptido, durante 1 hora a 37°C. La relación células THP-1/UFC de *P. aeruginosa* PAO1 fue de 1:20.

Los tubos con las células y las bacterias se centrifugaron 3 min a 1300 rpm para favorecer las interacciones bacteria-célula. Se incubaron durante tres horas. Posteriormente las células se lavaron con 1ml de PBS 0.01 M frío, se centrifugaron y se dejaron incubando durante una hora con 1ml de gentamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) para eliminar las bacterias extracelulares residuales. Finalmente se lavaron tres veces con PBS frío, se lisaron con 0.5 ml de agua destilada estéril. Al lisado resultante se le hicieron diluciones 1:10. Las diluciones se plaquearon en agar LB (100 μl) por el método de extensión en placa, para cuantificar las UFC/ml recuperadas.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CDAP-4 EN CO-CULTIVOS DE CÉLULAS THP-1/ BIOPELÍCULAS

Para esta prueba se tomó como referencia los ensayos propuestos por Sasha. y colaboradores (105) con algunas modificaciones.

En placas de 96 pozos con fondo plano, estériles, se inocularon 100 μl de del cultivo de trabajo de *P. aeruginosa* PAO1 equivalente a 5×10^6 UFCml⁻¹ suspendidos en medio LB. Las placas se incubaron 24 horas sin movimiento. Al día siguiente se realizó un lavado con PBS 0.01M. Se tomaron algunos pozos como control de inóculo, para conocer el valor del inóculo inicial. El contenido de los pozos se plaqueo en agar LB por el método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie (106).

A continuación a esta placa con la *P. aeruginosa* PAO1 adherida, se le agregaron 2×10^5 células THP-1 por pozo en medio RPMI con 10% SFB y el CDAP-4 a diferentes concentraciones, 256 $\mu\text{g/ml}$ (109.4 μM), 128 $\mu\text{g/ml}$ (54.7 μM), 64 $\mu\text{g/ml}$ (27.3 μM), 32 $\mu\text{g/ml}$ (13.7 μM). Los co-cultivos se incubaron durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar ese periodo, el contenido de los pozos se mezcló con ayuda de la punta de una pipeta, 20 veces y se realizaron diluciones 1:10. El líquido mezclado de los pozos se sembró en placas de agar LB (24 horas, 37°C) por el método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie para conocer las UFC remanentes después del tratamiento con CDAP-4 en conjunto con las THP-1.

CONTEO BACTERIANO

Para los lisados de la prueba THP-1/Bacterias planctónicas, el cálculo para cuantificar las UFC se hizo tomando en cuenta el factor de dilución y las UFC cuantificadas en las placas.

Para determinar las bacterias remanentes después de la prueba de interacción de biopelículas con las THP-1, se usó el método de goteo en placa descrito por Reed R.W y Reed G. B. (106), de cada dilución, se sembraron gotas de 20 μ l en placas de agar LB. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C y las UFC/ml remanentes se calcularon con la siguiente formula.

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{A}{B} \times C \times D$$

Dónde:

A: No. de colonias por placa

B: No de gotas por placa

C: Número de gotas por ml

D: Factor de dilución

ESTADISTICA

Los datos se presentan como curvas de dispersión de cada uno de los valores obtenidos para tres experimentos independientes por triplicado o duplicado según corresponda (en cada figura se especifica la n). Para encontrar diferencias significativas entre grupos se realizó la prueba ANOVA de una vía, con $p < 0.05$ seguida por un análisis múltiple Dunnett. Se usó el programa Graph Pad PRISM Versión 6.01.

RESULTADOS

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de CDAP-4 sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Inicialmente se determinaron las concentraciones inhibitorias para las cepas empleadas en este estudio (Tabla 7), donde se observa que para la cepa PAO1 y la ATCC 39324 la CMI fue de 54.7 μM , mientras que para el aislado clínico *P. aeruginosa* 5278 la CMI es de 109.4 μM , por lo tanto es mayor que para las otras cepas.

Tabla 7. Concentraciones Mínimas Inhibitorias para diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	FENOTIPO	CMI μM
PAO1	No mucoide	54.7
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 39324	Mucoide	54.7
<i>P. aeruginosa</i> 5278 (aislado clínico)	Mucoide	109.4

Efecto de CDAP-4 en las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.

Posteriormente se determinó el efecto que tenía el péptido CDAP-4 en la prevención de formación de biopelículas (Fig. 15 A, B, C). La concentración que previene la adhesión de *P. aeruginosa* PAO1 en un 50% respecto al control sin el péptido fue de 27.3 μM y es menor a la CMI obtenida. Mientras que para la cepa ATCC 39324 solo se vio un buen efecto a 109.4 μM donde la biomasa es aproximadamente 75 % menos respecto al control y de manera contraria a lo esperado se vio un aumento en la biomasa a concentraciones debajo de 54.7 μM . Para el aislado clínico de *P. aeruginosa* 5278, la CMI disminuyó más del 50%,

aunque a menores concentraciones no se tiene un resultado concluyente por la variabilidad.

También se probó si CDAP-4 tenía un efecto en las biopelículas preformadas (Fig. 16 A y B), para lo cual se dejó que el biofilm creciera previamente por 24 horas y posteriormente se trató 24 horas adicionales con CDAP-4 a diferentes concentraciones. El resultado fue, que para la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (Fig 16 B), el péptido disminuyó la cantidad de biomasa en un 50 % a concentraciones entre 6.8 μM a 54.7 μM . Mientras que para el aislado clínico de *P. aeruginosa* 5278 solo a 109.4 μM se disminuyó un 40% aproximadamente lo adherido respecto al control sin el péptido. Como en la prueba anterior, se observó el fenómeno de aumento de la biomasa respecto al control, después de que se adicionaron concentraciones subinhibitorias (Ver Figura 15). Es importante recordar que tanto la cepa ATCC 39324 como el aislado clínico 5278 tienen un fenotipo mucoso, que probablemente las hace más resistentes al uso de antimicrobianos. Además se ha observado que concentraciones debajo de la CMI de algunos antimicrobianos incrementa la producción de alginato (19, 20, 21), posiblemente es la razón por la cual la biomasa cuantificada sea mayor que cuando no está el péptido.

Adicionalmente, se determinó si el tratamiento de las placas, previamente con una solución del péptido, evitaba la adherencia de bacterias (Fig. 16 C y D). Los resultados mostraron que el pre-tratamiento de placas de poliestireno con CDAP-4 previene la adhesión bacteriana de *P. aeruginosa* PAO1 a 27.3 μM en un 50%, en cambio para las demás concentraciones no hay un efecto notable. Para la cepa 5278 no se vio efecto significativo en la disminución en la biomasa adherida, aunque la gráfica muestra el mismo patrón que para *P. aeruginosa* PAO1 con una tendencia a disminuir a 27.3 μM . Sin embargo se observó de nuevo un aumento de la biomasa a concentraciones subinhibitorias (6.8 μM).

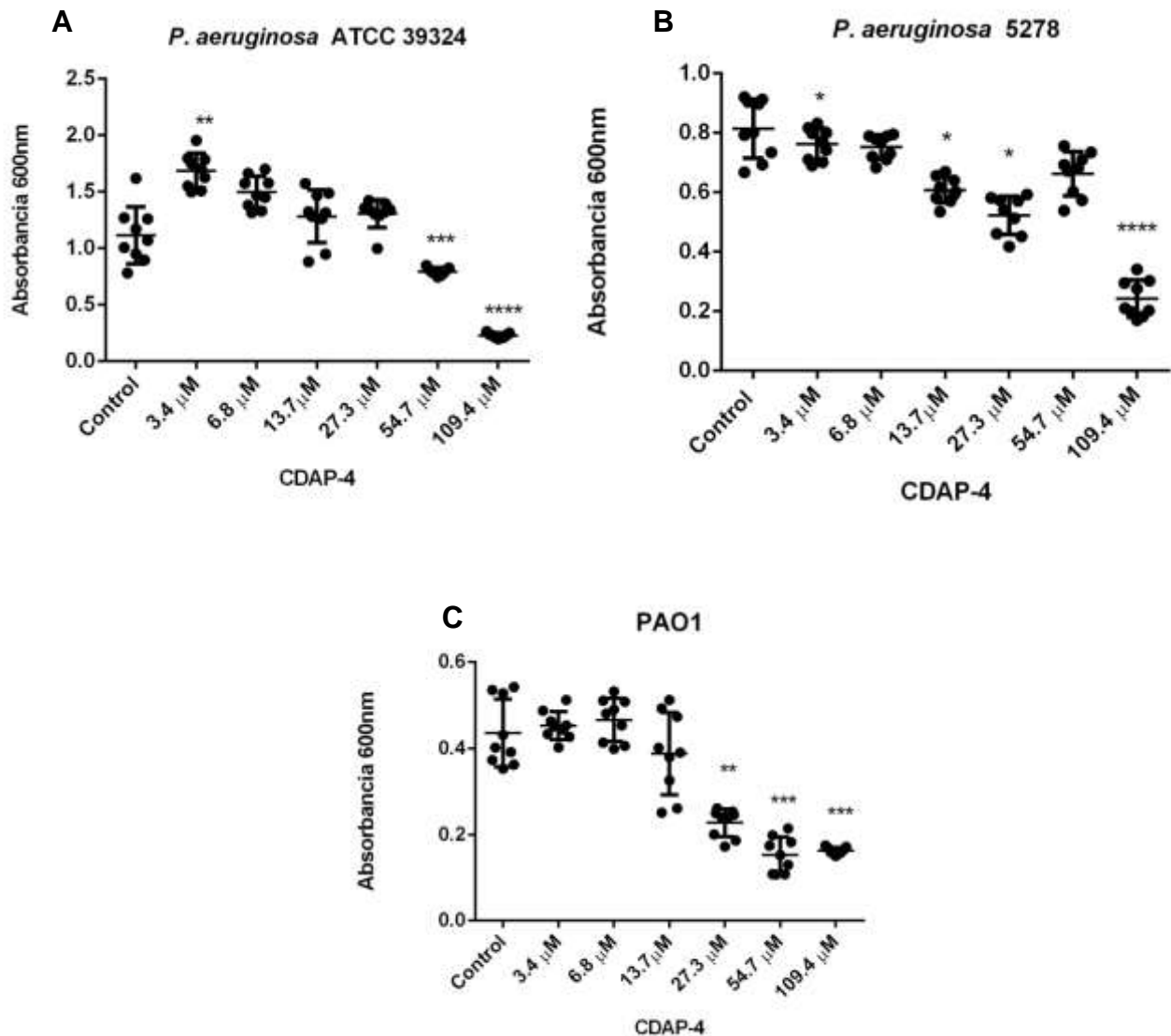


Figura 15. CDAP-4 afecta la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* in vitro.

Cada punto representa un valor de absorbancia después de incubar *P. aeruginosa* junto con CDAP-4, en el control solo se puso medio de crecimiento sin péptido y la cepa bacteriana n=9.

A) Datos de absorbancia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39324 con CDAP-4. **B)** Absorbancia *Pseudomonas aeruginosa* 5872 con CDAP-4. **C)** Valores de absorbancias de PAO1 cultivada con CDAP-4. Gráficos representativos de tres experimentos, realizados por triplicado. * (p=0.027) ** (p=0.003) *** (p=0.0003) **** (p<0.0001)

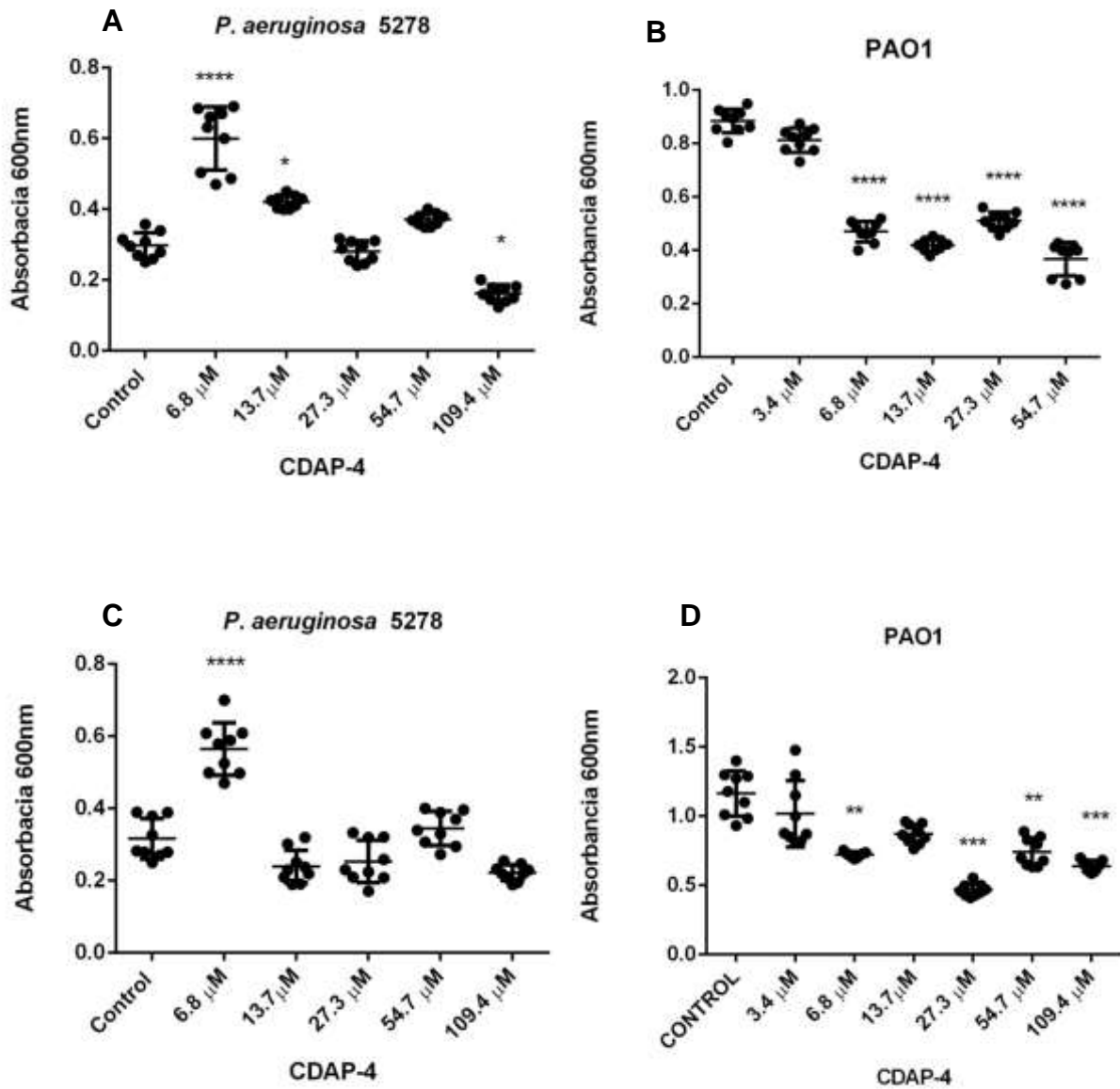


Figura 16. CDAP-4 disminuye las biopelículas pre-formadas de *Pseudomonas aeruginosa* y su adhesión en placas pre-tratadas *in vitro*. Cada punto representa un valor de absorbancia, en el control solo se puso medio de crecimiento sin péptido y la cepa bacteriana n=9.

A y B) Absorbancias obtenidas después de tratar las biopelículas previamente formadas con CDAP-4 (*P. aeruginosa* 5872 y PAO1 respectivamente) Ver metodología. **C Y D)** Valores de absorbancia obtenidas de placas pre-tratadas con CDAP-4 y donde posteriormente se cultivó *P. aeruginosa* 5872 y PAO1 respectivamente. Se realizaron tres experimentos independientes, por triplicado * (p=0.03) ** (p= 0.0071, 0.002) *** (p=0.0005) **** (p<0.0001)

Efecto de CDAP-4 en las motilidades “swarming” y “twitching”

Se evaluó si CDAP-4 tenía un efecto sobre la motilidad “swarming” y “twitching” en las cepas de *P. aeruginosa* (PAO1 y aislado clínico 5278) (Fig. 17 y 18). Estas motilidades son importantes para la formación de las biopelículas y colonización de un hospedero.

Se observó una disminución entre un 20 y un 50% del halo de motilidad “swarming”, para concentraciones subinhibitorias de CDAP-4, el mayor efecto se observa a 2.6 μM , esta prueba solo se realizó para la cepa *P. aeruginosa* 5872, (Fig. 17 A y B), ya que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 que tenemos en nuestro laboratorio no presentó la motilidad característica de este tipo a las condiciones experimentales.

Del mismo modo, se evaluó la superficie de los halos de crecimiento para la motilidad tipo “twitching” en la que el pili es la principal estructura responsable. Se registró que, para la cepa *P. aeruginosa* PAO1 la concentración de 4.3 μM tiende a disminuir respecto al control el halo de motilidad, pero a concentraciones mayores el halo aumenta, observándose un halo menos circular y más irregular (Fig. 18 A y B). Por el contrario la cepa *P. aeruginosa* aislado clínico 5278 al crecer en presencia de CDAP-4 presentó una predisposición a disminuir el halo de motilidad (Fig. 18 A derecha y C), donde los halos se ven más homogéneos y el efecto observado es de más del 50% desde 4.3 μM .

Algunos péptidos antimicrobianos, estimulan esta motilidad activando la expresión de genes responsables de la biogénesis del TFP (81), mientras que otros antimicrobianos actúan inhibiéndola (121). Cualquier efecto en el twitching se traduce en mala formación de microcolonias y fallo en la formación de biopelículas (25, 33).

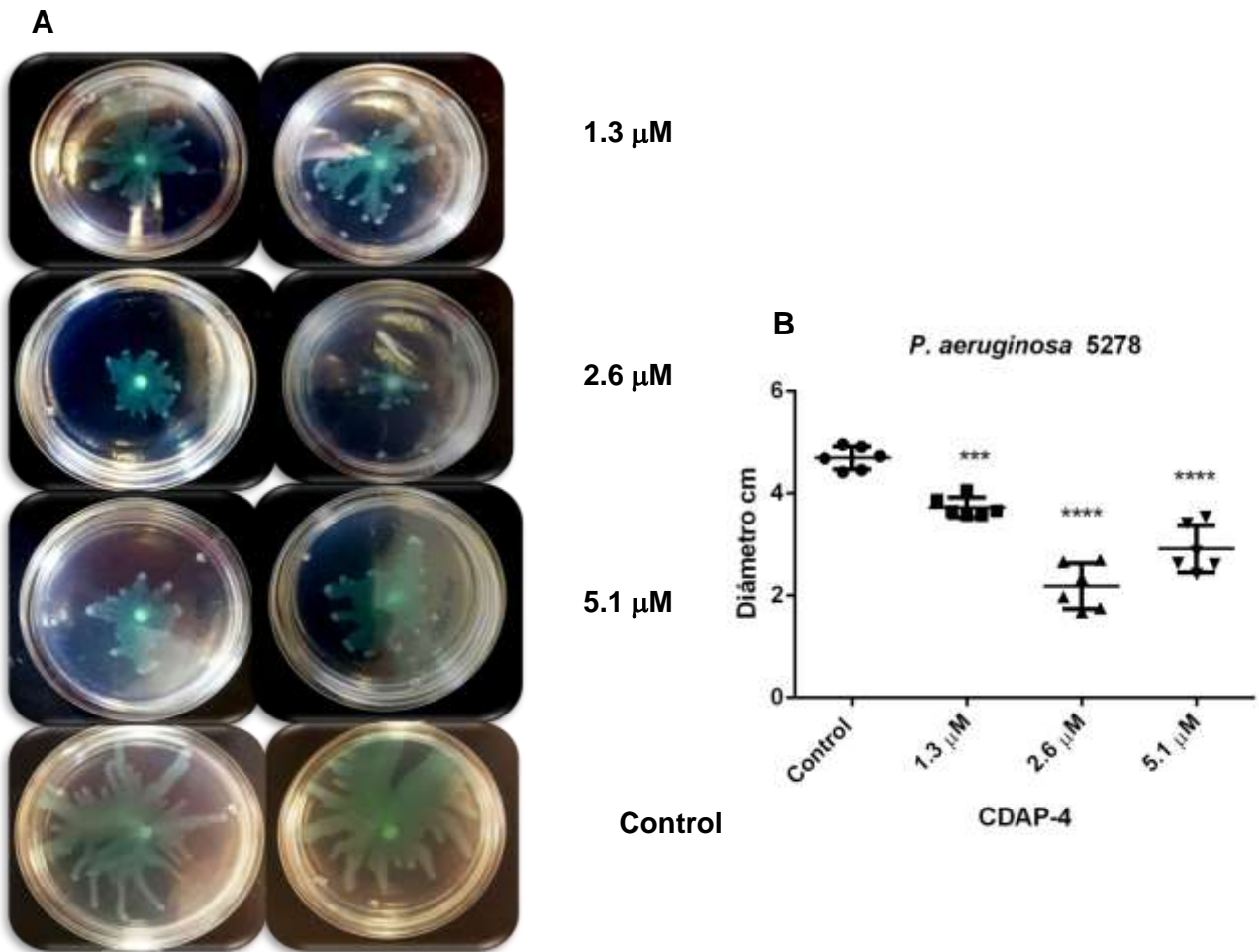


Figura 17. CDAP-4 inhibe la motilidad “swarming” de *Pseudomonas aeruginosa* in vitro mecanismo importante para la formación del biofilm. A) Fotografías de halos de motilidad “swarming” a diferentes concentraciones de CDAP-4, el control es medio de cultivo sin CDAP-4 B) Representación gráfica del análisis de motilidad n=6. Los datos representan los valores obtenidos de tres experimentos independientes por duplicado. ** (p<0.0001)**

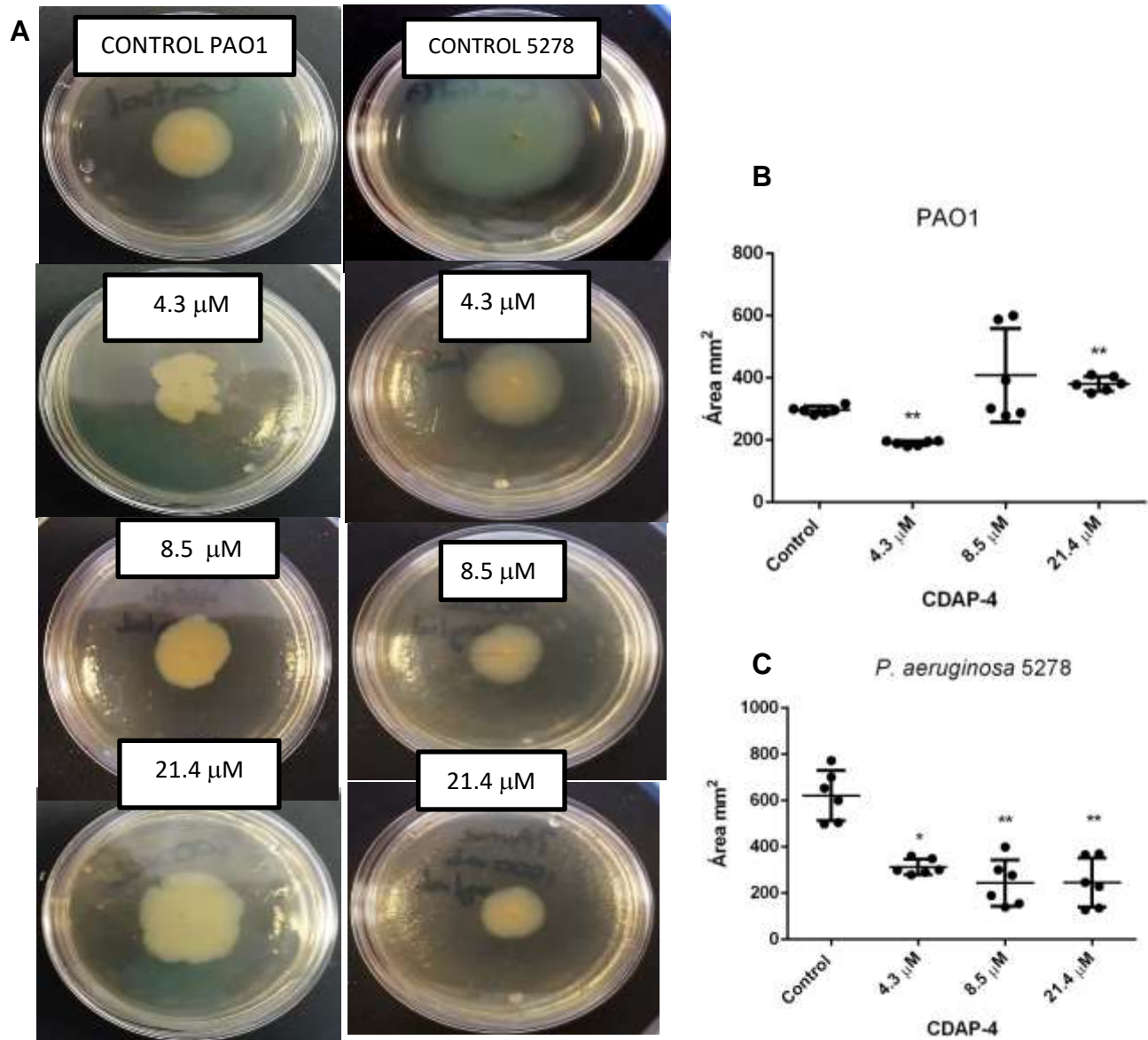


Figura 18. CDAP-4 afecta la motilidad twitching de *Pseudomonas aeruginosa* in vitro A) Fotografías de halos de motilidad twitching a diferentes concentraciones subinhibitorias de CDAP-4 para *Pseudomonas aeruginosa* 5278 y PAO1 B y C) Gráficos de dispersión de las mediciones de las áreas de motilidad “twitching” de *P. aeruginosa*. Tres experimentos por duplicado n=6 * (p=0.0233) ** (p=0.0096)

Efecto de CDAP-4 en la biopelícula observado por microscopía electrónica de barrido.

Para conocer el efecto del péptido CDAP-4 microscópicamente, sobre las biopelículas de *P. aeruginosa*, primero se dejó que se formaran en cubreobjetos de vidrio, para que posteriormente se tratarán con la CMI y la mitad de la CMI contra la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (Fig.19 B y C). Asimismo, se examinó el efecto en la formación de las biopelículas al incubar la cepa a la par junto con la CMI y la mitad de ésta durante 24 horas (Fig. 19 D y E).

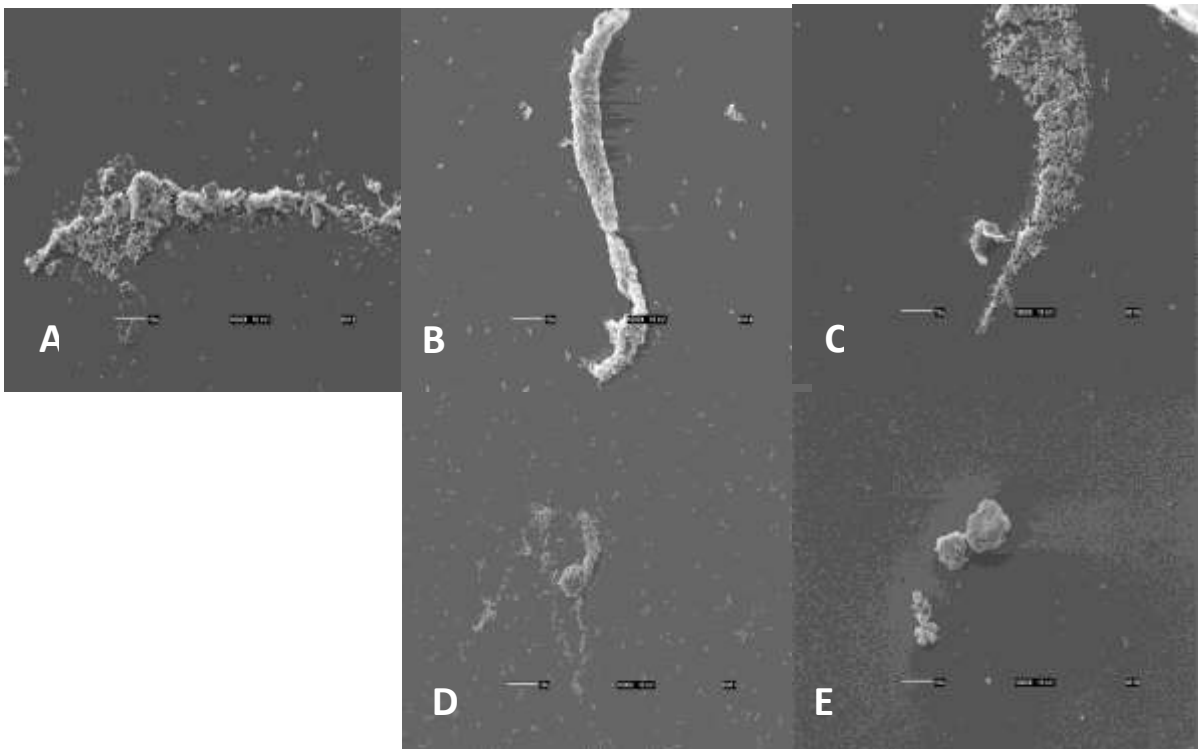


Figura 19. Observación del efecto de CDAP-4 sobre la formación de la biopelícula por microscopía electrónica de barrido. A) Control *P. aeruginosa* PAO1 sin péptido, **B)** Biopelícula preformada tratada con CDAP-4 a la CMI (54.7 μ M) 24 horas, **C)** Biopelícula preformada tratada con CDAP-4 a 27.3 μ M por 24 horas, **D)** *P. aeruginosa* PAO1 cultivada con CDAP-4 27.3 μ M por 24 horas, **E)** *P. aeruginosa* PAO1 cultivada con la CMI (54.7 μ M) durante 24 horas. Aumento 1000X

Por microscopía electrónica de barrido a un aumento de 1000X, vimos que la biopelícula preformada que se trató con CDAP-4 durante 24 horas, no tiene un efecto evidente respecto a la cantidad de microorganismos adheridos a la superficie de vidrio (Fig. 19 B y C), sin embargo, aparentemente se forma una estructura más compacta. No obstante, cuando se hace un acercamiento a mayor

aumento (20, 000X) (Fig. 20 B y C), a la CMI la membrana de las bacterias adheridas ha sufrido cambios que se observan como pequeñas burbujas que sobresalen de la superficie bacteriana (“blebs”) (Fig. 20 B); mecanismo que refleja el característico de daño causado por algunos péptidos catiónicos. A la mitad de la CMI también se observan bacterias dañadas, que han perdido la integridad la membrana (Fig. 20 C), incluso hay formación de poros.

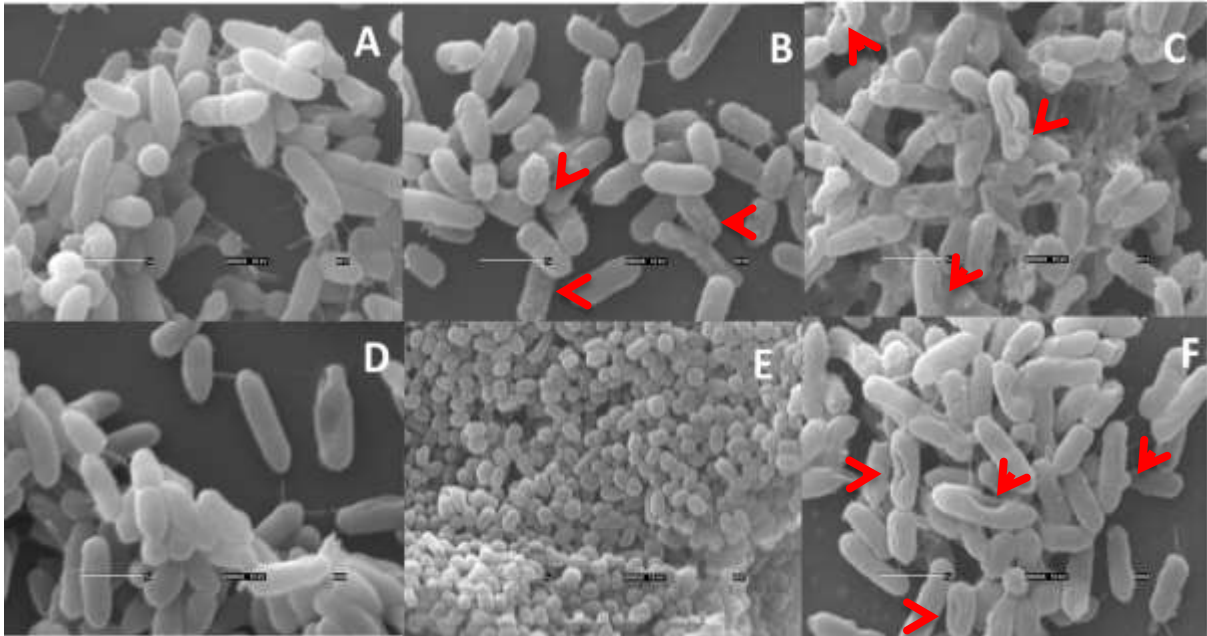


Figura 20. Observación del efecto de CDAP-4 sobre la membrana de *P. aeruginosa* PAO1 que constituyen la biopelícula, por microscopía electrónica de barrido. A) y D) Control PAO1 sin CDAP-4, B) Biopelícula preformada tratada con la CMI de CDAP-4, 24 horas, C) Biopelícula preformada tratada con 0.5 CMI de CDAP-4 24 horas, E) PAO1 cultivada con CMI de CDAP-4, 24 horas, F) PAO1 cultivada con 0.5 CMI de CDAP-4, 24 horas. Aumento 20000X

Cuando la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se cultivó junto con el CDAP-4 durante 24 horas se observó que la adhesión al cubreobjetos de vidrio se era menos, representada por una baja cantidad de microorganismos observados en el campo comparado con el control (Fig. 19 E y F). A un aumento de 20,000X, vemos que a la CMI de CDAP-4 las bacterias adheridas son de menor tamaño y con una forma redondeada (Fig. 20 E), diferentes de las del control con la forma característica de bacilos (Fig. 20 A y D).

Mientras que cuando CDAP-4 se evaluó a la mitad de la CMI, las células conservaron su forma de bacilos a pesar de que algunas habían perdido la integridad de su membrana; como consecuencia se observaron poros en la superficie y la presencia de “blebs”.

Con lo anterior, inferimos que, cuando la biopelícula ya está formada el péptido es capaz de dañar a las bacterias que se encuentran hacia la superficie del biofilm. Además que el efecto observado cuando se cultiva la *P. aeruginosa* PAO1 junto con CDAP-4 es más evidente, puesto que se observa un cambio de forma celular y daño en la membrana.

Efecto de CDAP-4 sobre la capacidad de eliminación de células planctónicas y biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO, por células THP-1.

Se evaluó el efecto de CDAP-4 sobre la eliminación de *P. aeruginosa* en estado planctónico y en biopelículas por células THP-1, proponiéndose como modelo sobre lo que podría suceder en una infección crónica.

La sobrevivencia intracelular de *P. aeruginosa* PAO1 disminuye de una manera dosis dependiente (Fig. 21 A); incluso a concentraciones subinhibitorias de CDAP-4, las UFC recuperadas del lisado después del tiempo de la prueba fueron menores que cuando la bacteria se incubó con THP-1 en ausencia de CDAP-4.

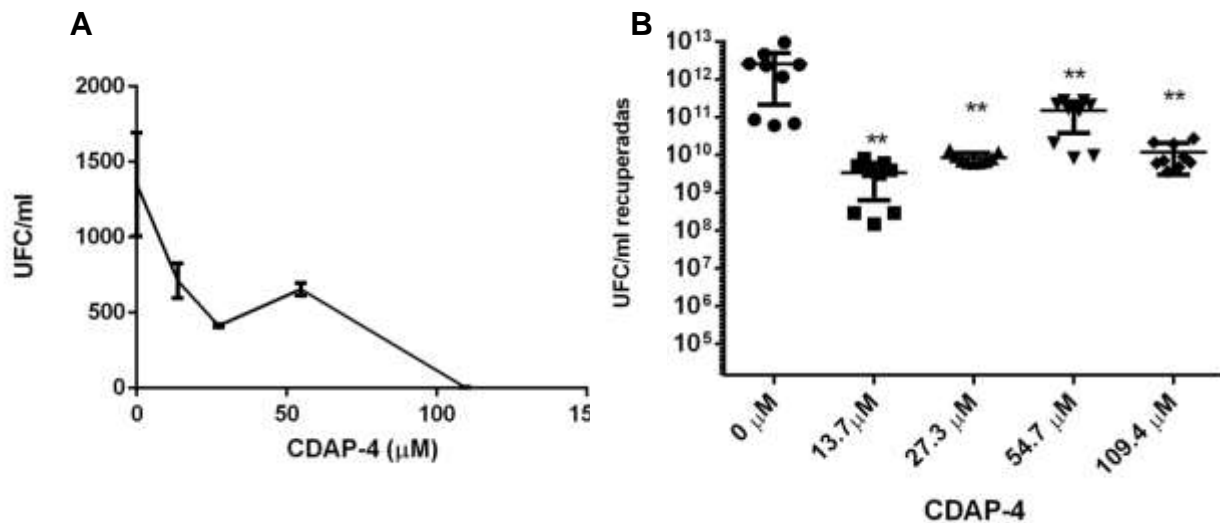


Figura 21. Efecto de CDAP-4 sobre la capacidad de eliminación de células planctónicas y biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 por células THP-1. **A)** UFC obtenidas de células lisadas THP-1, incubadas con *P. aeruginosa* por 3 horas en conjunto con CDAP-4, **B)** UFC obtenidas después de la interacción células THP-1/biopelículas, en presencia de CDAP-4. Inóculo inicial $3 \times 10^9 \pm 5 \times 10^8$ UFC/pozo. En A) resultados del promedio de tres experimentos hechos por duplicado n=6. Para B), cada punto representa un dato obtenido de tres experimentos independientes realizados por triplicado. n= 9. ** (p=0.0018) *** (p=0.0009)

Se evaluó también el efecto de CDAP-4 en la eliminación de biopelículas preformadas de 24 horas por células THP-1 (Fig. 21 B). Se pudo observar que CDAP-4 favorece la eliminación de la biopelícula por las células THP-1 a

concentraciones menores de la CMI del péptido, al menos en las repeticiones realizadas con nuestras condiciones experimentales, por esa razón hubo una tendencia a disminuir las UFC recuperadas posterior a la incubación cuando CDAP-4 está presente.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han hecho diferentes investigaciones para desarrollar o mejorar moléculas que afecten a las biopelículas generadas por bacterias patógenas, puesto que estas estructuras son responsables de un alto porcentaje de infecciones crónicas y las bacterias que los forman son de 10-1000 veces más resistentes a los antibióticos (10).

El péptido generado de la región carboxilo terminal de la quimiocina CCL13 (CDAP-4) ha mostrado ser efectivo contra algunas bacterias gram-negativas principalmente *P. aeruginosa* (99). En este trabajo se demostró que disminuye la adhesión a placas de poliestireno a concentraciones mayores de 27 μ M, además de afectar algunos mecanismos importantes para su desarrollo.

La evaluación mostró, que la CMI de CDAP-4 para algunas cepas de *P. aeruginosa* (Tabla 7) está entre 54.7-109.4 μ M (128 μ g/ml-256 μ g/ml), mientras que las cepas de referencia (*P. aeruginosa* PAO1 Y ATCC 39324) tienen una CMI menor al aislado clínico con fenotipo mucoide que muestra alta producción de alginato. La CMI obtenida está dentro del rango en que están las CMI de otros péptidos antimicrobianos con conformación α -hélice, la mayoría presentan CMI menores de 50 μ M (51-53, 62, 109,114). Por ejemplo la catelicidina LL-37 tiene una CMI contra *P. aeruginosa* de 12 μ M (64 μ g/ml) (53), aunque para la cepa PAO1 es de 25 μ M (52), siendo la CMI de LL-37 menor que la de CDAP-4. Por otro lado un péptido denominado 1037 tiene una CMI de 220 μ M (304 μ g/ml), mayor que la de CDAP-4 contra *P. aeruginosa* (81).

Generalmente no existe una relación entre la actividad microbicida contra bacterias planctónicas y contra biopelículas, ya que hay péptidos antimicrobianos que actúan como anti-biopelículas a concentraciones muy por debajo de su CMI, mientras que otros a mayores (51-53, 73, 81). Por ejemplo, el péptido 1037 disminuye un 78% la biomasa del biofilm a 0.5 CMI (81). También hay otros que disminuyeron del 35%-45% la biomasa en placas de poliestireno (109). Sin embargo, CDAP-4 disminuyó un 50% la biomasa de biofilms de PAO1 a 0.5 CMI, mientras que para las otras cepas solo se observó una disminución de aproximadamente el 50% a la CMI. No obstante, a concentraciones menores de 27.3 μ M no se pudieron obtener resultados concluyentes de que CDAP-4 tuviera un efecto.

Al mismo tiempo para la cepa 5872 y ATCC 39324, en algunos casos se presentan resultados inesperados, como las concentraciones de péptido donde la biomasa aumentó respecto al control sin el péptido a concentraciones por debajo

de la CMI, principalmente 6.4 μM , estos resultados sugieren que el fenotipo mucoide confiere mayor protección y resistencia contra CDAP-4.

Por lo tanto, para las pruebas donde se dejó crecer la bacteria con el péptido al mismo tiempo (solo para la cepa *P. aeruginosa* ATCC 39324), así como el tratamiento de biopelículas preformadas y el efecto en el pretratamiento de las placas; se obtuvieron resultados contrarios a los esperados a concentraciones menores de 6.4 μM . Muchos antibióticos a concentraciones por debajo de su CMI inducen la formación de biopelículas *in vitro* (19, 20, 21, 110, 120). El aumento en la producción de biofilm se ha observado con algunos antibióticos, como resultado de incrementar la producción de alginato a concentraciones sub-inhedorias (19, 20, 21, 120). Por ejemplo, se ha demostrado que la colistina a concentraciones sub-inhedorias activa la expresión de genes involucrados en la respuesta de QS, relacionados con la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa* (21). Así mismo se ha reportado que LL-37 a concentraciones muy debajo de la CMI estimula la sobreproducción de alginato (123). Además se ha demostrado que por interacciones hidrofóbicas, el alginato producido por éstas cepas interacciona con los AMPs disminuyendo su actividad (107).

Estos fenómenos podrían explicarse por los diferentes blancos que tienen los AMP's para actuar (membrana celular, moléculas intracelulares, disminución de síntesis de proteínas, etc.), por lo que pueden afectar de distinta forma las biopelículas y el resultado será la sumatoria de todos los efectos en las estructuras bacterianas por el péptido antimicrobiano. Para CDAP-4 solo se ha demostrado que actúa sobre la membrana bacteriana.

Adicionalmente CDAP-4 disminuyó la adhesión de PAO1 a placas pretratadas desde 16 μM proponiendo un uso profiláctico en el recubrimiento de dispositivos médicos por ejemplo. Los péptidos catiónicos han sido usados para recubrir superficies y prevenir la formación de biopelículas (83, 85, 109, 111); por ejemplo la nisina y bovicina HC5 se han usado para cubrir placas de poliestireno, inhibiendo la adhesión bacteriana a concentraciones subinhibitorias. Estos péptidos disminuyen la hidrofobicidad de la superficie (111), pues entre más hidrofóbica sea una superficie, más se favorece la adhesión. Además, se ha confirmado que cepas bacterianas más hidrofóbicas se unen con más eficiencia a estas superficies (112).

Por lo tanto, podría evaluarse si el efecto de CDAP-4 es debido a que su unión a las placas disminuye la hidrofobicidad de éstas, reduciendo la adherencia de bacterias. Sin embargo, es importante conocer la viabilidad de las bacterias que están adheridas a las placas, pues con el método empleado (tinción con cristal violeta), no se tiene la certeza si las bacterias están vivas o muertas, que es

de esperar que no sean viables puesto que CDAP-4 como otros AMPs afecta la integridad de la membrana. Por ejemplo el péptido LL-37 y péptidos derivados, que aumentan la permeabilidad de las bacterias permitiendo la captación de yoduro de propidio y disminuyendo la viabilidad dentro de la biopelícula (19, 52, 53, 73).

Se sabe que la motilidad en bacterias gram-negativas es necesaria para los primeros pasos de formación de biopelículas, debido a que influye en la adhesión a superficies (113). CDAP-4 disminuye los halos de motilidad “swarming” de la cepa mucoide. Esto sugiere que CDAP-4 actúa inhibiendo la adherencia a superficies en etapas tempranas del desarrollo de la biopelícula. Un péptido con este efecto es la catelicidina LL-37 y su péptido derivado 1037, que también disminuyeron este tipo de motilidad, reduciendo los diámetros a concentraciones subinhibitorias. Estos péptidos además, reducen la expresión de genes flagelares (*flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgF*). Por lo tanto, la falta de flagelo causa una adhesión más débil y no desarrollo de biopelículas (81).

CDAP-4, asimismo, afecta la motilidad “twitching” a concentraciones subinhibitorias. La motilidad “twitching” es dependiente del pili tipo cuatro, necesario para la formación de microcolonias e importante para la fase de disgregación de la biopelícula (2, 13, 22, 33, 36). Las microcolonias son estructuras que dan lugar a biopelículas maduras (33). Para la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, CDAP-4 presenta un efecto similar a otros péptidos antimicrobianos al promover este tipo de movimiento. El péptido LL-37 y algunos derivados promovieron esta motilidad como consecuencia de la regulación positiva de genes responsables de la biogénesis del pili tipo IV (TFP) (51, 53, 81). Otra molécula con el mismo resultado es la lactoferrina, mostrando ser antibiofilm y teniendo acción positiva en el “twitching”, aunque el mecanismo está relacionado con la quelación de hierro necesario para el movimiento (49).

Estimular la movilidad mediada por el TFP, hace que la bacteria se mueva erráticamente sobre la superficie y no permita su establecimiento en un lugar específico, impidiendo que las bacterias formen agregados (microcolonias). Por lo tanto se ve afectada la maduración de la biopelícula (33). Un aumento en la motilidad “twitching” implica que el biofilm se disgregue con más facilidad haciéndolo más susceptible a eliminarse (49, 53, 81).

Para la cepa 5872, con fenotipo mucoide se ve un efecto contrario respecto a la PAO1, puesto que el halo de motilidad “twitching” disminuyó de una manera dosis dependiente. A pesar de que el mecanismo principal de los AMPs es el estimular esta motilidad, varios estudios con mutantes deficientes de TFP forman biofilms delgados, en los cuales solo existe una monocapa sin desarrollo de las

microcolonias (agregados celulares) (25, 33). Cuando el “twitching” es bajo, las bacterias no pueden diseminarse a lugares nuevos para colonizar superficies lejanas (13, 25, 36). Si bien la relación entre motilidad “twitching” y la formación del biofilm es compleja, cualquier afectación en ella puede causar un defecto en el establecimiento y maduración de la biopelícula (13, 22, 25, 33, 34, 36). Para correlacionar el efecto de CDAP-4 en la motilidad de *P. aeruginosa* sería necesario verificar si nuestro péptido tiene un efecto directo con la regulación genética de la bacteria, evaluando la expresión de los genes relacionados con la movilidad.

Los efectos fueron a concentraciones bajas, por lo tanto sería posible que el péptido actué formando poros toroidales haciendo muy probable que una porción del péptido se difunda hacia el citosol. (62, 64-67)

El análisis microscópico del efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1, mostró que para biopelículas ya formadas, tratadas con CDAP-4 posteriormente formaron estructuras más compactas cuando se evaluó a la CMI. Mientras que se observaron agregados más extendidos a 0.5 CMI a un aumento de 1000X. Los péptidos antimicrobianos generalmente disminuyen el número de bacterias y el grosor de las biopelículas en modelos experimentales de adhesión a puntas (“pegs”) de poliestireno o hidroxiapatita con dosis repetidas durante varios días (82, 115).

Sin embargo, cuando nuestras preparaciones se observan a un mayor aumento, las bacterias de la biopelícula al exponerse a la CMI de CDAP-4 presentan burbujas o ampollas (“blebs”). La formación de “blebs” es característica de las catelicidinas y algunas quimiocinas antimicrobianas antes de que la bacteria muera (95, 115). Por lo tanto, CDAP-4 afecta la integridad de la membrana como ya se había comprobado anteriormente en nuestro laboratorio para las bacterias planctónicas (99). Además, por microscopía electrónica a 0.5 CMI de CDAP-4, se observan poros. La producción de “blebs” y poros hace a la biopelícula más susceptible de ser atacada por antibióticos o por el sistema inmune.

En contraste, cuando CDAP-4 se deja junto con las bacterias en crecimiento, la adherencia es menor después de 24 horas (aunque solo se tuvo un control sin péptido con crecimiento de 48 horas). Estos resultados indican, junto con las pruebas en placa, que CDAP-4 disminuye la adhesión de bacterias, puesto que la superficie cubierta es menor (Fig. 19 A, D y E). A un mayor aumento se presenta un fenómeno muy interesante; cuando el CDAP-4 se evalúa a la CMI, la forma bacteriana cambia a una figura parecida a un coco. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared celular (116-118) causan este efecto en la forma bacteriana. Por ejemplo, la lisozima provoca también una forma esferoide en *P.*

aeruginosa (118). Otro péptido con características fisicoquímicas similares a CDAP-4, denominado PGLa, causa un acortamiento similar de *E. coli* y producción de “blebs” (119). Los resultados observados por microscopía electrónica de barrido sugieren que CDAP-4 podría estar actuando sobre la síntesis de la pared bacteriana de PAO1 a la CMI. Mientras que a 0.5 CMI el efecto de CDAP-4 es sobre la superficie celular, ocasionando formación de poros y “blebs”.

CDAP-4 disminuye la vida intracelular de *P. aeruginosa* PAO1 en células THP-1 de manera dosis dependiente (Fig. 21), demostrado por la disminución en la UFC recuperadas después de lisar las células. Los resultados nos dan una idea de lo que podría estar sucediendo, pero el mecanismo es aún desconocido. Cabe mencionar, que en esta prueba, las bacterias estuvieron en contacto una hora previa con el CDAP-4 y luego se realizó el co-cultivo con las THP-1. El contacto de las bacterias con el CDAP-4 las vuelve más susceptibles de ser destruidas por los monocitos. Es necesario comprobar la cantidad real de bacterias que entran por célula para poder correlacionar los resultados obtenidos. Aunque haya menor cantidad de bacterias viables dentro de la célula, recuperadas al sembrar el lisado en presencia de CDAP-4, probablemente nos indica que, además de que CDAP-4 actúa directamente como antimicrobiano posiblemente afecta también algunos mecanismos de regulación cuando un patógeno entra a la célula.

Por ejemplo, AMPs como las catelicidinas aumentan la fagocitosis de *E. coli* y *S. aureus* por células THP-1 que fueron pre-tratadas con los péptidos. Además, estos péptidos disminuyeron la sobrevivencia intracelular de *S. aureus* (75). Otros ensayos, demostraron que AMPs funcionan como opsoninas (77). LL-37 eleva la expresión de moléculas implicadas en la fagocitosis, como FcγRs, CD14, TLR4 en macrófagos pre-tratados con el péptido (75, 77). Por lo tanto, sería necesario hacer experimentos para saber cómo CDAP-4 actúa junto con las células THP-1.

Por otro lado, cuando se ponen al mismo tiempo las células THP-1 junto con el péptido en biopelículas ya formadas, la eliminación del biofilm es más eficiente que cuando no está presente CDAP-4 (Fig. 21 B). En infecciones asociadas a materiales externos (catéteres o sondas), podría prevenirse que la infección empeore si está presente CDAP-4, puesto que se evitaría el crecimiento y aumento de la densidad de la biopelícula junto con las células del sistema inmune. No obstante, es necesario investigar el efecto de CDAP-4 en la célula fagocítica, además de directamente en el biofilm. Por lo tanto, tendrá que comprobarse si las células THP-1 son capaces de fagocitar a las bacterias de la biopelícula y evaluar si también si la biopelícula aumenta su población durante el tiempo del experimento, ya que en la prueba únicamente se midió el inóculo inicial (Ver Fig. 21). Además, aún no existen reportes sobre el efecto de péptidos antimicrobianos en la fagocitosis de biopelículas puesto que, la mayoría de los

ensayos se han realizado usando bacterias en estado planctónico (54, 69, 75-77). Más aún, no se han reportado estudios donde se demuestre la actividad anti-biofilm de quimiocinas o péptidos derivados, por lo que CDAP-4 innovadoramente es un buen candidato para ser utilizado como péptido anti-biopelículas.

En este trabajo se propone que el péptido CDAP-4, actúa inhibiendo la adhesión de *P. aeruginosa* en las primeras etapas de la formación del biofilm al modificar la motilidad bacteriana, aunque el mecanismo por el cual lo hace se desconoce. Asimismo altera la integridad de la membrana en las bacterias que forman el biofilm. Una posible respuesta a todos los fenómenos observados sería que CDAP-4 como otros péptidos antimicrobianos podría entrar a la célula bacteriana afectando la expresión de genes o proteínas relacionadas con la motilidad, síntesis de pared entre otros.

El resumen de todos los efectos observados se presentan en la Fig. 22.

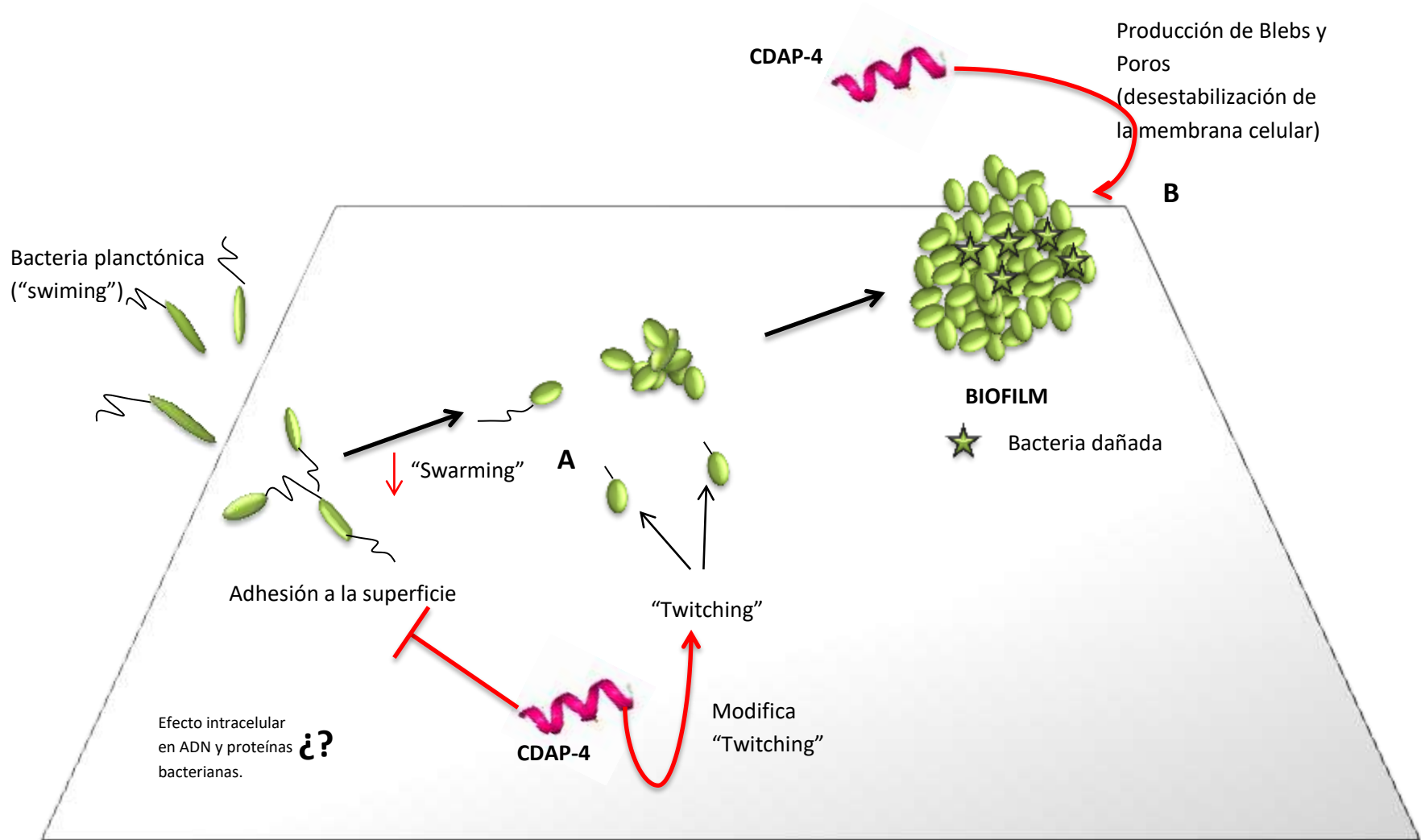


Figura 22. Resumen de los efectos de CDAP-4 en la formación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. A) El péptido CDAP-4 (en rosa), actúa inhibiendo la adhesión de *P. aeruginosa* en las primeras etapas de la formación del biofilm al modificar la motilidad bacteriana (twitching y swarming), aunque el mecanismo por el cual lo hace se desconoce. B) CDAP-4 altera la integridad de la membrana en las bacterias que forman el biofilm.

CONCLUSIONES

1. El péptido CDAP-4 inhibe la formación de biofilms en superficies inertes a concentraciones mayores a 27 μM , siendo la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 más susceptible que las de fenotipo mucóide.
2. CDAP-4 afecta las motilidades “swarming” y “twitching” de *P. aeruginosa*, las cuales son importantes en las etapas iniciales de la generación de biofilms.
3. CDAP-4 daña a las bacterias en la superficie del biofilm por formación de “blebs” y poros.
4. Cuando CDAP-4 se prueba a la CMI desde el inicio de la formación del biofilm, previene la adhesión de bacterias al vidrio. Además, cambia la morfología bacteriana, observándose células más redondas y de menor tamaño.
5. CDAP-4 disminuye las UFC recuperadas después de co-cultivar biofilms con células THP-1.
6. CDAP-4 aumenta la capacidad bactericida de células THP-1 contra células planctónicas de PAO1.

El péptido CDAP-4, afecta el establecimiento de biofilms de *P. aeruginosa* por medio de mecanismos relacionados con la motilidad y aumentando su eliminación por células THP-1. Por lo tanto, el uso de CDAP-4 como potencial anti-biopelículas, hará más susceptibles a estas comunidades bacterianas, causantes de enfermedades infecciosas crónicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nazar C J. Biofilms bacterianos. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2007; 67(1).
2. Garrett T, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science. 2008; 18(9):1049-1056.
3. Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology. 2016;14(9):563-575.
4. Flemming H. and J. Wingender. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 2010; 8:623-633. doi:10.1038/nrmicro2415.
5. Dalton H, March P. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. Current Opinion in Biotechnology. 1998;9(3):252-255.
6. Kovach, Kristin, Megan Davis-Fields, Yasuhiko Irie, Kanishk Jain, Shashvat Doorwar, Katherine Vuong, Numa Dhamani, Kishore Mohanty, Ahmed Touhami, and Vernita D. Gordon. Evolutionary adaptations of biofilms infecting cystic fibrosis lungs promote mechanical toughness by adjusting polysaccharide production. Npj Biofilms and Microbiomes. 2017.3(1) doi: 10.1038/s41522-016-0007-9.
7. Flemming H, Neu T, Wozniak D. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". Journal of Bacteriology. 2007;189(22):7945-7947.
8. Wei, Qing, and Luyan Ma. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Molecular Sciences. 2013; 14(10).
9. Joo, H. and Otto, M. Molecular Basis of *In Vivo* Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. Chemistry & Biology. 2012; 19,(12):1503-513.
10. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery. 2003. 2:114-122.

11. Liu Y., Shu-Fang Y., Yong Li, Hui Xu, Lei Qin and Joo H. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*. 2004; 110(3):251-256.
12. Kai Papenfort and Bonnie Bassler. Quorum-sensing signal-response systems in gram-negative bacteria. *Nature Review Microbiology*. 2016; 14(9):576-588
13. Patriquin G, Banin E, Gilmour C, Tuchman R. Influence of quorum sensing and Iron on “twitching” motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2007; 190(2):662-671.
14. Snitkin E. S. and Segre J. A. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to human hosts. *Nature Genetics*. 2014; 47(1): 2-3.
15. Gellatly S. L. and Hancock R. E.w. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 2013; 67(3):159-73.
16. Leid, J. G., C. J. Willson, M. E. Shirtliff, D. J. Hassett, M. R. Parsek, and A. K. Jeffers. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *The Journal of Immunology*. 2005;175(11): 7512-7518
17. Flemming H, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Wat Sci And Tech*.2001;43(6): 1-8.
18. Grishin, A., Krivozubov, M., Karyagina, A. and Ginstsburg, A. *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae*, 2015; 29(2):29-41
19. Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. and Hoiby, N. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and -Lactamase and Alginate Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(4):1175-1187.
20. Romero, D., Traxler, M., López, D. and Kolter, R. Antibiotics as Signal Molecules. *Chemical Reviews*. 2011; 111(9): 5492-5505.

21. Cummins, J., Reen, F., Baysse, C., Mooij, M. and O'gara, F. Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2009; 155(9):2826-2837.
22. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(18):5395-5401.
23. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. 2010. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2(7):a000398.
24. Das, Theerthankar, T., Samuel K. Kutty, S., Roya Tavallaie, R., Amaye I. Ibugo, A., Janjira Panchompoo, J., Shama Sehar, S., Leigh Aldous, L., Amanda W. S. Yeung, A., Shane R. Thomas, S., Naresh Kumar, N., J. Justin Gooding, J. and Mike Manefield, M. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports*. 2015; 5: 8398.
25. O'Toole G, Kolter R. Flagellar and “twitching” motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 1998;30(2):295-304.
26. Overhage J, Bains M, Brazas M, Hancock R. “Swarming” of *Pseudomonas aeruginosa* is a Complex Adaptation Leading to Increased Production of Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(8):2671-2679
27. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*. 2003; 50(1):61-68.
28. Kearns D. A field guide to bacterial “swarming” motility. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(9):634-644.
29. Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J et al. Living on a surface: “swarming” and biofilm formation. *Trends in Microbiology*. 2008;16 (10):496-506.

30. Butler, M. T., Q. Wang, and R. M. Harshey. Cell density and mobility protect “swarming” bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(8): 3776-781.
31. Anyan M, Amiri A, Harvey C, Tierra G, Morales-Soto N, Driscoll C et al. Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate “swarming” of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(50):18013-18018.
32. Haiko J, Westerlund-Wikström B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology*. 2013;2(4):1242-1267
33. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, Ternan N, Haylock R, Moore J et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability *in vitro*. *BMC Microbiology*. 2010;10(1):38
34. Otton, Muner, L., Campos, M., Karine Lena Meneghetti, K. and Gertrudes Corção, G. Influence of “twitching” and “swarming” motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Archives of Microbiology*, 2017. doi:10.1007/s00203-017-1344-7.
35. Mattick J. Type IV Pili and “twitching” motility. *Annual Review of Microbiology*. 2002;56(1):289-314
36. Maier B, Wong G. How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. *Trends in Microbiology*. 2015;23(12):775-788.
37. Yang, Liang, L., Yifan Hu, Y., Yang Liu, Y., Jingdong Zhang, J., Jens Ulstrup, J. and Søren Molin, S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*. 2011; 13(7): 1705-1717.
38. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. and El Jaziri, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International* 2015; (2015): 1-17. doi:10.1155/2015/759348.
39. Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. 7a ed. Mc Graw Hill. 2009.

40. Gregersen P. and Behrens T. Genetics of autoimmune diseases disorders of immune homeostasis. *Nature Reviews Genetics*. 2006. 7(12):917-928.
41. Akira S. and Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 499-511.
42. Mishra, Meenu, Matthew S. Byrd, Susan Sergeant, Abul K. Azad, Matthew R. Parsek, Linda Mcphail, Larry S. Schlesinger, and Daniel J. Wozniak. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular Microbiology*. 2012;14(1):95-106
43. Jensen, P. O., T. Bjarnsholt, R. Phipps, T. B. Rasmussen, H. Calum, L. Christoffersen, C. Moser, P. Williams, T. Pressler, M. Givskov, and N. Hoiby. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2007; 153(5):1329-1338
44. Simpson, Jeremy A., Sussan E. Smith, and Roger T. Dean. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*. 1989; 6(4):347-353
45. Parks, Quinn M., Robert L. Young, Katie R. Poch, Kenneth C. Malcolm, Michael L. Vasil, and Jerry A. Nick. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human F-actin and DNA as targets for therapy. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(4):492-502.
46. Bass, J. I. Fuxman, D. M. Russo, M. L. Gabelloni, J. R. Geffner, M. Giordano, M. Catalano, A. Zorreguieta, and A. S. Trevani. Extracellular DNA: A Major Proinflammatory Component of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *The Journal of Immunology*. 2010; 184(11):6386-6395
47. Gennip, Maria Van, Louise Dahl Christensen, Morten Alhede, Klaus Qvortrup, Peter Østrup Jensen, Niels Høiby, Michael Givskov, and Thomas Bjarnsholt. Interactions between Polymorphonuclear Leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms on Silicone Implants *in vivo*. *Infection and Immunity*. 2012; 80(8): 2601-2607.
48. Leid, JG. Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses. *Microbe*. 2009; 4(2):66-70. Acceso Mayo 10 2016. Disponible en:

<http://www.bioquest.org/summer2010/wp-content/blogs.dir/files/2010/02/Bacterial-Biofilms.pdf>

49. Singh P, Parsek M, Greenberg E, Welsh M. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002; 417(6888):552-555.
50. Hänsch, Gertrud Maria. Host Defence against Bacterial Biofilms: “Mission Impossible”? *ISRN Immunology*. 2012; 1-17. doi:10.5402/2012/853123.
51. Dean S., Bishop B. and Van Hoek M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2(128):1-11.
52. Nagant, C., Pitts, B., Nazmi, K., Vandenbranden, M., Bolscher, J., Stewart, P. and Dehaye, J. Identification of Peptides Derived from the Human Antimicrobial Peptide LL-37 Active against Biofilms Formed by *Pseudomonas aeruginosa* Using a Library of Truncated Fragments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012; 56(11): 5698-5708.
53. Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E., Rehm, B. and Hancock, R. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infection and Immunity*. 2008; 76(9):4176-4182.
54. Sol, A., Ginesin, O., Chaushu, S., Karra, L., Copenhagen-Glazer, S., Ginsburg, I. and Bachrach, G. LL-37 Opsonizes and Inhibits Biofilm Formation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at Subbactericidal Concentrations. *Infection and Immunity*. 2013; 81(10): 3577-3585.
55. Valentini M. and Filloux A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(24): 12547-12555.
56. Valle, J., Solano, C., García, B., Toledo-Arana, A. and Lasa, I. Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection. *Trends in Microbiology*. 2013; 21(8): 364-371.
57. Belas Robert. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*. 2014; 22(9):517-527.

58. Yam, J , Aung, T, Chua, S, Cheng, Y, Kohli, G, Zhou, J, Constancias, F, Liu, Y, Cai, Z, Salido, M, Drautz-Moses, D, Rice, S, Schuster, S, Wu, B, Kjelleberg, S, Tolker-Nielsen, T, W. Beuerman, R, Givskov, M, and Yang, L. Cyclic-di-GMP is required for corneal infection by *Pseudomonas aeruginosa* and modulates host immunity. [epub ahead of print]. 2017; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/098749>. Consultado: 23/03/2017
59. Gries C. M., Bruger E. L., Moormeier D. E., Scherr T., Waters C., and Kielian. Cyclic di-AMP Released from *Staphylococcus aureus* Biofilm Induces a Macrophage Type I Interferon Response. *Infection and Immunity*. 2016; 84(12):3564-3574.
60. Mcwhirter, S., Barbalat, R., Monroe, K., Fontana, M., Hyodo, M., Joncker, N., Ishii, K, Akira, S., Colonna, M., Chen, Z., Fitzgerald, K., Hayakawa, Y. and Vance, R. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009; 6(9): 1899-1911.
61. Finlay, B. Brett, and Robert E. W. Hancock. Opinion: Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(6):497-504.
62. Hancock, Robert E W, and Hans-Georg Sahl. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 2006; 24(12): 1551-1557.
63. Oyinloye, B., Adenowo, F., Gxaba, N. and Kappo, A. The Promise of Antimicrobial Peptides for Treatment of Human Schistosomiasis. *Current Drug Targets*. 2014. 15(9): 852-59.
64. Chan, David I., Elmar J. Prenner, and Hans J. Vogel. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1758(9): 1184-1202.
65. Brogden, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3(3): 238-250.
66. Hilchie, A, Wuerth, K. and E W Hancock, R. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*. 2013. 9(12): 761-768.

67. Kang, Su-Jin, Do-Hee Kim, Tsogbadrakh Mishig-Ochir, and Bong-Jin Lee. Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of Pharmacal Research*. 2012; 35(3):409-413.
68. Lai, Y. and Gallo, R. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*. 30(3):131-41.
69. Scott, M. G., D. J. Davidson, M. R. Gold, D. Bowdish, and R. E. W. Hancock. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 2002; 169(7):3883-3891.
70. Oppenheim, J. J. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003; 62(90002):17ii-21. doi:10.1136/ard.62.suppl_2.ii17.
71. Nijnik, A., Madera, L., Ma, S., Waldbrook, M., Elliott, M., Easton, D., Mayer, M., Mullaly, S., Kindrachuk, J., Jenssen, H., and Hancock, R. "Synthetic Cationic Peptide IDR-1002 Provides Protection against Bacterial Infections through Chemokine Induction and Enhanced Leukocyte Recruitment." *The Journal of Immunology* 184, no. 5 (2010): 2539-550. doi:10.4049/jimmunol.0901813.
72. Luca, Mariagrazia Di, Giuseppe Maccari, and Riccardo Nifosì. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathogens and Disease*. 2014; 70(3): 257-270.
73. Reffuveille, F., De La Fuente-Nunez, C., Mansour, S. and E. W. Hancock, R. A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(9):5363-5371. doi:10.1128/aac.03163-14.
74. Arango Duque G. and Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(491):1-12. doi:10.3389/fimmu.2014.00491.
75. Wan, M., Van Der Does A. M., Tang X, Lindbom L., Agerberth B. and Haegstrom J. Z. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial

- phagocytosis by human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014; 95(6):971-81.
76. Coorens M., Scheenstra Maaïke R, Veldhuizen Edwin J. A., and Haagsman H. P. Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40874. doi:10.1038/srep40874.
 77. Ugarova, T., Moreno, B., Podolnikova, N. and Lishko, V. Identification of human cathelicidin peptide LL-37 as a ligand for macrophage integrin $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18) that promotes phagocytosis by opsonizing bacteria. *Research and Reports in Biochemistry*. 2016; 6:39-55.
 78. Stempel, N, Strehmel J, and Overhage J. Potential Application of Antimicrobial Peptides in the Treatment of Bacterial Biofilm Infections. *Current Pharmaceutical Design*. 2014; 21(1):67-84.
 79. De la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney E, Straus S, Hancock R. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathogens*. 2014; 10(5):e1004152.
 80. Dosler S. and Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*. 2014; 62:32-37.
 81. De la Fuente-Núñez., Korolik V. and Hancock R. E.W. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012; 56(5):2696-2704
 82. De La Fuente-Núñez, C., Mansour, S., Wang, Z., Jiang, L., Breidenstein, E., Elliott, M., Reffuveille, F., Speert, D., Reckseidler-Zenteno, S., Shen, Y., Haapasalo, M. and Hancock, R. Anti-Biofilm and Immunomodulatory Activities of Peptides That Inhibit Biofilms Formed by Pathogens Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Antibiotics*. 2014; 3(4): 509-526.
 83. Onaizi, Sagheer A., and Susanna S.j. Leong. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. *Biotechnology Advances*. 2011; 29(1):67-74

84. Appendini P, Hotchkiss J. Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;81(3):609-616.
85. Hilpert K, Elliott M, Jenssen H, Kindrachuk J, Fjell C, Körner J et al. Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chemistry & Biology*. 2009;16(1):58-69.
86. Griffith, Jason W., Caroline L. Sokol, and Andrew D. Luster. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*. 2014; 32(1):659-702.
87. Kufareva, Irina, Catherina L. Salanga, and Tracy M. Handel. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunology and Cell Biology*. 2015; 93(4):372-383.
88. Comerford, Iain, and Shaun R. Mccoll. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunology and Cell Biology*. 2011. 89(2): 183-184.
89. Johnson Z., Power C.A, Weiss C., Rintelen F., Ruckle Ji T., Camps M. et al. Chemokine inhibition – why, when, where, which and how? *Biochemical Society Transactions*. 2004; 32(2):366-377.
90. Rostène, William, Patrick Kitabgi, and Stéphane Mélik Parsadaniantz. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8(11):895-904
91. BioLegend Chemokines and Chemokine Receptors. BioLegend, Inc. Acceso: Mazo 02, 2017. https://www.biolegend.com/chemokine_receptors.
92. Garcia-Zepeda E. A., Combadiere C., Rothenberg M. E, Sarafi M N., Lavigne F., Hamid Q., Murphy P M, and Luster A. D. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *Journal Immunology*.1996; 157:5613-5626
93. Mendez-Enriquez, E., and García-Zepeda E. A. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology*. 2013; 21(6):397-406.

94. Barinka, C. and Lubkowiski, J. Structure of human monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4/CCL13). *Biological Crystallography*. 2007; D64: 273-78.
95. Yung Sunny C. and Philip M. Murphy. Antimicrobial Chemokines. *Frontiers in Immunology*. 2012; 3(276):1-11.
96. Krijgsveld, J., S. A. J. Zaat, J. Meeldijk, P. A. Van Veelen, G. Fang, B. Poolman, E. Brandt, J. E. Ehler, A. J. Kuijpers, G. H. M. Engbers, J. Feijen, and J. Dankert. Thrombocidins, Microbicidal Proteins from Human Blood Platelets, Are C-terminal Deletion Products of CXC Chemokines. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(27): 20374-20381.
97. Nguyen L, Chan D, Boszhard L, Zaat S, Vogel H. Structure–function studies of chemokine-derived carboxy-terminal antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2010; 1798(6):1062-1072.
98. Valdivia-Silva J., Medina-Tamayo J. and Garcia-Zepeda E. Chemokine-Derived Peptides: Novel Antimicrobial and Antineoplastic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(6): 12958-2985.
99. Martínez-Becerra F., Adriano Silva D., Domínguez-Ramírez L., Mendoza-Hernández G., López-Vidal Y., Soldevila G, and García-Zepeda E. A. Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 355(2): 352-358.
100. Hernandez-Valdez J. Evaluación de las propiedades antimicrobianas del péptido derivado de la quimiocina CCL13, CDAP-4, frente a cepas diarregénicas de *E. coli*. [Tesis Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México; 2011.
101. Hernandez-Valdez, J. Evaluación del efecto del péptido antimicrobiano CDAP-4 en un modelo de infección crónica pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. Sin impresión.
102. Wiegand I, Hilpert K. and Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008; 3(2): 163-175.

103. O'toole G., Pratt L., Watnick P., Newman, K., Weaver, B. and Kolter, R. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*. 1999; 6:91-109.
104. Buyck, J., Tulkens, P. and Bambeke, F. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of Antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a Model of THP-1 Human Monocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(5): 2310-318.
105. Rose, S. and Bermudez, L. *Mycobacterium avium* Biofilm Attenuates Mononuclear Phagocyte Function by Triggering Hyperstimulation and Apoptosis during Early Infection. *Infection and Immunity*. 2013; 82(1):405-12.
106. Reed, R. W. and G. B. Reed. "Drop Plate" Method Of Counting Viable Bacteria. *Canadian Journal of Research*. 1948; 26e (6): 317-326.
107. Chan Celine, Burrows L. and Deber C. Helix Induction in antimicrobial peptides by alginate in Biofilms. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(37):38749-38754.
108. Wieczorek, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Scott, W., Elliot, M., Hilpert, K., Hancock, R. and Straus, S. Structural Studies of an Immune Modulating and Direct Antimicrobial Peptide. *Chemistry and Biology*. *Cell*. 2010; 17:970-980.
109. Segev-Zarko, L., Saar-Dover, R., Brumfeld, V., Mangoni, M. and Shai, Y. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*. 2015; 468(2): 259-270.
110. Hoffman, L., D'argenio, D., Maccoss, M., Zhang, Z., Jones, R. and Miller, S. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 2005; 436(7054):1171-1175.
111. Pimentel-Filho, N., Martins, M., Nogueira, G., Mantovani, H. and Vanetti, M. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 190:1-8.

112. Martinez-Martinez, L., Pascual, A. and Perea, E. Kinetics of adherence of mucoid and non-mucoid pseudomonas aeruginosa to plastic catheters. *Journal of Medical Microbiology*. 1991; 34(1): 7-12.
113. Bruzaud, J, Tarrade, J, Coudreuse, A, Canette, A, Herry, J, Givenchy, E, Darmanin, T, Guittard, F, Guilbaud, M. and Bellon-Fontaine, M. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. 2015; 131: 59-66.
114. Hirt, H. and Gorr, S. Antimicrobial Peptide GL13K Is Effective in Reducing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(10): 4903-4910.
115. Saiman, L., Tabibi, S., Starner, T., San Gabriel, P., Winokur, P., Jia, H., Mccray, P. and Tack, B. Cathelicidin Peptides Inhibit Multiply Antibiotic-Resistant Pathogens from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45(10): 2838-2844.
116. Furchtgott, L., Wingreen, N. and Huang, K. Mechanisms for maintaining cell shape in rod-shaped Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*. 2011; 81(2):340-353.
117. Dörr, Tobias, T., Davis, B. and Waldor, M. Endopeptidase-Mediated Beta Lactam Tolerance. *PLOS Pathogens*. 2015; 11(4). doi:10.1371/journal.ppat.1004850
118. Martinez, J., Waldon, M., Huang, Q., Alvarez, S., Oren, A., Sandoval, N., Du, M., Zhou, F., Zenz, A., Lohner, K., Desharnais, R. and Porter, E. Membrane-targeted synergistic activity of docosahexaenoic acid and lysozyme against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*. 2009; 419(1): 193-200.
119. Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M., Gerthsen, D. and Ulrich, A. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(8):3132-3142
120. Song T, Dupertthoy M and Nyunt W. S. Sub-optimal treatment of bacterial Biofilms. *Antibiotics*. 2016; 5(2)23. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929437/> Consultado: 10
Junio 2017

121. Morita Y., Tomida J. and Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. 2014; *Frontiers in microbiology*. 4(422)
122. Stoitsova S., Paunova-Krasteva T. and Borisova D. Modulation of biofilm growth by sub-inhibitory amounts of antibacterial substances. 2016; *Intech*. 9: 441-462. Disponible: <http://dx.doi.org/10.5772/62939>
123. Limoli D., Rockel A., Host K., Jha A., Kopp B., Hollis T. and Woznia K. D. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. 2014; *Plos Patogens*. 10(4): e1004083
124. Houser A. and Ozer E. *Pseudomonas aeruginosa*. 2011; *Nature Reviews microbiology*. Disponible en: <https://www.nature.com/nrmicro/posters.pdf>
125. Byrd M, Pang B. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Exopolysaccharide Psl Facilitates Surface Adherence and NF- κ B Activation in A549 Cells. 2010; *MBio*.1(3):e00140-10

ANEXOS

ANEXO 1. Procedimiento para la preparación del estándar de McFarland No. 0.5

El estándar de McFarland se prepara al agregar cloruro de bario a una solución de ácido sulfúrico para obtener un precipitado de sulfato de bario. La turbidez del estándar es comparado con una suspensión bacteriana que representa una cantidad determinada de bacterias. El estándar 0.5 equivale a 1×10^8 UFC/ml.

Reactivos

1. Ácido sulfúrico 1%
2. Cloruro de Bario anhidro 1.175%

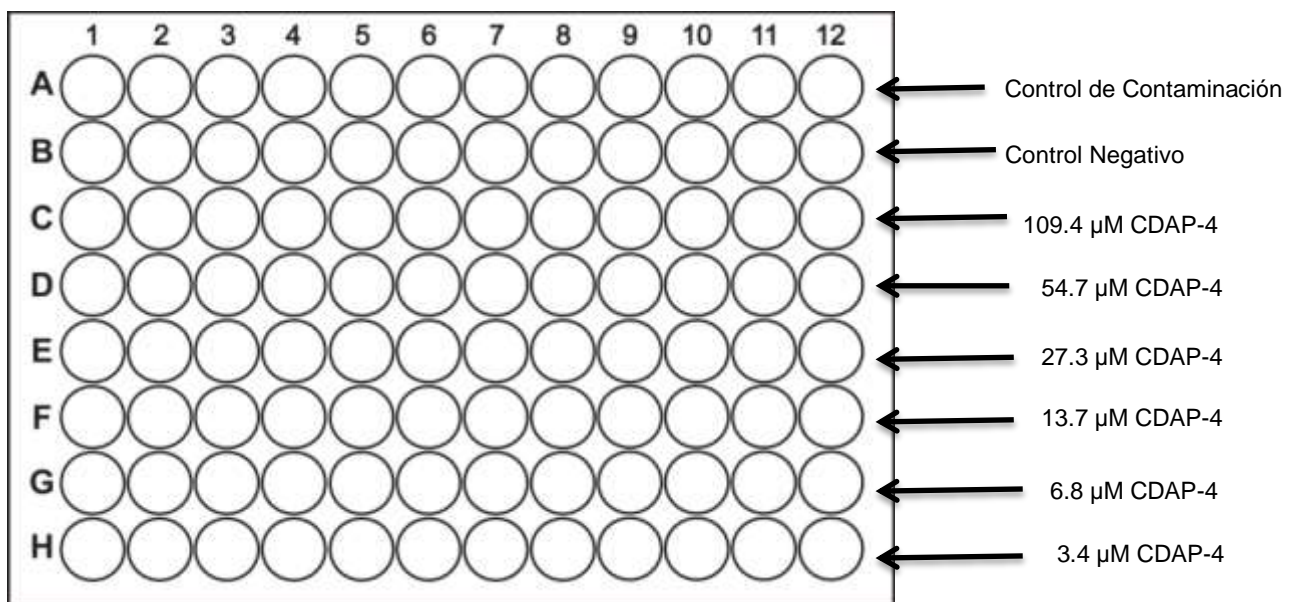
Procedimiento

1. Agregue aproximadamente 85 ml de la solución de H_2SO_4 1% a un matraz volumétrico de 100 ml.
2. Tome 0.5 ml de la solución de Cloruro de Bario 1.175 y agregue por goteo a la solución de ácido sulfúrico, con constante agitación.
3. Complete el volumen a 100 ml con H_2SO_4 1%
4. Mezcle por agitación por 5 minutos más hasta que la solución sea homogénea.
5. Compruebe que la absorbancia a 620 nm de la suspensión resultante sea de 0.08 a 0.1.
6. Si la absorbancia es aceptable, reparta la solución resultante en tubos de volumen semejante a los que usara en su experimento o prueba.
7. Guarde los tubos muy bien sellados y proteja de la luz.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Arreglo de la placa para ensayo de MIC y Biofilm



APENDICE 2

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Medios de Cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad
Triptona (BD Bacto)	10 g
Extracto de levadura (BD Bacto)	5 g
NaCl (J.T. Baker)	10 g
Agua Mili Q	1000ml
Agar (BD Difco, sólo para placas)	15g

PBS 5X ("swarming")

Reactivo	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ (J. T Baker)	25.6 g
KH ₂ PO ₄ (J. T Baker)	6g
NaCl (J. T. Baker)	1g

Caldo Soya Trypticaseína (TSB)

Reactivo	Cantidad
Medio TSB (Bioxon)	30 g
Agua Mili Q	1000ml

Medio M9 ("swarming")

Reactivo	Concentración
Agar (BD Difco)	0.5 %
PBS 5X	50ml
MgSO ₄ (J.T Baker)	1 mM
CaCl ₂ 1M (J. T Baker)	0.1 mM
Casaminoácidos(BD Difco)	5 %
Agua Mili Q	cbp 250ml
cbp	Cuanto baste para

Reactivos importantes

CDAP-4 Pept 4 GenScript Pureza 99.1%, lote: P1893121. Peso Molecular: 2339.77

Medio RPMI 1640 Gibco

Suero Fetal Bovino By Productos, Catalogo: 90020

APÉNDICE 3

EQUIPOS

Incubadora Shaker

New Brunswick Scientific

Edison NJ USA

G24 Enviromental Incubator Shaker

Espectrofotómetro

Ultrospec II

LKB Biochrom

Lector de placas

Thermo Scientific

Multiskan GO

Espectrofotómetro 1510

Incubadora

Boekel Scientific

Modelo 13 3000

Minicentrífuga

Hettich

Mikro 120