



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

Acción de péptidos antimicrobianos en infecciones tópicas en  
animales modelo

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA

Director de tesis

Dr. Gerardo Corzo Burguete Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos

diciembre 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.

La presente Tesis fue realizada bajo la guía del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, que es parte del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría 416403 que me proporcionó en este periodo y por el apoyo al proyecto CB-CONACyT/SEP 240616. A la Dirección General de Asuntos del personal académico (DGAPA) por el apoyo del proyecto IN204415. Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos otorgados para mi estancia de investigación y los congresos a los que asistí.

Diversos aspectos de esta tesis fueron presentados en los congresos:

Ibarra Valencia, M. A &., Corzo, G. (2016). *Antimicrobial Activity of Peptides from Scorpion Venom and Their Possible Use to Heal Infected Wounds*. Póster presentado en ASM Conference on Antibacterial Development. Washington D.C. EEUUAA.

Ibarra Valencia, M. A &., Corzo, G. (2016). *Efecto Antibacteriano In Vitro de Derivados Peptídicos Obtenidos de Veneno de Alacrán*. Póster presentado en VII Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud. Puebla, Pue., México. **Trabajo premiado con el 3er lugar en categoría Trabajos de Posgrado.**

Ibarra Valencia, M. A &., Corzo, G. (2017). *Two synthetic antimicrobial peptides and their therapeutic potential in topical infections*. Póster presentado en Synthetic Peptides. Cabo Santa María, Cuba.

Ibarra Valencia, M. A &., Corzo, G. (2017). *Uso de Péptidos Derivados de Venenos de Alacranes en el Tratamiento de Infecciones Tópicas*. Póster presentado en XLII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Pue. México.

Jurado de examen

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Dr. Ismael Secundino Velázquez

Dr. Ramón Garduño Juárez

Dr. Gerardo Pável Espino Solis

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas

## Contenido

Abreviaturas .....	i
Índice de Tablas .....	ii
Índice de Imágenes y Figuras .....	iii
Resumen .....	v
1. Introducción .....	1
1.1. Péptidos antimicrobianos.....	1
1.2. Infecciones tópicas.....	4
1.2.1 Infecciones tópicas por <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	6
1.3 Estudio con modelos animales.....	7
1.4 Visualización de péptidos .....	8
2. Antecedentes .....	10
2.1. Desarrollo de péptidos antimicrobianos en el laboratorio.....	10
2.1.1 Pin2[G] .....	10
2.1.2 FA1 ( $\Delta$ A29).....	11
2.1.3 Human $\beta$ -defensin 3-M (HBD3-M).....	11
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivo General .....	13
6. Objetivos particulares.....	13
7. Material & Métodos .....	14
7.1 Animales .....	14
7.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	14
7.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> UDP13. ....	14
7.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UDP3. ....	15
7.3 Péptidos.....	15
7.4 Purificación de péptidos.....	15
7.4.1 Cuantificación de proteína.....	16
7.5 Ensayo de difusión en disco.....	17
7.6 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	17
7.7 Concentración bactericida media.....	17
7.8 Actividad hemolítica.....	18

7.9 Índice de desnaturalización de hemoglobina .....	18
7.10 Ensayo de irritación dérmica aguda .....	19
7.11 Ensayo de toxicidad dérmica .....	21
7.12 Irritación subepitelial .....	21
7.13 Recuento bacteriano.....	22
7.14 Modelo de infección <i>in vivo</i> .....	22
7.14.1 Análisis de recuperación de herida.....	23
7.15 Marcaje de péptidos con fluoróforo.....	23
7.17 Visualización por microscopía de fluorescencia.....	25
7.18 Análisis de imagen.....	25
8. Resultados .....	26
8.1 Purificación de péptidos.....	26
8.2 Inhibición de crecimiento bacteriano.....	28
8.3 Concentración mínima inhibitoria .....	29
8.4 Concentración bactericida media.....	33
8.5 Actividad hemolítica.....	33
8.6 Índice de desnaturalización de hemoglobina .....	34
8.7 Irritación dérmica aguda .....	35
8.8 Toxicidad dérmica aguda.....	36
8.9 Irritación subcutánea.....	37
8.10 Modelo de infección <i>in vivo</i> .....	39
8.11 Cicatrización de heridas.....	43
8.12 Marcaje de péptidos con fluoróforo.....	48
8.13 Interacción bacteria péptido.....	50
9. Discusión.....	53
10. Conclusiones .....	64
11. Perspectivas.....	65
Referencias.....	66
Anexos.....	74
A1. Reacción de conjugación de péptidos con BODIPY.....	74
A2. Espectrometría de masas de Pin2[G] y FA1 marcados con BODIPY .....	75

## Abreviaturas

<b>µg/mL</b>	Microgramo/mililitro	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>µM</b>	micromolar	<b>MBC</b>	Concentración bactericida media
<b>A</b>	Absorbancia	<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribunucleico	<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>AMP</b>	Péptido antimicrobiano	<b>MMR</b>	Microorganismos multirresistentes
<b>BAC</b>	Bacteria incubada sin péptido	<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular
<b>CFX</b>	Ceftriaxona	<b>PEP</b>	Péptido incubado sin bacteria
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standars Institute	<b>QMLE</b>	<i>Quick Maximum Likelihood Estimation</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>R1</b>	La constante $1.05 \pm 0.001$
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético	<b>Ri</b>	La razón $DO_{540nm}/DO_{570nm}$ del péptido
<b>GnCl</b>	Cloruro de guanidino	<b>ROI</b>	Región de interés
<b>HBD</b>	Human $\beta$ -defensin	<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>HC<sub>50</sub></b>	Concentración hemolítica media	<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia	<b>TFA</b>	Ácido trifluoro acético
<b>ID (%)</b>	Índice de desnaturalización porcentual	<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>L/D</b>	Lisis/desnaturalización	<b>UV</b>	Ultravioleta

## Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos, peso molecular y pI de los péptidos. ....	15
Tabla 2. Relación entre el radio L/D del modelo <i>in vitro</i> y la actividad irritante en el .....	19
Tabla 3. Control de registro del efecto irritante de los péptidos .....	20
Tabla 4. Concentración inhibitoria en medio sólido de los péptidos contra cepas de referencia y cepas aisladas de paciente con pie diabético .....	29
Tabla 5. Resultados de la relación HC <sub>50</sub> /DI de los péptidos Pin2[G] y FA1 .....	35
Tabla 6. Clasificación de efecto irritante agudo .....	36

## Índice de Imágenes y Figuras

Imagen 1: Diversidad estructural de los AMP. ....	2
Imagen 2. Mecanismos de acción de los AMP.....	4
Imagen 3: Distribución de los parches sobre el dorso del conejo para el estudio de irritación aguda.....	20
Imagen 4. A. Molécula de BODIPY, B. Reacción de esterificación para unir Pin2[G] y FA1 a BODIPY. ....	24
Fig. 1. Purificación de Pin2[G].....	26
Fig. 2. Purificación de FA1 .....	27
Fig. 3. Purificación de HBD3-M. ....	27
Fig. 4. Cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de la HBD3-M.....	28
Fig. 5. Concentración mínima inhibitoria de Pin2[G].....	30
Fig. 6. Concentración mínima inhibitoria de FA1 .....	31
Fig. 7. Concentración mínima inhibitoria de HBD3M.....	32
Fig. 8. Actividad hemolítica de los péptidos Pin2[G] y FA1 .....	34
Fig. 9. Ensayo de irritación aguda .....	35
Fig. 10. Exposición prolongada de FA1 y Pin2[G] en piel .....	37
Fig. 11. Conteo de colonias del modelo de irritación <i>in vivo</i> en herida de conejo sin infección previa .....	38
Fig. 12. Evolución de las heridas en las que se hizo la prueba de irritabilidad subcutánea .	39
Fig. 13. Recuento de UFC del modelo de infección con <i>S. aureus</i> UDP13 .....	40
Fig. 14. Recuento de UFC del modelo de infección con <i>P. aeruginosa</i> UDP3 .....	41
Fig. 15. Recuento de UFC del modelo de infección tratado con FA1 .....	42
Fig. 16. Análisis de heridas infectadas con <i>S. aureus</i> UDP13 tratadas con Pin2[G] .....	44

Fig. 17. Análisis de heridas infectadas con <i>P. aeruginosa</i> UDP3 tratadas con Pin2[G] .....	45
Fig. 18. Análisis de heridas infectadas con <i>P. aeruginosa</i> UDP3 tratadas con FA1 .....	46
Fig. 19. Análisis de recuperación de herida según su área .....	47
Fig. 20. Cromatograma de la purificación de los AMP marcados con BODIPY .....	48
Fig. 21. Cromatograma de la purificación de HBD3M unido a BODIPY .....	49
Fig. 22. Western blot de las fracciones recolectadas durante el marcaje de HBD3M con BODIPY. ....	49
Fig. 23. Imágenes de fluorescencia de péptido marcado con BODIPY en células bacterianas .....	50
Fig. 24. Distribución de péptidos en células bacterianas.....	51
Fig. 25. Distribución de péptidos en la membrana bacteriana .....	52

## Resumen

Los microorganismos multirresistentes (MMR) son un problema de salud pública por lo complicado que es tratar las infecciones que causan, como las tópicas. Ante esto se ha planteado usar péptidos antimicrobianos, AMP, para inhibir el crecimiento de MMR ya que son más eficientes que los antibióticos convencionales. En nuestro laboratorio se desarrollaron los AMP: Pin2[G], derivado de la pandinina; FA1, quimera de vejovina y hadrurina; y la HBD3M, variación recombinante de la  $\beta$ -defensina humana 3. Se ha caracterizado su estabilidad y efecto antibacteriano contra las cepas: *S. aureus* ATCC21293 (SAA) y *P. aeruginosa* ATCC17853. (PAA). Paralelo a esto se cuenta con los MMR: *S. aureus* UDP13 (SAU) y *P. aeruginosa* UDP3 (PAU) aislados de un paciente con úlcera de pie diabético. En este trabajo se analizó el efecto del tratamiento de infecciones tópicas con AMP en conejos. Se establecieron modelos *in vivo* e *in vitro* para determinar su efecto antimicrobiano, capacidad irritante, cicatrizante y distribución en células bacterianas. Los resultados más favorables provinieron de Pin2[G], capaz de inhibir el crecimiento de las cepas probadas *in vitro*, y de: SAU y PAU *in vivo*. Mientras que FA1 y HBD3M, este último a concentraciones muy elevadas, solo actuaron *in vitro* contra PAU y PAA. Pin2[G] y FA1 carecen de efectos irritantes y posiblemente el primero promueva la cicatrización. Los tres péptidos se adhieren principalmente a la membrana bacteriana, pero FA1 y HBD3M se adentran al citosol, lo que refiere a mecanismos de acción característicos de cada uno. Con esto, se puede hablar de la viabilidad del tratamiento de infecciones tópicas con Pin2[G] y posiblemente FA1 si se estudian y desarrollan metodologías que mejoren su actividad.

## 1. Introducción

### 1.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) son polipéptidos generalmente catiónicos, anfipáticos, constituidos por  $\approx 50$  aminoácidos, entre los que puede haber de 2 a 9 residuos de lisina y que poseen un extremo de carga positiva. Dada su participación en la respuesta inmune innata de insectos, anfibios, plantas y células de mamíferos se les conoce como "Péptidos de defensa del huésped". Su alta conservación evolutiva entre estos organismos puede deberse a: su efecto antimicrobiano directo ante patógenos, su participación en el reclutamiento de células inmunitarias o en la expresión génica y producción de citocinas en organismo más complejos, así como en su capacidad de neutralizar componentes de la endotoxina bacteriana (Corzo *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Marr *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2012). Los AMP se han encontrado en las capas externas de diferentes órganos de plantas y en el epitelio de vertebrados e invertebrados, ya que su producción se debe a que células epiteliales y sanguíneas, como eosinófilos, neutrófilos y plaquetas, participan en un sistema de defensa química que busca proteger a un organismo de patógenos (Schröder *et al.*, 2006; Phoenix *et al.*, 2013). Su espectro de acción incluye bacterias Gram- positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos y virus. Se ha probado que en algunos casos son más eficaces que los mismos antibióticos convencionales contra infecciones por microorganismos comunes o microorganismos multi-resistente a fármacos (MMR) (Brogden *et al.* 2005; Marr *et al.* 2006; Bahar *et al.*, 2013).

Por su estructura tridimensional se puede clasificar a los AMP en cuatro familias;  $\alpha$ -hélices, lámina- $\beta$ , estructura  $\alpha\beta$  y estructura no  $\alpha\beta$ , esta última también llamada de espiral o desordenada estas estructuras se ejemplifican en la Imagen 1 (Fjell, *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Cada familia cuenta con características fisicoquímicas que influyen en su actividad antimicrobiana tales como: carga positiva neta, momento hidrofóbico, los ángulos de los residuos cargados, entre otros. De manera general, se acepta que el principal mecanismo de acción de estos péptidos recae en la formación de poros en la membrana celular; lo que trae consigo un incremento en la permeabilidad celular. Aunque también es sabido que algunos

AMP atraviesan la membrana para interactuar con algún blanco intracelular aniónico, como proteínas, DNA o RNA (Kim *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006).

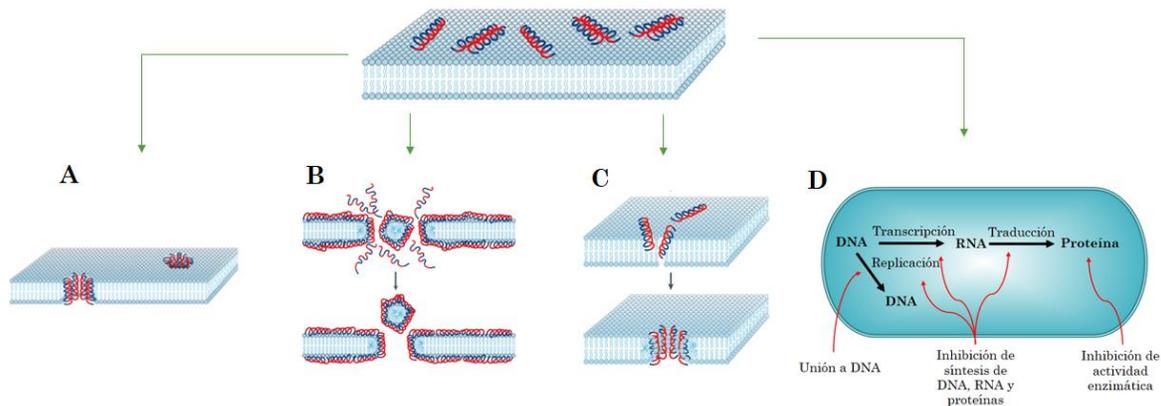


**Imagen 1. Diversidad estructural de los AMP.** De forma natural y sintética se encuentran variedades de antimicrobianos que incluyen las estructuras clásicas de  $\alpha$ -hélice, lámina- $\beta$  y espiral, así como combinaciones de estas (estructuras  $\alpha\beta$ ). Imagen modificada de Fjell, 2012.

Se han propuesto tres modelos para explicar el efecto de los AMP sobre la membrana celular: el barril, la carpeta y el poro toroidal (Imagen 2). Estos inician cuando hay una baja concentración de péptido con respecto a la membrana estando los primero orientados horizontalmente a esta, reacomodándose de manera vertical conforme su proporción aumenta. Este primer paso se lleva a cabo por las propiedades electrostáticas de los péptidos, que, siendo catiónicos, son atraídos por los lípidos aniónicos membranales. El segundo paso se lleva a cabo por su hidrofobicidad, que les permite internalizarse en la membrana. Después de esto, y si se lleva a cabo el modelo de barril, se forma un ramillete con un lumen central, creando así una estructura similar a un barril, el cual se forma generalmente en péptidos helicoidales como la alameticina (Yang *et al.*, 2001). En el modelo de carpeta, los péptidos se acumulan horizontales a la bicapa, nuevamente la atracción se da por interacciones electrostáticas, hasta cubrir la superficie celular y alcanzar una concentración crítica que permite la formación de micelas que desintegran la membrana celular y permiten el acceso a blancos intracelulares (Oren *et al.*, 1999). Finalmente, en el modelo toroidal, los péptidos se alinean perpendicularmente con las cabezas de los fosfolípidos hasta causar dobleces en la

membrana que terminan disrumpiéndola y permitiendo el acceso de agua al espacio intracelular (Matsuzaki *et al.*, 1996).

A pesar de toda la información disponible sobre los AMP's, todavía no se ha comprendido completamente cómo logran distinguir entre microorganismos invasores y células propias del huésped. Para empezar, se debe de tener en cuenta la arquitectura y potencial energético que tienen las membranas celulares, que suelen estar compuestas por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiélin (todos, compuestos sin carga neta). Es la abundancia de esteroides en las membranas eucariotas lo que les diferencia de las procariotas, que son ricas en fosfolípidos hidroxilados como: fosfatidilserina, cardiolipina, fosfoglicerol, etc. Esto le otorga carga negativa a su membrana celular. Es la abundancia de esteroides en las membranas eucariotas lo que les diferencia de las procariotas, que son ricas en fosfolípidos hidroxilados como: fosfatidilserina, cardiolipina, fosfoglicerol, etc. Las diferentes proporciones y variaciones de estos compuestos en la membrana citoplasmática o en la externa les hace susceptibles al efecto de ciertos AMP's. Se ha comprobado que la distribución de lípidos y proteínas puede verse afectada por la intrusión de AMP's en la bicapa, causando un daño irreversible a células procariotas (Tytler *et al.* 1995; Lasch *et al.*, 1998). Otro factor que podría estar implicado en la selectividad de los antimicrobianos está la existencia de ligandos membranales, fosfolípidos que promuevan la inserción de AMP's, y el potencial transmembrana. Otra teoría que ha cobrado fuerza es que los péptidos no suelen presentar una estructura definida, o al menos no una generada por sus uniones intramoleculares, hasta que entran en contacto con una membrana procariota y recuperan o adquieren su forma activa, o que pueden incluso formar oligómeros y así autoensamblarse (Oren *et al.*, 1999; Unger *et al.*, 2001; Yeaman *et al.*, 2003). De igual forma, para hacer un uso adecuado de los AMP, se deben de contar con más estudios de farmacodinamia, farmacocinética, así como resolver los problemas de estabilidad y de degradación de proteasas, así como establecer una correcta dosificación para establecer un tratamiento (Marr, *et al.*, 2006).



**Imagen 2. Mecanismos de acción de los AMP.** Se muestra la variedad de efectos que pueden tener los antimicrobianos sobre el organismo que esté atacando: **A)** Barril; **B)** Carpeta; **C)** Poro toroidal; **D)** Inhibición de vías metabólicas. Estos mecanismos de acción varían según el tipo de AMP y de microorganismo.

Por otro lado, las bacterias han desarrollado mecanismos de defensa constitutivos: que generan mutaciones que favorecen su supervivencia; o inducidos: que solo se presentan al estar en contacto del AMP. Estos incluyen, mecanismos de remodelación de membrana bacteriana, formación de biopelícula, degradación o vacuolización de los péptidos e inclusive la alteración de la respuesta inmune del hospedero para disminuir la secreción de péptidos antimicrobianos (Sperandio *et al.*, 2008; Nuri *et al.*, 2015). Algunas bacterias modifican la composición de sus ácidos grasos y por ende la densidad de la membrana celular dependiendo del antimicrobiano con el que se le trate, ya sea volviéndola más fluida o más rígida (Jones *et al.*, 2008; Shireen *et al.*, 2013). Otro mecanismo de defensa es la D-alanilación de los ácidos lipoteicoicos en bacterias Gram-positivas (Mcbride *et al.*, 2011) y la modificación del lipopolisacárido, principalmente mediante la acilación, defosforilación, hidroxilación y adición de glicinas, fosfoetanolamina o aminoazúcares al lípido A del Lipopolisacárido (LPS) (Nuri *et al.*, 2015).

### 1.2. Infecciones tópicas

En mamíferos, la piel cumple con diversas funciones: mantiene la homeostasis del individuo con el medio externo previniendo la pérdida de tonicidad e hidratantes; actúa como barrera de defensa contra daño mecánico, térmico y físico del individuo; le protege del daño que puede causar la exposición a los rayos ultravioleta; sirve como órgano sensorial; regula la

temperatura corporal y se encarga de la síntesis de moléculas de defensa y nutrientes como la vitamina D3 (Paul *et al.*, 2015). La piel se compone de tres capas: epidermis, que es la principal protección al medio externo; la dermis, compuesta de tejido conjuntivo que le brinda tonicidad y tensión y la hipodermis, compuesta principalmente de tejido adiposo, además se encarga de resistir impactos y servir como delimitante entre el medio interno y externo del cuerpo, tanto la dermis como la hipodermis son las regiones inervadas y vascularizadas de la piel, mientras que la epidermis se compone principalmente de queratinocitos en diferentes estados de diferenciación (Paul *et al.*, 2015). Aunado a esto existen múltiples células inmunitarias partícipes de la respuesta innata de la piel, tales como células de Langerhans, macrófagos y células cebadas. Algunas capas, como el estrato corneo, presentan las características ideales para que la microbiota de la piel pueda reproducirse, pero a su vez la baja temperatura de esta, su pH ácido y la presencia de los péptidos antimicrobianos tipo catelicidinas y  $\beta$ -defensinas evitan que la población bacteriana aumente al grado de generar daño al hospedero (Schröder *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2014). Sin embargo, alteraciones en las defensas del huésped, colonización por organismos virulentos y hasta el contexto social del hospedero favorecen el desarrollo de infecciones microbianas que se clasifican según el mecanismo de patogenicidad o por su localización anatómica. El principal agente etiológico de las infecciones tópicas es *Staphylococcus aureus* particularmente cepas resistentes a meticilina (Lozano *et al.*, 2011). Para el tratamiento de estas infecciones es importante el desarrollo de agentes que se puedan aplicar directamente en la piel, ya que ejercen menor toxicidad y efectos adversos que los fármacos sistémicos (Fletcher *et al.*, 2006). La infección puede ser superficial o profunda, con agentes etiológicos particulares de cada caso; las infecciones agudas superficiales adquiridas en la comunidad, y que no han sido tratadas, suelen ser monobacterianas y principalmente causadas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.* Por otro lado, las infecciones profundas suelen ser polimicrobianas e incluyen, a cocos Gram- positivos (*S. aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), y a bacilos Gram- negativos (*Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) entre otros (Lipsky *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2012).

La población susceptible a este tipo de infecciones incluye a personas con diabetes mellitus que sufren de problemas del pie. De hecho, se calcula que al menos un cuarto de la población

con diabetes está propenso a sufrir de rozaduras o úlceras en la planta del pie. Esto puede involucrar una infección que, en caso de agravarse, puede concluir en la amputación del miembro. Se estima que el 5% de los pacientes con diabetes tienen historial de úlceras, y de estos el 85% corre el riesgo de perder la extremidad, ya sea parcial o totalmente (Espinosa *et al.*, 2012). El papel de la diabetes en el desarrollo de pie diabético es la generación de neuropatías que afectan a la motricidad del individuo provocando así daños mecánicos en la planta del pie que agrietan la piel, de igual forma, favorece el desarrollo de enfermedades macrovasculares que son especialmente comunes y de una rápida diseminación en los miembros inferiores, la combinación del daño mecánico y la afectación vascular facilita la formación de úlceras propensas a ser colonizadas por diferentes microorganismos. Sumado a esto se debe tener en cuenta la disminución en la respuesta inmune que genera la diabetes y que afecta principalmente a las actividades básicas leucocitarias (adherencia, migración, quimiotaxis y actividad bactericida) (Wu *et al.*, 2007; Espinosa *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2012).

#### 1.2.1 Infecciones tópicas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

*S. aureus* es un coco Gram- positivo que habita como organismo comensal en piel, garganta o nariz del humano, pero que, bajo ciertas circunstancias, es capaz de ocasionar desde leves infecciones en la piel hasta abscesos, endocarditis y sepsis, principalmente en pacientes nosocomiales. Ya que cuenta con diversas proteínas y polímeros asociados a membrana (polisacárido capsular, proteína A, peptidoglicano y ácidos teicóicos), así como con enzimas extracelulares (coagulasa, catalasa, hialuronidasa, penicilinasas, etc.) y toxinas (toxina exfoliativa, hemolisina, leucocidina, etc.) que le facilitan colonizar y provocar daño en la dermis (Gordon *et al.*, 2008). Durante la colonización de la piel *S. aureus* usa diferentes mecanismos de patogenicidad para evadir la defensa celular y humoral del hospedero y así poder colonizarla (Ryu *et al.*, 2014). Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina suelen ser la principal causa de infecciones tópicas en pacientes nosocomiales que presentan heridas agudas o crónicas (Pastar *et al.*, 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram- negativo que generalmente habita en el suelo y superficies acuosas. Es un organismo oportunista que ha desarrollado resistencia a una amplia gama de antibióticos (Gellatly *et al.*, 2012). Al igual que *S. aureus*, *P. aeruginosa* es un

agente etiológico importante en las infecciones de heridas cutáneas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, ya que cuenta con los factores de virulencia y los mecanismos de censado poblacional necesarios para colonizar al hospedero (Pastar *et al.*, 2013). El desarrollo de resistencia a antibióticos dificulta el tratamiento de heridas infectadas, ya que tardan más tiempo en sanar y pueden traer consecuencias graves para el individuo (Pastar *et al.*, 2013). Los pacientes con pie diabético son especialmente propensos a sufrir de infecciones polimicrobianas en las que se forma una biopelícula en la que diversas bacterias, entre ellas *P. aeruginosa* y *S. aureus*, coexisten en un ambiente que les proporciona nutrientes, resistencia a la respuesta inmune y al tratamiento con antibióticos (Davis *et al.*, 2008). Estas infecciones son de gran importancia pues de complicarse pueden llevar a una hospitalización o a la amputación de la extremidad (Dowd *et al.*, 2008).

### 1.3 Estudio con modelos animales

El uso de modelos animales en infecciones microbianas permite entender la relación parásito-hospedero, brindando un panorama de los mecanismos de virulencia empleados por el microorganismo, además de que permite probar diversas terapias antibióticas que eventualmente pueden ser extrapoladas a humanos (Dai *et al.*, 2011; Malachowa *et al.*, 2013). Debe de considerarse cómo el modelo difiere fisiológicamente del humano, así como otros procesos moleculares involucrados y las discrepancias en la inmunidad innata y adaptativa de ambos. (Mestas *et al.*, 2004; Avci *et al.*, 2013; Malachowa *et al.*, 2013). En el caso de los péptidos antimicrobianos el estudio de modelos *in vivo* se ha vuelto necesario dadas las diferencias que existen entre las características de este y el modelo *in vitro*, por ejemplo, se ha comprobado que las concentraciones de sal en la piel pueden afectar el funcionamiento de las  $\beta$ -defensinas, cosa que no ocurre en un caldo de cultivo que cuenta con los ingredientes necesarios para que cualquier molécula antimicrobiana actúe de manera óptima (Braff *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006). De igual forma, se ha propuesto que en ciertos casos la función del péptido se ve reforzada por su capacidad de desencadenar un efecto inmunomodulatorio, así lo demostró Bowdish *et al.* en el 2005 tras sintetizar una catelicidina LL-37 carente de actividad antimicrobiana *in vitro*, pero efectiva en un modelo animal de infección por *S. aureus* y *Salmonella spp.* Supuestamente gracias al reclutamiento de agentes inmunitarios. Cabe mencionar que en modelos animales se pueden observar características como

favorecimiento de la cicatrización o angiogénesis, que el estudio *in vitro* sencillamente no permite reproducir (Brown *et al.*, 2006).

Se han hecho múltiples estudios para estandarizar modelos de infección por *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* en heridas de piel, de ratón, rata, conejo y cerdo (Hamblin *et al.*, 2002; Fries *et al.*, 2005; Kilpadi *et al.*, 2007). Este tipo de estudios permiten entender lo que sucede durante heridas causadas por patologías o inclusive las provocadas durante un proceso quirúrgico que requirió de una remoción importante de piel o de un proceso tardado de cicatrización. Pese a que la cantidad de bacterias inoculadas en este tipo de modelos suele ser muy elevado, a comparación de lo que en la naturaleza ocurriría, y de que generalmente no se produce daño en tejido muscular, los resultados de estos experimentos suelen ser reproducibles y con resultados comparables a lo que pasaría en una infección real (Dai *et al.*, 2011).

#### *1.4 Visualización de péptidos*

El entendimiento del mecanismo de acción de los AMP es la base del desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, de igual forma, permite descubrir nuevos blancos farmacológicos y hasta diseñar moléculas que mimeticen el efecto de estos (Muñoz, *et al.*, 2012). Dicho entendimiento se obtiene mediante técnicas microbiológicas (French, 2006), por el análisis de sus propiedades fisicoquímicas mediante métodos computacionales (Leountiadou *et al.*, 2006) o por su visualización directa, que permite observar en tiempo real la interacción del antimicrobiano con complejos multicelulares, bacterias unitarias o incluso componentes extracelulares o intracelulares (Jefferson, *et al.*, 2005; Choi, *et al.*, 2016; Fantner, *et al.*, 2010). Para estos estudios se suele emplear microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fluorescencia y microscopía de fuerza atómica, entre otros (Choi *et al.*, 2016). Recientemente se ha explotado el uso de la microscopía confocal para visualizar la interacción de AMP's, marcados o sintetizados con alguna molécula fluorescente, con el organismo de interés (Muñoz *et al.*, 2010). Dichos fluoróforos deben de ser elegidos considerando las características fisicoquímicas del péptido, por lo que la conjugación no debe de alterar su carga neta o su hidrofobicidad. Moléculas como BODIPY (4,4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4aaza-s-indaceno) han demostrado ser útiles en estudios de microscopía confocal, dadas sus características estructurales: un espaciador alcalil C<sub>3</sub> que se mantiene

entre el fluoróforo y la molécula, su nulo efecto sobre las propiedades fisicoquímicas del péptido, y su resistencia a cambios de pH y polaridad (Bergström *et al.*, 2001; Benincasa *et al.*, 2009). Diversos estudios han hecho uso de este fluoróforo para analizar la interacción entre diversas cepas bacterianas con AMP o antibióticos convencionales, tanto con bacterias en cultivo como en biopelícula, demostrando así la eficacia de este método (Jerfferson *et al.*, 2005; Benincasa *et al.*, 2009).

Una ventaja de la fluorescencia es la extrema sensibilidad de esta técnica, ya que la baja concentración de moléculas requeridas para generar imágenes y su velocidad de excitación facilitan la obtención de información puntual y dinámica (Bocchinfuso *et al.*, 2011).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Desarrollo de péptidos antimicrobianos en el laboratorio

#### 2.1.1 Pin2[G]

En el 2001 Corzo *et al.* aislaron un péptido  $\alpha$ -helicoidal de 24 aminoácidos perteneciente al grupo de los péptidos helicoidales cortos tipo magainina proveniente del veneno del alacrán africano *Pandinus imperator* al que denominaron Pin2, que demostró tener efecto bactericida ante bacterias Gram- negativos y Gram- positivos y un potente efecto hemolítico. Mediante análisis de calorimetría diferencial se observó que Pin2 penetra verticalmente la bicapa lipídica hasta llegar a la membrana celular, en la que el N-terminal forma oligómeros que generan poros de diferentes tamaños (Corzo *et al.*, 2001).

Se ha analizado su efecto antimicrobiano en su forma enantiomérica D- en medio líquido, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 12.5  $\mu\text{M}$  para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Mientras que en un medio sólido la concentración inhibitoria es de 6.2, 6.2 y 12.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Carmona *et al.*, 2013).

Otra de las modificaciones hechas a Pin2 es la sustitución del residuo de prolina 14, que forma un pliegue en la  $\alpha$ -hélice, por una glicina (Rodríguez *et al.*, 2014). Dicho pliegue es común entre los AMP y está relacionado a la alta eficacia microbicida pero también a su alto potencial hemolítico. Este nuevo péptido se denominó Pin2[G], el cual incrementa su actividad antimicrobiana en medios semi-sólidos como el agar (MIC: 12.5  $\mu\text{M}$  ante *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923). También resulta altamente hemolítico alcanzando un 90 % de hemólisis a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  (Rodríguez *et al.*, 2014). Ya en el 2016, Arenas *et al.* determinó que Pin2[G] es más efectivo contra bacterias Gram- positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que contra bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ST258 para las que la MIC fue  $>50 \mu\text{g/mL}$ .

### 2.1.2 FA1 ( $\Delta$ A29)

FA1 es un péptido de 28 aminoácidos derivado de la hadrurina, aislada del alacrán *Hadrurus gertschi*, y la vejovina, del alacrán *Vaejovis mexicanus*, en un protocolo en el que se diseñaron nuevos péptidos de menor longitud e índice de hemólisis a partir de estos, pero con una actividad antimicrobiana similar, además de que se le insertó una secuencia de aminoácidos básicos (KLKR). Durante la síntesis se tomó en cuenta la conservación del N-terminal, la carga, ángulo polar y su hidrofobicidad. Durante los ensayos antimicrobianos y hemolíticos se observó que posee un efecto microbicida más potente y es menos hemolítico que la hadrurina y la vejovina (Sánchez *et al.*, 2013). FA1 también fue analizado por Arenas *et al.* (2016) quién determinó las MIC para *Escherichia coli* ATCC 25922 (6.25  $\mu$ g/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (25  $\mu$ g/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* (>50  $\mu$ g/mL en ambos casos).

En cuanto a la estabilidad de los péptidos, Pin2[G] no sufre daño estructural al diluirlo en plasma sanguíneo o sobrenadante de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, pero FA1 solo se mantiene estable en sobrenadante de *S. aureus*. Sin embargo, ambos son sensibles a enzimas endoproteolíticas (tripsina, elastasa, quimiotripsina y pepsina). Lo que sugiere un obstáculo para su administración terapéutica (Arenas *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Human $\beta$ -defensin 3-M (HBD3-M)

Las defensinas son péptidos catiónicos que contienen seis motivos conservados ricos en cisteína que forman puentes disulfuro característicos de cada variante (alfa-, beta- y theta-defensinas). Cuentan con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram- negativas y Gram-positivas, parásitos y virus y también funcionan como activadores de la respuesta inmune. Las  $\alpha$ -defensinas son sintetizadas por neutrófilos (HNP, -1 a -4) y células de Paneth (HNP-5 y -6) de intestino corto y en el uroepitelio femenino. Mientras que las  $\theta$ -defensinas son péptidos cíclicos aislados por primera vez de leucocitos de mono Rhesius. En humanos la secuencia que codifica para esta defensina existe solo como pseudogen (Braff *et al.*, 2005; Hata *et al.* 2009; Conibear *et al.*, 2014).

Existen cuatro tipos de  $\beta$ -defensinas (HBD 1-4) que se han identificado en diversos tipos celulares, como epitelio y monocitos de sangre periférica. Cada tipo de HBD cuenta con

características propias. Por un lado, la HBD1 se expresa constitutivamente en el epitelio y en ductos sudoríparos, mientras que las HBD2 y 3 solo se expresan cuando existe una infección bacteriana (Braff *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 2009), mientras que la HBD4, que fue identificada usando técnicas de bioinformática y análisis de genómica funcional; se encuentra en neutrófilos, epitelio tiroideo, pulmón, útero y riñón, aunque en bajas concentraciones (Conejo *et al.*, 2001). La HBD3 se compone de una región N terminal no estructurada (Gly1-Lys8) seguida por una corta región helicoidal que precede a tres láminas  $\beta$  antiparalelas y continua con una región C terminal rica en residuos con carga positiva (Sudheendra *et al.*, 2015). Pese a la presencia de puentes disulfuro se ha comprobado que el efecto antimicrobiano no se ve afectado por la forma en que se apareén los residuos de cisteína (Wu *et al.*, 2003; Sudheendra *et al.*, 2015). La HBD3-M fue desarrollada en un protocolo en el que se elaboraron diversas variantes de la HBD3 con la característica de tener una metionina al inicio de su secuencia, además de la incorporación de una región reconocida por la proteasa factor Xa, dos regiones para corte por *BamHI* y una cola de histidina (Corrales *et al.*, 2013). En ensayos para medir su acción antimicrobiana se reportó una MIC de 5  $\mu$ M para *S. aureus* ATCC 21293 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en medio líquido (Corrales *et al.*, 2013). Cabe mencionar que no mostró señales de hemólisis incluso a una concentración de 50  $\mu$ M.

### **3. Justificación**

La aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos dificulta la terapia de diversas infecciones, entre ellas las tópicas. Los péptidos antimicrobianos se han propuesto como una opción de tratamiento dado su amplio espectro de actividad y eficacia. Pero para considerarlos como un tratamiento viable deben de conocerse los efectos que tienen sobre el microorganismo y el hospedero.

### **4. Hipótesis**

Los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3M tendrán un efecto antibacteriano y una farmacodinamia efectiva en el tratamiento de una infección tópica en un modelo animal.

### **5. Objetivo General**

Determinar la actividad antibacteriana de los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3M en un modelo de infección tópica en conejos.

### **6. Objetivos particulares**

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los péptidos.
- Determinar la existencia de posibles efectos citotóxicos.
- Determinar la existencia de un posible efecto irritante o inflamatorio.
- Analizar su acción antimicrobiana en un modelo *in vivo*.
- Analizar la interacción entre el péptido y el microorganismo.

## 7. Material & Métodos

### 7.1 Animales

Para los estudios de irritación y toxicidad aguda en piel, irritación subdérmica y modelo de infección *in vivo* se usaron conejos albinos nueva Zelanda mayores de 12 semanas de edad con un peso 3-4 kg con disponibilidad completa de alimento y comida en un cuarto a 18°C y ciclos de luz oscuridad de 12:12 h. Para estos procedimientos se revisaron la *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2500 Acute Dermal Irritation*, *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1200 Acute Dermal Toxicity*, la *Guide for the care and use of laboratory animals* para asegurar el correcto uso de los animales, así como los requerimientos establecidos en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM con base en la NOM-062-ZOO-1999.

### 7.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se usaron las cepas de *Staphylococcus aureus* UDP13 y *Pseudomonas aeruginosa* UDP3, ambas resistentes a antibióticos, y aisladas de pacientes con úlcera de pie diabético de la clínica Hiperbárica en Cuernavaca, Morelos, así como las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 21293 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Todas se mantienen en viales con glicerol al 30 % a -20 °C. Antes de su uso son sembradas por estría en Agar Mueller-Hinton (MH) a 32 °C durante toda la noche o inoculadas en caldo MH, de igual forma durante toda la noche.

#### 7.2.1 *Staphylococcus aureus* UDP13.

Es una cepa aislada de un paciente con pie diabético de la clínica Hiperbárica del IMSS en Cuernavaca, Morelos. Es resistente a más de 50 µg/mL de ceftriaxona, sulfametoxazol, levofloxacina y azitromicina y sensible a gentamicina, vancomicina y trimetoprim (MIC=1.5 µg/mL) (Jiménez, 2015). Es un microorganismo perteneciente al grupo de riesgo 2 (*Human Pathogens and Toxins Act*) y facilidades de contención nivel 2, que incluye uso de bata, guantes y protección ocular. Su manejo se hizo conforme a lo estipulado por la *Public Health Agency of Canada*.

### 7.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* UDP3.

Es una cepa aislada de un paciente con pie diabético de la clínica Hiperbárica del IMSS en Cuernavaca, Morelos. Es un microorganismo perteneciente al grupo de riesgo 2 (*Human Pathogens and Toxins Act*) y facilidades de contención nivel 2, que incluye uso de bata, guantes y protección ocular. Su manejo se hizo conforme a lo estipulado por la *Public Health Agency of Canada*. Esta es una cepa que se ha caracterizado como resistente hacia  $\beta$ -lactámicos (ampicilina), cefalosporinas de 1<sup>a</sup> (cefalotina) y 3<sup>a</sup> (ceftriaxona, cefotaxima) generación, y hacia antibióticos como nitrofurantoina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, mediante ensayos de difusión en disco. Por otro lado, presenta sensibilidad a gentamicina y levofloxacino (Carmona *et al.*, 2013; Jiménez, 2015).

### 7.3 Péptidos

Se usarán los péptidos sintéticos Pin2[G] y FA1, y la  $\beta$ -defensina recombinante: HBD3-M. Las características de los péptidos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencia de aminoácidos, peso molecular y pI de los péptidos.**

<i>Péptido</i>	<i>Origen</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Peso molecular (Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Referencia</i>
<i>Pin2G</i>	Sintético	FWGALAKGALKLIGSLFSSFSKKD	2,572.0	10.0	Rodríguez <i>et al.</i> , 2014
<i>FA1</i>	Sintético	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	3,008.6	11.4	Sánchez <i>et al.</i> , 2013
<i>HBD3-M</i>	Recombinante	MRGSHHHHHHGSIEGRMGIINTLQKYYCRVRG GRC AVL SCLPK EEQIGK CSTRGRKCCRKK	7,140.3	10.2	Corrales <i>et al.</i> , 2015

### 7.4 Purificación de péptidos

Los péptidos sintéticos en estado crudo se disolvieron en 20% de acetonitrilo y se purificaron en una columna semipreparativa C<sub>18</sub> (10 x 250 mm, Vydac, EUA) de cromatografía de alta presión en fase reversa con un gradiente lineal de acetonitrilo de 20-80 % en presencia de 0.1 % de TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) en 60 min en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Agilent 1100 (Agilent, EUA), equipado con

un detector de UV a 230 nm. La primera purificación elimina contaminantes de bajo peso molecular, reactivos y sub-productos de la síntesis química.

Para la purificación de HBD3-M se pesó 5 gramos de biomasa de *E. coli* M15[(pREP4)] (NaIS, StrS, RifS, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+), estos se diluyeron en 10 mL de Bug Buster + 3  $\mu$ L de benzonasa + 100  $\mu$ L de lisozima (25 mg/mL) y se agitaron durante 30-40 min. Después se centrifugaron por 20 min a 15,000 rpm y se colectó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8 + Cloruro de guanidino (GnCl) 6M y se incubó toda la noche en agitación a 4°C. Después se centrifugó por 25 min a 15,000 rpm y se colectó el sobrenadante. Este se pasó por columna de níquel (Tris-HCl 50 mM pH 8 + GnCl 6M + 35 mM de Imidazol) se eluyó con 300 mM de imidazol y se recolectó en tubos de 1 mL. Se tomaron 100  $\mu$ L de cada fracción y se precipitaron con metanol-cloroformo. La muestra se rehidrató con 20  $\mu$ L de agua, se mezcló e hirvió con buffer de carga durante 5 minutos para correrlas en PAGE-SDS al 17 %. Las fracciones en las que se detectó la proteína se purificaron por cromatografía en fase reversa C<sub>18</sub> y las fracciones que contenían a HBD3M se purificaron por intercambio iónico (Buffer fosfato de sodio 5 mM + acetonitrilo 30 % pH 6.5; Buffer fosfato de sodio 5 mM + acetonitrilo 30% pH 6.5 + NaCl 1M.) las fracciones obtenidas se separan mediante un sistema SDS- PAGE.

#### 7.4.1 Cuantificación de proteína

El rendimiento de las purificaciones se obtuvo con base en su peso seco en mg, y en el caso de Pin2[G] y HBD3-M también se midió su absorbancia a 280 nm considerando su coeficiente de extinción. Y siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon d c$$

Dónde:

A: es la absorbancia de cada péptido a 280 nm o 258 nm

$\epsilon$ : es el coeficiente de extinción molar del péptido (expresado como  $M^{-1} cm^{-1}$ )

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

c: es a concentración de la sustancia absorbente en el medio (expresado en molaridad, M o mol/L).

### 7.5 Ensayo de difusión en disco

Para este ensayo se sigue un método similar al de Kirby-Bauer, en el que la cepa problema se inocula en caldo MH hasta alcanzar una turbidez de McFarland de 0.5. Con un hisopo estéril se hace una siembra masiva del inóculo en agar MH, se deja secar y se colocan 5  $\mu\text{L}$  de cada péptido a diferentes concentraciones diluidos en 50% de acetonitrilo y se espera a que el medio absorba el péptido. Como control positivo se agrega 1  $\mu\text{L}$  de ceftriaxona (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y como control negativo 5  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo al 10%, que es el vehículo en el que están disueltos los péptidos. Se incuba por 18 h a 37°C y se realiza la lectura del halo de inhibición según los criterios del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

### 7.6 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se realizaron ensayos de microdilución seriada de cada péptido según los criterios del CLSI. Para esto se incuban diferentes concentraciones de péptido diluidas en 50  $\mu\text{L}$  de caldo MH con 50  $\mu\text{L}$  de  $\approx 1 \times 10^8$  bacterias/mL diluidas en el mismo caldo. Esta mezcla se incuba a 37°C durante 18 h y se mide la densidad óptica a 595 nm para determinar crecimiento bacteriano, la concentración mínima de péptido a la que este se inhibe es considerada la MIC. En este ensayo se usan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ceftriaxona como control positivo y cultivo bacteriano sin péptido como control negativo, también se incuba la última dilución de cada péptido sin bacteria para confirmar su esterilidad.

### 7.7 Concentración bactericida media

Con base en el resultado de la MIC, se realiza el ensayo de concentración bactericida media (MBC), el cual proporciona la concentración a la cual se logra inhibir el crecimiento del 100% de las bacterias presentes en el medio. Además, permite identificar al péptido como bactericida o bacteriostático. Para determinar la MBC se parte de un ensayo normal de MIC, tras las 18 horas de incubación se recolectan 50  $\mu\text{L}$  de los pozos en los que se inhibió el crecimiento bacteriano para inocularlos en una placa de agar MH e incubarlos a 37°C por 18 h. La concentración mínima de péptido que evita el crecimiento bacteriano representa la MBC y si la MBC es menor a cuatro veces la MIC entonces se considera que el péptido es bactericida, de lo contrario se clasifica como bacteriostático (French *et al.*, 2006).

### 7.8 Actividad hemolítica

Antes de aplicar los péptidos en un modelo animal es necesario determinar la posible toxicidad e irritación que el compuesto puede generar. Para esto existen diversas técnicas *in vitro* que permiten discriminar entre agentes corrosivos y aquellos que no lo son (Mehling *et al.*, 2007). El ensayo de hemólisis es una prueba rutinaria que brinda información útil sobre el comportamiento de un compuesto al interactuar con una membrana celular, esta prueba es de gran importancia cuando se trata de compuestos cuyo mecanismo de acción es mediante la lisis celular. Si bien no proporciona información exacta de lo que pasará en un modelo animal sí brinda información del comportamiento irritante de las moléculas (DB-ALM Protocol n ° 37).

Para esta prueba se recolectan 4 mL de sangre en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se realizaron lavados con 40 mL de PBS 1X, pH 7.4 hasta que el sobrenadante quedo transparente. Se contaron los eritrocitos con una cámara de NeuBauer y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL. Se incubaron 5  $\mu$ L del péptido con 195  $\mu$ L de eritrocitos a 37°C durante 1 h. Se usó Tritón X-100 al 10% como control positivo, y una solución de acetronitrilo al 10% como negativo. Posterior a la incubación se midió la liberación de hemoglobina en el sobrenadante a 575 nm. El porcentaje de hemólisis se obtuvo con la fórmula:  $\%Hemólisis = \frac{100(A_{péptido} - A_{PBS})}{(A_{triton} - A_{PBS})}$ . Donde  $A_{péptido}$ ,  $A_{triton}$  y  $A_{PBS}$  son la absorbancia del sobrenadante de la suspensión eritrocitaria tratada con péptido, Tritón X-100 y PBS 1X respectivamente. La  $HC_{50}$  es la concentración de péptido a la que ocurre el 50% de hemólisis. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### 7.9 Índice de desnaturalización de hemoglobina

Como complemento al ensayo de hemólisis se analizó la capacidad de los péptidos para desnaturalizar hemoglobina a una alta concentración y al ser relacionado con la  $HC_{50}$  se puede conocer la capacidad irritante del compuesto, de hecho, se le considera una prueba suplementaria del test de Draize. Este ensayo se hizo con base en lo establecido en el Protocolo n ° 37 de la DB-ALM y consiste en hacer una solución 1:40 de péptido a 1g/L y eritrocitos a una concentración de  $8 \times 10^9$  células/mL. Esta solución se incubó durante 10 min en agitación a temperatura ambiente y se separa el sobrenadante por centrifugación. Se mide

la densidad óptica del sobrenadante a 540 y 570 nm contra una solución blanco (sobrenadante con acetonitrilo al 10 %), como control positivo se usa Tritón X-100 al 10 % y como control negativo acetonitrilo al 10 % y se calcula el Índice porcentual de desnaturalización de hemoglobina con la fórmula:

$$ID (\%) = 100 (R1 - Ri) / (R1-R2)$$

Dónde:

R1: La constante  $1.05 \pm 0.001$

Ri: La razón  $DO_{540nm}/DO_{570nm}$  del péptido

R2: La razón  $DO_{540nm}/DO_{570nm}$  del Tritón X-100 al 10%

Con este valor se calcula la relación Lisis/desnaturalización (L/D), siendo la lisis la  $HC_{50}$ .

El resultado se interpreta con los criterios de la Tabla 2:

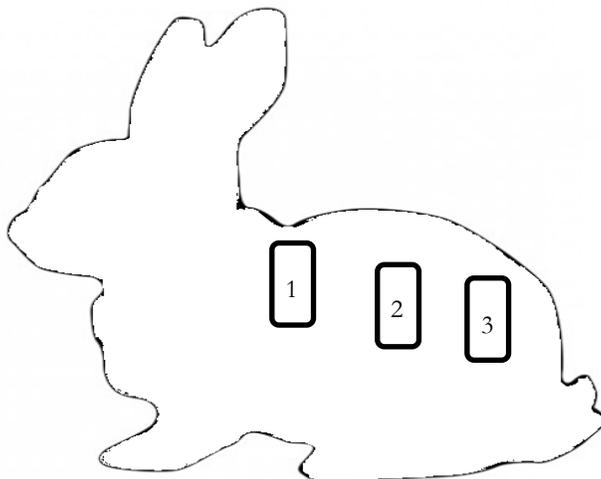
**Tabla 2. Relación entre el radio L/D del modelo *in vitro* y la actividad irritante en el modelo *in vivo*.**

<b>Irritación <i>in vivo</i></b>	<b>Radio L/D <i>in vitro</i></b>
No irritante	>100
Ligeramente irritante	>10
Moderadamente irritante	>1
Irritante	>0.1
Muy irritante	<0.1

### *7.10 Ensayo de irritación dérmica aguda*

El ensayo de irritación se hizo acorde a la *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2500 Acute Dermal Irritation* y permite conocer el efecto irritativo que un compuesto puede tener sobre la piel a corto plazo, durante el mismo se mantiene una revisión del individuo tratado hasta por 14 días, para descartar o confirmar la aparición de edema y/o eritema. Para esto se rasuró el dorso del conejo un día antes de la aplicación del péptido, la concentración usada se estableció con base en los resultados de inhibición de crecimiento, 10  $\mu\text{g/mL}$  para Pin2 [G], y 30  $\mu\text{g/mL}$  para FA1. Para cada péptido se usó un conejo diferente. Los péptidos se aplicaron como se muestra en la Imagen 1, se cubrieron con una gaza estéril y cinta adhesiva, y se fueron retirando según el tiempo que les correspondiera. Al retirar las gazas se registra

el desarrollo de edema y/o eritema tomando en cuenta los criterios de la Tabla 2 obtenida de la misma guía en la que se basó esta prueba y en la que cero se considera como no existente y cuatro el máximo posible.



**Imagen 3:** Distribución de los parches sobre el dorso del conejo para el estudio de irritación aguda. **Parche 1:** retirado a los 3 minutos, **Parche 2:** retirado después de una hora, **Parche 3:** retirado después de 4 horas.

**Tabla 3. Control de registro del efecto irritante de los péptidos**

	Compuesto
<b>Eritema y formación de escara</b>	
Sin eritema	0
Eritema apenas perceptible	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo	4
Máximo posible	4
<b>Formación de edema</b>	
Sin edema	0
Edema apenas perceptible	1
Edema perceptible	2
Edema moderado	3
Edema severo	4
Máximo posible	4

### *7.11 Ensayo de toxicidad dérmica*

Para probar que se puede establecer un tratamiento que involucre una exposición prolongada de la piel, se hizo el ensayo de toxicidad dérmica, según los requerimientos de la *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1200 Acute Dermal Toxicity*, en este ensayo se aplican diferentes concentraciones de los péptidos sobre el dorso de un conejo albino nueva Zelanda previamente rasurado y se registra la aparición de daño dermal después de 24 horas. Este tipo de ensayo brinda información sobre la posibilidad de una aplicación crónica de los compuestos que se prueban, su capacidad de absorción y otras características fisiológicas del animal, tales como pérdida de peso, comportamiento o algún efecto tóxico no previsto.

### *7.12 Irritación subepitelial*

Como complemento a los estudios previos al modelo de infección se desarrolló el ensayo de irritación subepitelial para conocer el comportamiento del tratamiento cuando se aplican únicamente los péptidos, y así descartar que, en caso de presentarse, estos estén causando daño al animal. Para esto se rasuró el dorso de un conejo albino Nueva Zelanda de 3.5 kg un día antes de iniciar el protocolo. Se anestesió con 50 mg/kg de ketamina y 4 mg/kg de xilacina y se marcó un área rectangular de 1x1.5 cm en el dorso del conejo, se desinfectó el contorno de esta con iodopovidona (Fabroven®) y, con un bisturí, se hizo un corte circular de un área menor de 1 cm<sup>2</sup>. Con un hisopo estéril se raspó la herida, este hisopo se metió en un tubo de ensayo con 3 mL de caldo LB para posteriormente hacer el recuento bacteriano de la herida y determinar la existencia de bacterias propias del conejo. Las heridas se cubren con gaza estéril, cinta y vendas para evitar que el conejo tuviera contacto con ellas. Veinticuatro horas después nuevamente se recolectó muestra con hisopo estéril para hacer conteo bacteriano y a partir de ese momento se asignó un tratamiento a cada herida. En la primera (H1) se usarían 100 µL de PBS 1x, para servir como control, en la segunda herida (H2) se trató con 100 µg/mL de ceftriaxona, la tercera (H3) con 10 µg/mL de Pin2[G] y la cuarta con 30 µg/mL de FA1. Este tratamiento se aplicó cada 24 horas durante tres días.

### 7.13 Recuento bacteriano

Para tener un control sobre la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes en las heridas de los conejos, antes y después del tratamiento, se hizo un recuento bacteriano mediante diluciones seriadas 1:5 siguiendo los lineamientos de York (2007). Esto mediante raspado en la herida con un hisopo estéril inoculado en 3 mL de caldo LB, se agita el tubo en vortex durante 20 s, se separa 1 mL del medio en un tubo Eppendorf (Isenberg *et al.*, 2007), y de este se toman 100  $\mu$ L para mezclarlo con 400  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton, esta es la primera dilución 1:5. A partir de la cual se hacen las diluciones hasta llegar a 1:625. De cada una se toman 10  $\mu$ L de medio y se colocan, sin que difunda, en una caja Petri con Agar MH, se espera unos minutos a que seque y se deja incubando por 18 horas a 37 °C. Después de esto se cuenta en número de colonias aisladas que creció en donde se colocó cada gota. Para calcular en número aproximado de UFC/mL con la ecuación:

$$\frac{UFC \times No. de dilución}{0.01} \times 3$$

Las diluciones de cada herida se sembraron en cajas individuales y todas se hicieron por triplicado.

### 7.14 Modelo de infección *in vivo*

Se sigue un proceso similar de rasurado, anestesia, y formación de herida que, en el ensayo de irritación subepitelial, pero en este caso, se inocula 1 mL de cultivo bacteriano crecido en tubos LB toda la noche en agitación. El cultivo se centrifuga 14, 000 RPM por 5 min y se decanta el sobrenadante, el pellet es resuspendido en 50  $\mu$ L de caldo MH y en tres de las cuatro heridas se inocula un pellet, esto se repite a las 12 horas para asegurar una infección. En general: la primera herida sirve como control positivo de la infección, siendo así que no se le aplicará tratamiento con algún antimicrobiano; la segunda herida corresponde al tratamiento con péptido antimicrobiano, aquí se utiliza la concentración encontrada como la mínima inhibitoria para contrarrestar la infección; la tercera herida sirve como control para probar que la infección puede ser detenida por los antibióticos convencionales recomendados en Stevens *et al.* (2014) para el tratamiento de las infecciones subcutáneas, en este caso se usó ceftriaxona [100  $\mu$ g/mL], y la cuarta herida es el control negativo, en la que no se provoca

infección y se refiere al desarrollo de bacterias de la microbiota de la piel. Los tratamientos establecidos se aplican cada 24 horas durante tres días, antes de cada tratamiento se hace raspado con hisopo para hacer conteo bacteriano como se establece en York *et al.* (2007) y posterior a la aplicación del tratamiento las heridas se cubren con gaza estéril y se deja reposar al conejo.

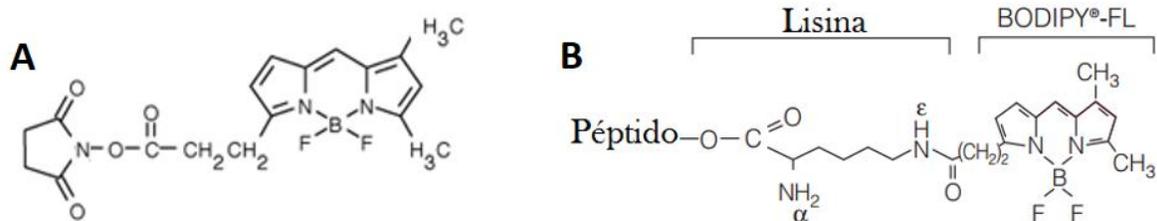
#### 7.14.1 Análisis de recuperación de herida

El restablecimiento de la integridad de la piel es una parte importante del proceso de saneamiento de una herida. Como parte de este proyecto se analizó la posible influencia que puede tener el tratamiento con AMP en las heridas infectadas. Se tomaron dos criterios a consideración: el área que abarca la herida antes y después del tratamiento, y la recuperación de la integridad de la piel con base en la tonalidad que presenta al interior y exterior de la herida. Con lo que se pretendió caracterizar la regeneración de la piel de forma longitudinal y transversal. Para esto se tomaron fotografías de las heridas en cada día de tratamiento. Como punto de referencia se incluye a una regleta para conocer la escala de la imagen. El análisis de imagen se hizo usando el programa ImageJ, el protocolo consistió de convertir las imágenes a escala de grises para estandarizar la tonalidad de piel y aplicar un filtro Gaussiano  $\sigma=5$  para disminuir el ruido de la imagen, posteriormente se estableció como Región de interés (ROI) a una recta que pasa por el centro de las heridas. A continuación, se generó un perfil gráfico y se comparó el perfil de cada herida al momento de haber sido hecha, después de 6 días de tratamiento y con piel intacta como control. Para determinar el cambio en el área de la herida se convierte la imagen a escala de grises, se establece la escala de la imagen y por crecimiento de regiones se calcula el área que corresponde a la piel dañada. Para comparar el cambio de tamaño se consideró el área de cada herida al día uno como el 100 % y con base en dicha medida se determina su evolución.

#### 7.15 Marcaje de péptidos con fluoróforo

Para observar la distribución de los péptidos en las bacterias se usó el fluoróforo BODIPY ( $C_{18}H_{18}BF_2N_3O_4$ ), el cual ya ha sido reportado para este tipo de experimentos (Benincasa *et al.*, 2009). El marcaje de Pin2[G], FA1 y HBD3M se hizo mediante esterificación del grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de los péptidos con el grupo succinimidil éster de BODIPY,

como se ejemplifica en la Imagen 2. Para esto se siguió el protocolo de *Life technologies*. (1996), que consiste en disolver 5-20 mg de péptido en 1 mL de buffer bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3, luego, disolver el fluoróforo en 0.5 mL de Dimetilsulfóxido y añadirlo lentamente a la solución que contiene al péptido. Finalmente, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y de ser necesario se detiene la reacción añadiendo 0.1 mL de hidroxilamina 1.5 M, pH 8.5. La mezcla se purifica por HPLC de fase reversa en una columna analítica C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm, Vydac, EUA) con un gradiente de 20-80 % de acetronitrilo+0.1 % de TFA con flujo de 1 mL/min. Dado que cada péptido tiene más de un residuo de lisina, se agregó la cantidad de BODIPY necesaria para que cada péptido fuera marcado con solo una molécula del fluoróforo. Este método no interfiere con la acción de los péptidos ya que existe un espaciador de C<sub>3</sub> entre la biomolécula y el fluoróforo, con lo que se disminuye la interacción entre estos.



**Imagen 4.** Para los ensayos de fluorescencia se usó BODIPY (A), el cual marca al péptido mediante una reacción de esterificación (B) que une su radical alcalil a un residuo de lisina. La reacción completa se muestra en el Anexo 1.

Para corroborar la unión péptido-fluoróforo se determinó la masa molecular de las fracciones colectadas mediante espectrometría de masas, esperando una masa de de 2,846.2 Da para Pin2[G]+BODIPY (2,572.0 Da de Pin2[G] + 274.2 Da de BODIPY), para FA1+BODIPY de 3,282.8 Da (3,008.6 de FA1 +274.2 de BODIPY), y de 7,535.6 Da para HBD3M+BODIPY (7,146.4 de la HBD3M y 274.2 de BODIPY), en el caso de la HBD3M+BODIPY se confirmó la unión corriendo las fracciones en HPLC fase reversa, pasando la proteína a una membrana de nitrocelulosa mediante westernblot y observando este en un transiluminador. La concentración de péptido unido a marcador se obtuvo usando la fórmula de Lambert-Beer y haciendo la corrección de la contribución del fluoróforo a la absorbancia usando la fórmula  $A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{\text{max}} (CF)$  donde  $A_{\text{protein}}$  es la absorbancia real,  $A_{280}$  la absorbancia de péptido

unido a fluoróforo a 280 nm,  $A_{\max}$  la absorbancia a la longitud de emisión y CF el factor de corrección de BODIPY®.

### *7.17 Visualización por microscopía de fluorescencia*

Para determinar si los péptidos actúan en la membrana o sobre algún blanco intracelular se usó microscopía de fluorescencia. Para esto se incuban  $1 \times 10^8$  cél/mL de *S. aureus* ATCC 21293 y de *P. aeruginosa* ATCC 17853 en 3 mL de caldo LB durante toda la noche, al día siguiente se toma 1 mL y se centrifuga a 14,000 RPM durante 5 min, el sobrenadante se decanta y el pelet es resuspendido en 1 mL de caldo MH, nuevamente se centrifuga y decanta, esto se repite dos veces para tener a las células libres de basura celular o biopelícula. Después de los lavados se resuspende el pelet en 500  $\mu$ L de caldo MH. Para la visualización se toman 10  $\mu$ L de cultivo y se colocan sobre un portaobjetos limpio, se le añade 10  $\mu$ L de péptido marcado evitando que la muestra se disperse y se coloca un cubreobjetos. La muestra se visualizó con ayuda del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM en un microscopio Olympus FLUOVIEW FV1000 Confocal 2P Invertido con un objetivo húmedo 60X W/1.1, luz de excitación a 488 nm y recolección con un detector NDD EPI.

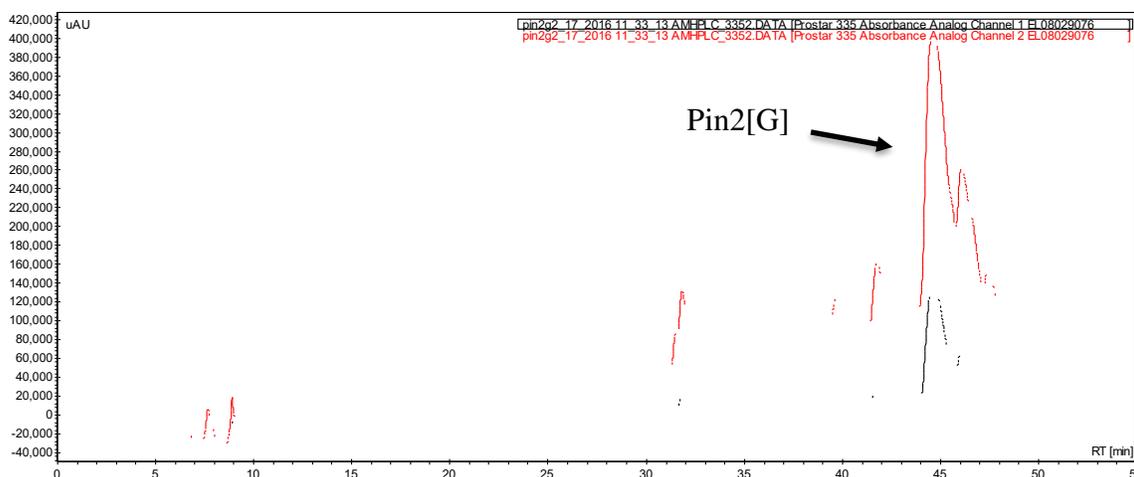
### *7.18 Análisis de imagen*

El procesamiento de las imágenes obtenidas de los ensayos de fluorescencia incluyó su deconvolución con Huygens Essential version 16.10 (Scientific Volume Imaging, The Netherlands, [\\_\\_http://svi.nl\\_\\_](http://svi.nl)) y la identificación de regiones de interés (ROI) con ImageJ. Después, el análisis consistió en la cuantificación de emisión de fluorescencia dentro y fuera de la célula, así como la distribución de esta en la membrana bacteriana. Esto mediante el establecimiento de dos rectas de 3  $\mu$ m; una dibujada transversalmente en las células y la otra que abarque la región que corresponde a la membrana celular. Las células analizadas fueron células individuales, que se enfocaban en el primer plano de la fotografía. Los valores de fluorescencia fueron colectados en una hoja de Excel y analizados con GraphPad Prism 7.

## 8. Resultados

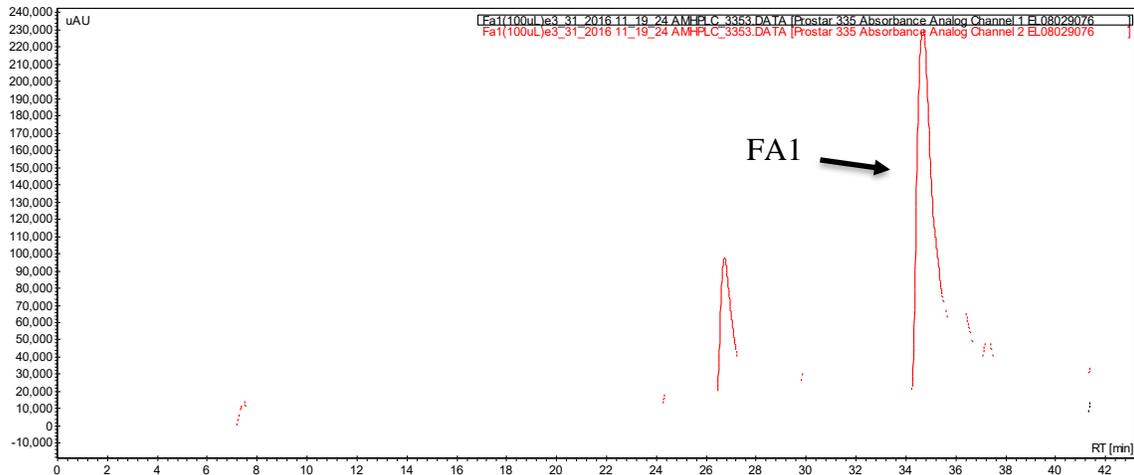
### 8.1 Purificación de péptidos

Los péptidos antimicrobianos fueron sintetizados químicamente por la compañía ChinaPeptides y enviados en estado crudo; esto es, el producto crudo trae contaminantes de péptidos truncados, o bien péptidos no sintetizados correctamente, por tanto, Pin2[G] como FA1 (Figs. 1 and 2) fueron purificados por HPLC de fase reversa con un gradiente de 20-80% de acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) usando una columna semipreparativa C<sub>18</sub> de 10 x 250 mm con un flujo de 2 mL/min. La cantidad de péptido purificado se cuantificó por peso en el caso de FA1, y por cuantificación de absorbancia a 289 nm en el caso de Pin2[G], este último también se cuantificó por peso y se comprobó que ambas determinaciones eran similares.



**Fig. 1. Purificación de Pin2[G]:** Columna C<sub>18</sub> (10 x 250 mm), gradiente 20-80 %B x 60 min, flujo 2 mL/min. **Solvente A:** H<sub>2</sub>O+0.1 %TFA; **Solvente B:** Acetonitrilo+0.1%TFA. Tiempo de retención: 46 min (61% de B). Los trazos representan la absorbancia a 230 (rojo) y 280 (negro) nm. Rendimiento: 13 %.

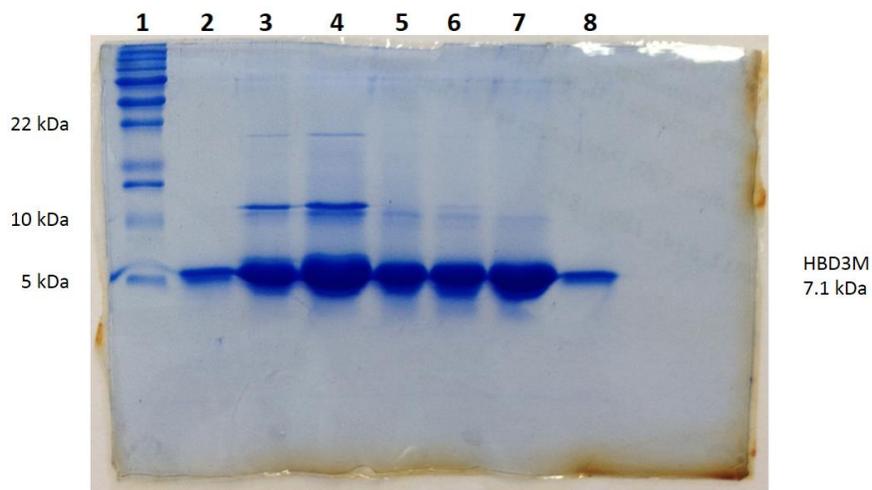
El péptido Pin2[G] representa la fracción mayoritaria de la síntesis peptídica, esta fracción fue colectada y analizada por espectrometría de masas, la cual resulto tener la masa molecular esperada de 2,572.0 Da.



**Fig. 2. Purificación de FA1:** Columna C<sub>18</sub> (10 x 250 mm), gradiente 20-80 %B x 60 min, flujo 2 mL/min. Solvente A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA; solvente B: Acetonitrilo+0.1%TFA. Tiempo de retención: 34 min (47.2% de B). Los trazos representan la absorbancia a 230 (rosa) y 280 (azul) nm. Rendimiento: 23%.

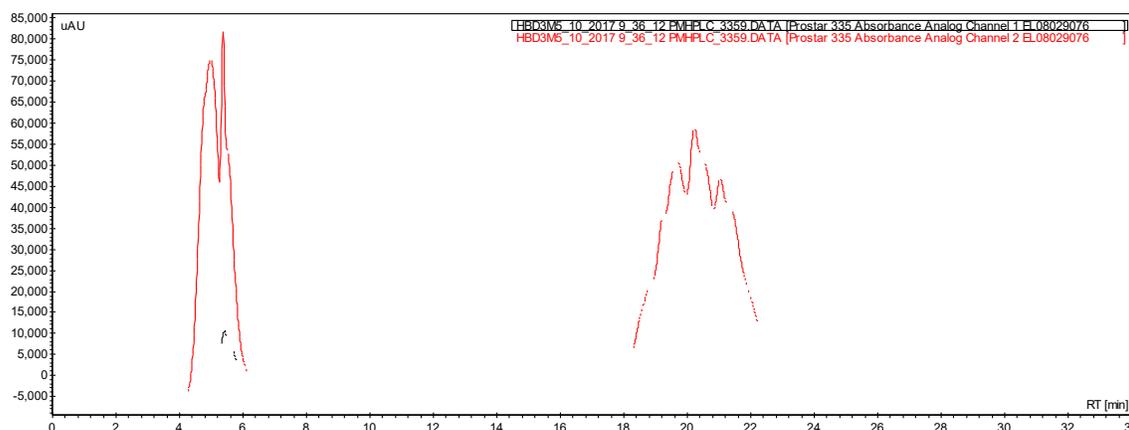
Con respecto al péptido FA1, la fracción mayoritaria de la síntesis peptídica fue colectada y analizada por espectrometría de masas, confirmando también la masa molecular esperada (3,008.6 Da).

Finalmente, la HBD3-M se expresó en la cepa *E. coli* M15[(pREP4)], y fue recuperada de cuerpos de inclusión. La HBD3-M se purificó mediante columnas de afinidad y por cromatografía de fase reversa en columna C<sub>18</sub> (Figura 3).



**Fig. 3. Purificación de HBD3M.** (a) PAGE-SDS de las fracciones recuperadas de la purificación con níquel. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2-8: HBD3M recuperada tras ser eluida de la columna de níquel.

Posteriormente las fracciones en las que se encontró a la proteína son purificadas por HPLC (Figura 4.).



**Fig. 4. Cromatografía de HPLC de purificación de la HBD3-M.** Columna Vydac 218TP (C<sub>18</sub>, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 20-80%B en 60 min. **Solvente A:** H<sub>2</sub>O+0.1%TFA; **Solvente B:** Acetonitrilo+0.1%TFA. Tiempo de retención: 18 min. Los trazos representan la absorbancia a 230 (rojo) y 280 (negro) nm. Rendimiento: 10%.

La HBD3-M representa las fracciones de los minutos 18 a 22 de la última purificación por HPLC, estas fracciones se mezclaron y se analizaron por espectrometría de masas para corroborar su identidad.

### 8.2 Inhibición de crecimiento bacteriano

En el ensayo por Kirby- Bauer se observó que la concentración necesaria de Pin2[G] para detener el crecimiento bacteriano es menor que la de FA1 (Tabla 4). El tamaño del halo de inhibición fue similar en todas las concentraciones de ambos péptidos (6 mm). Por lo que se puede decir que los péptidos logran inhibir el crecimiento de manera localizada, pero no se difunden en el medio. Se puede observar que la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 21293 es más sensible que el aislado clínico de la misma especie, fenómeno que no se repite en el caso de las cepas de *P. aeruginosa*.

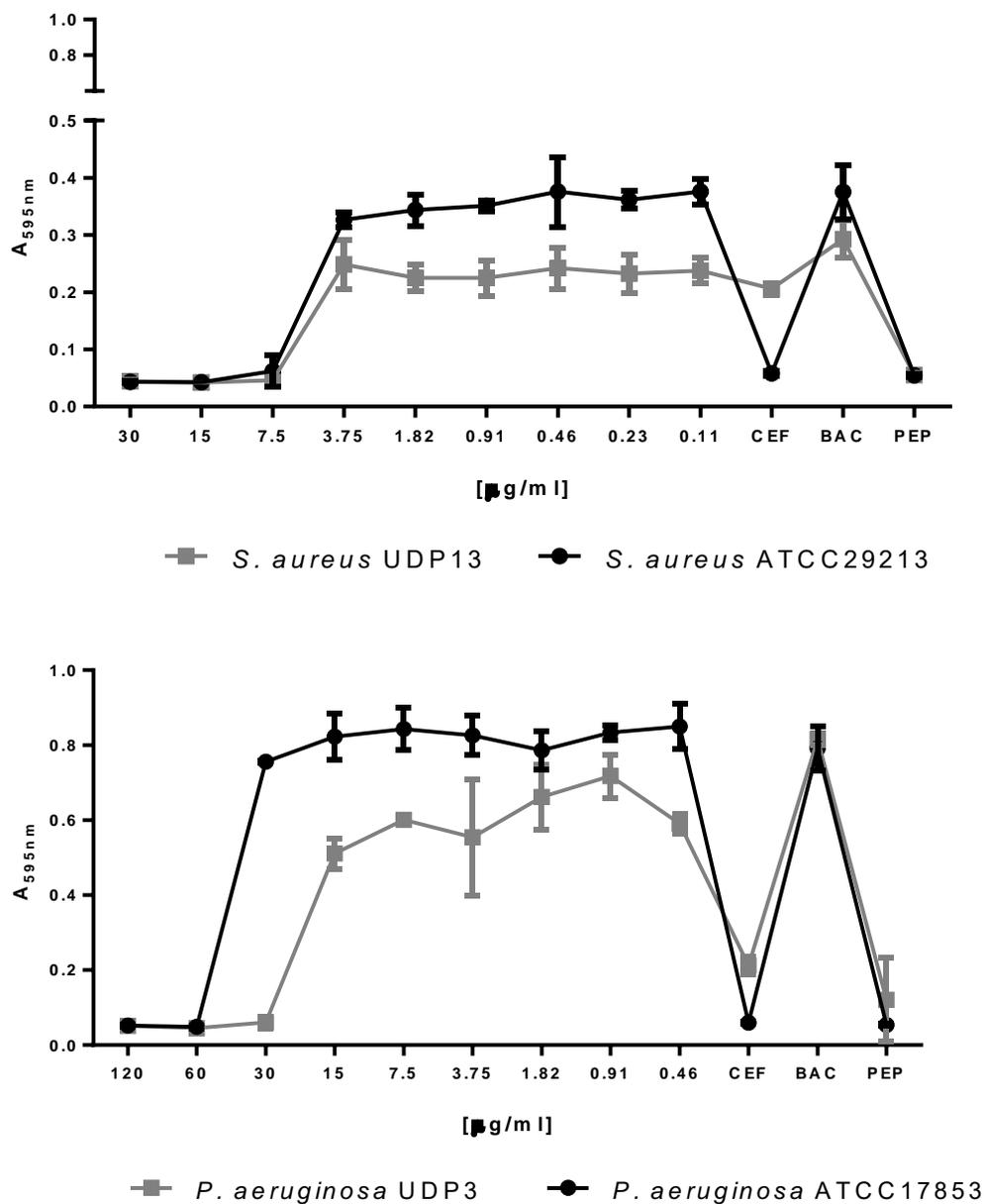
**Tabla 4. Concentración inhibitoria en medio sólido de los péptidos contra cepas de referencia y cepas aisladas de paciente con pie diabético**

Péptido	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	ATCC 21293	UDP13	ATCC 27853	UDP3
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
Pin2[G]	$77 \pm 5.6$	$103 \pm 5.7$	$126.6 \pm 15.6$	$128.6 \pm 15.6$
FA1	$123.3 \pm 5.7$	$150.4 \pm 10$	$150.4 \pm 10$	$150.4 \pm 10$

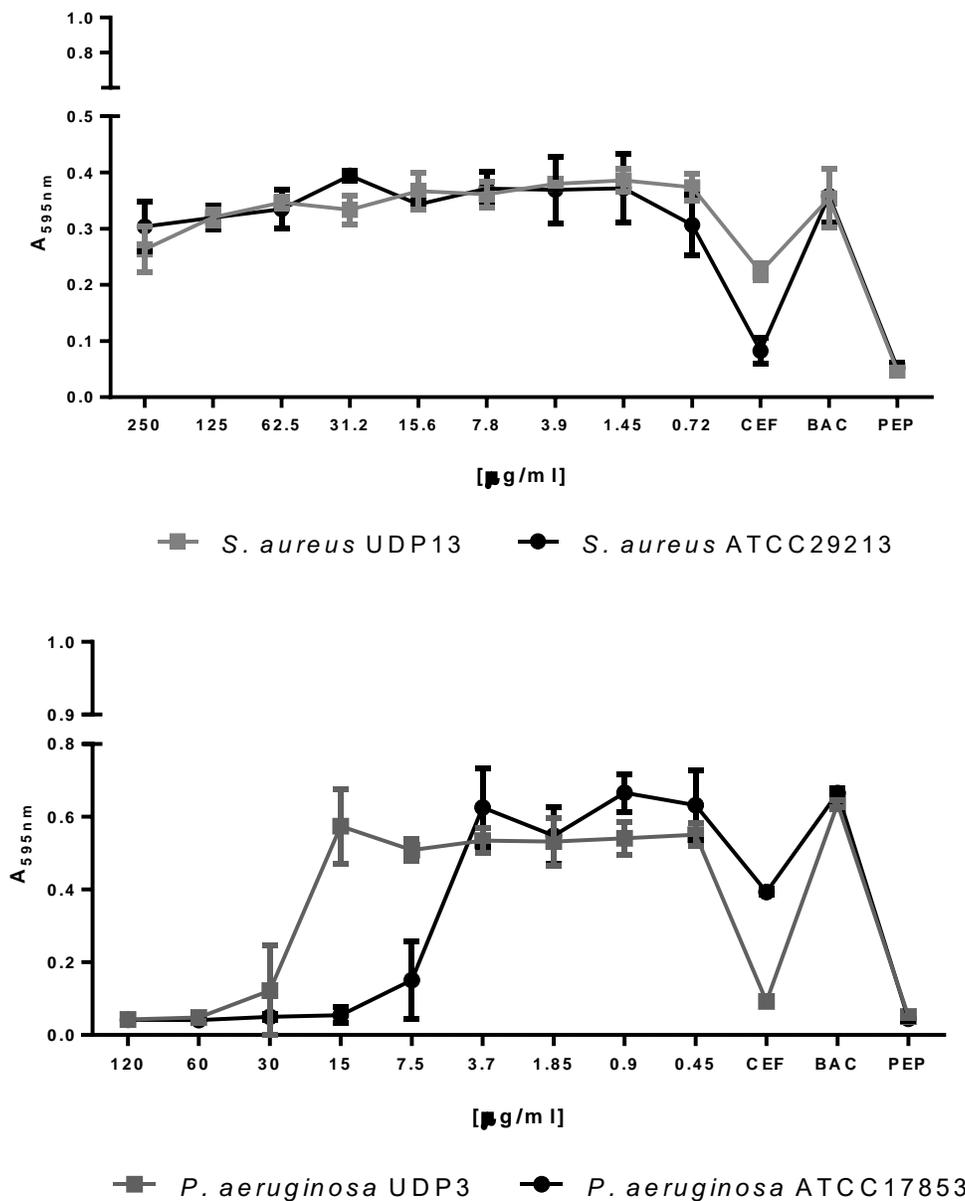
En este caso no se muestran los resultados de la HBD3-M porque en ninguna de las concentraciones probadas inhibió el crecimiento de *S. aureus* o de *P. aeruginosa*. Tal vez esto se debe al tipo de interacción que hay entre la defensina y las bacterias, así como a la concentración de sales y demás iones presentes en el agar MH que pueden interferir en su actividad antimicrobiana.

### 8.3 Concentración mínima inhibitoria

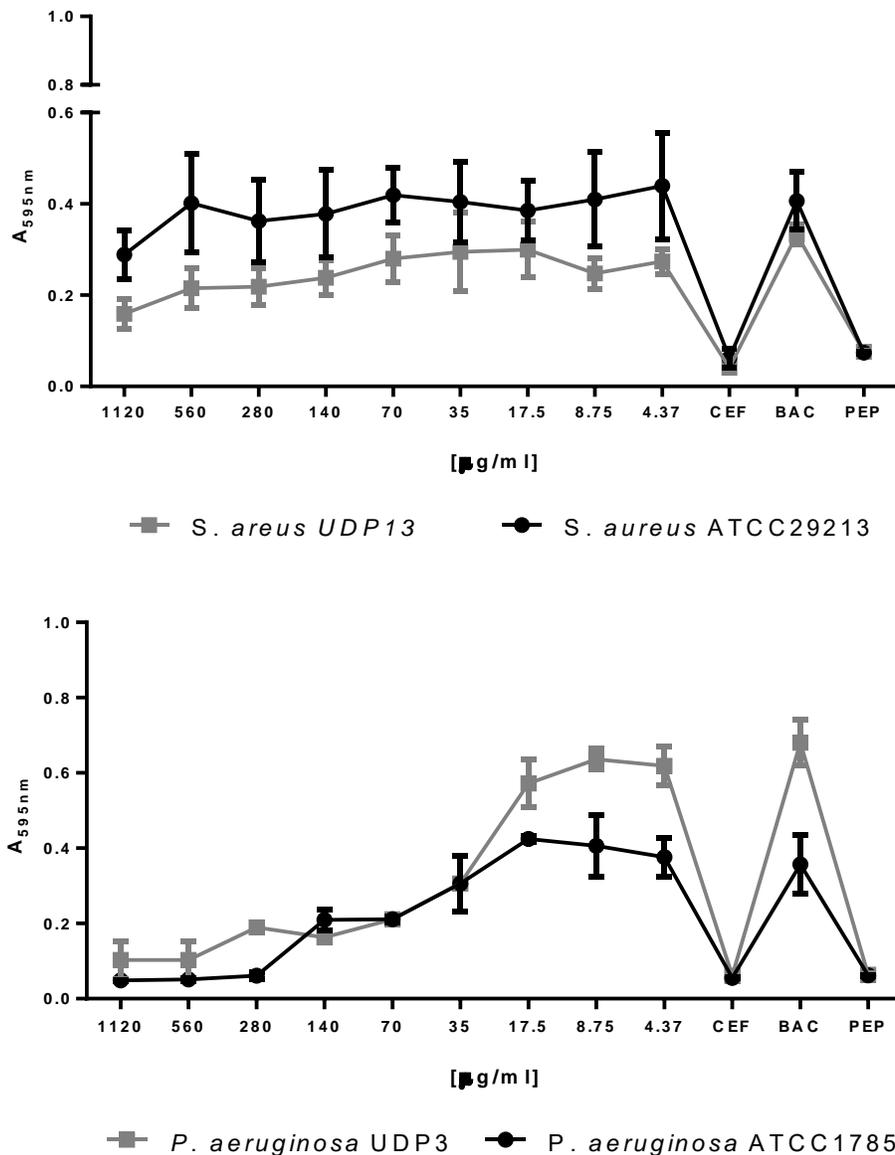
Se probó la actividad antimicrobiana de los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3-M contra las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 21293, *S. aureus* UDP13, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* UDP3 mediante ensayos de dilución seriada en medio líquido, esta prueba difiere del Kirbi-Bauer en la interacción que tiene el péptido con la bacteria en un medio homogenizado. La MIC de Pin2[G] para ambas cepas de *S. aureus* fue de  $7.5 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* fue más resistente al péptido que la cepa UDP3 ( $60 \mu\text{g/mL}$  y  $30 \mu\text{g/mL}$  respectivamente) (Figura 5). Por otro lado, FA1 no fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de *S. aureus* ( $>250 \mu\text{g/mL}$ ) pero sí el de las de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $15 \mu\text{g/mL}$ ) y UDP3 ( $30 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 6). Mientras que la HBD3-M no inhibió el crecimiento de las cepas de *S. aureus*, pero sí el de *P. aeruginosa* ATCC 27853, aunque se necesitó una concentración muy alta de esta ( $140 \mu\text{g/mL}$ ) Figura 7.



**Fig. 5. Concentración mínima inhibitoria de Pin2[G].** Se incubaron diferentes concentraciones del péptido con  $1 \times 10^8$  cél de *S. aureus* ATCC 21293 y *S. aureus* UDP13 (**Superior**), *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* UDP3 (**Inferior**) en caldo Mueller-Hinton durante 18h a 37°C y se leyó el crecimiento bacteriano mediante espectrometría con  $A_{595\text{nm}}$ . La concentración mínima de péptido necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se considera la mínima inhibitoria (MIC). **CEF**: bacteria+ceftriaxona [100  $\mu\text{g/ml}$ ]; **BAC**: Bacteria sin péptido; **PEP**: Péptido sin bacteria. Se muestra el promedio de tres experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.



**Fig. 6. Concentración mínima inhibitoria de FA1.** Se incubaron diferentes concentraciones del péptido con  $1 \times 10^8$  cél de *S. aureus* ATCC 21293 y *S. aureus* UDP13 (**Superior**), *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* UDP3 (**Inferior**) en caldo Mueller-Hinton durante 18h a 37°C y se leyó el crecimiento bacteriano mediante espectrometría con  $A_{595nm}$ . La concentración mínima de péptido necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se considera la mínima inhibitoria (MIC). **CEF**: bacteria+ceftriaxona [100 µg/mL]; **BAC**: Bacteria sin péptido; **PEP**: Péptido sin bacteria. Se muestra el promedio de tres experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.



**Fig. 7. Concentración mínima inhibitoria de HBD3M.** Se incubaron diferentes concentraciones del péptido con  $1 \times 10^8$  cél de *S. aureus* ATCC 21293 y *S. aureus* UDP13 (**Superior**), *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* UDP3 (**Inferior**) en caldo Mueller-Hinton durante 18h a 37°C y se leyó el crecimiento bacteriano mediante espectrometría con  $A_{595nm}$ . La concentración mínima de péptido necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se considera la mínima inhibitoria (MIC). **CEF**: bacteria+ceftriaxona [100 µg/mL]; **BAC**: Bacteria sin péptido; **PEP**: Péptido sin bacteria. Se muestra el promedio de tres experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.

Como se puede observar cada péptido presenta características antimicrobianas propias, siendo Pin2[G] el más efectivo contra *S. aureus* y FA1 el más activo contra *P. aeruginosa*, bacterias Gram (+) y Gram (-) respectivamente. Mientras que HBD3-M, con una MIC de 140

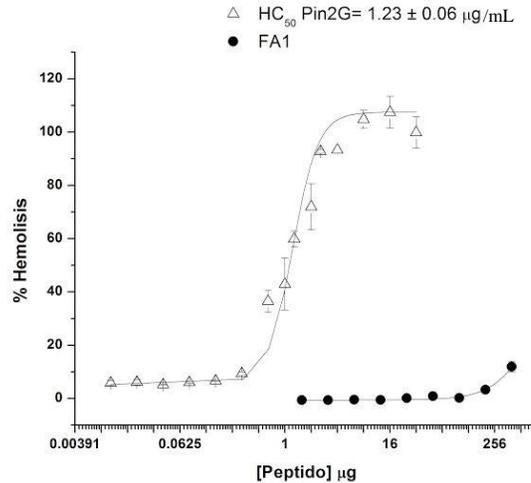
$\mu\text{g/mL}$  para *P. aeruginosa* UDP3, no puede compararse su efecto antimicrobiano con el de Pin2[G] y FA1 en estas condiciones, por lo que a partir de este punto no se continuó considerándolo como péptido viable para el tratamiento. Se observa cómo los AMP afectan el crecimiento de *S. aureus* UDP13 y *P. aeruginosa* UDP3 incluso cuando se les incubaba a concentraciones inferiores a la mínima inhibitoria correspondiente de cada microorganismo.

#### 8.4 Concentración bactericida media

En este ensayo se observó que la MBC de Pin2[G] contra *S. aureus*, tanto ATCC 29213 como UDP13, fue de  $15 \mu\text{g/mL}$  y para ambas cepas de *P. aeruginosa* de  $60 \mu\text{g/mL}$ . Por su lado, la MBC de FA1 contra *S. aureus*, tanto ATCC 29213 como UDP13, fue mayor a  $250 \mu\text{g/mL}$  y para ambas cepas de *P. aeruginosa* de  $60 \mu\text{g/mL}$ . Teniendo esto en cuenta, y según lo establecido en French *et al.* (2006) se puede decir que tanto Pin2[G] como FA1 son péptidos de efecto bactericida.

#### 8.5 Actividad hemolítica

Para analizar el efecto que pueden tener los péptidos sobre una membrana eucariota se determinó su actividad hemolítica, la cual se mide con base en la liberación de hemoglobina tras la lisis eritrocitaria. En este ensayo se observó que, como ya se había reportado previamente (Sánchez *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014) Pin2[G] es mucho más hemolítico que FA1 (Figura 8), ya que la concentración necesaria para que el 50% de los eritrocitos fueran lisados ( $\text{HC}_{50}$ ) por Pin2[G] fue de  $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g}$  y la de FA1 no pudo ser determinada aun cuando se probó a una concentración de  $400 \mu\text{g/mL}$ .



**Fig. 8. Actividad hemolítica de los péptidos Pin2[G] y FA1.** En este ensayo se cuantifica la liberación de hemoglobina como indicativo de la lisis celular. Se usaron  $2.3 \times 10^8$  eritrocitos/mL incubados a  $37^\circ\text{C}$  x 1 h. Control positivo: Tritón-10X al 10%. Control negativo: acetonitrilo al 10%.

Cabe mencionar que la  $\text{HC}_{50}$  de Pin2[G] es menor que su MIC contra *S. aureus* o *P. aeruginosa*, lo cual descarta la idea de un tratamiento intravenoso o sistémico con este péptido. Mientras que FA1, al ser poco hemolítico, es factible de ser usado en tratamientos sistémicos. En este caso no se determinó el efecto hemolítico de HBD3-M, ya que previamente se ha demostrado su nula capacidad hemolítica, aun a concentraciones de  $50 \mu\text{M}$  (Corrales *et al.*, 2013).

### 8.6 Índice de desnaturalización de hemoglobina

La desnaturalización de la hemoglobina (DI) es un estudio complementario a la  $\text{HC}_{50}$  que brinda información sobre la capacidad irritante que tiene un compuesto al ser aplicado en la piel (Mehling *et al.*, 2007), esto al incubar eritrocitos con una concentración elevada del péptido, a diferencia del ensayo de hemólisis en este caso no se analizó la liberación de hemoglobina, sino el daño que esta sufre al estar en contacto con altas concentraciones del péptido. En este caso se observó cómo Pin2[G] presenta una relación  $\text{HC}_{50}/\text{DI}$  de 0.06 que lo clasifica como muy irritante mientras que FA1 resulta moderadamente irritante (6.73) (Tabla 5). Como no se pudo calcular experimentalmente la  $\text{HC}_{50}$  de FA1 se usó un valor aproximado.

**Tabla 5. Resultados de la relación HC<sub>50</sub>/DI de los péptidos Pin2[G] y FA1.**

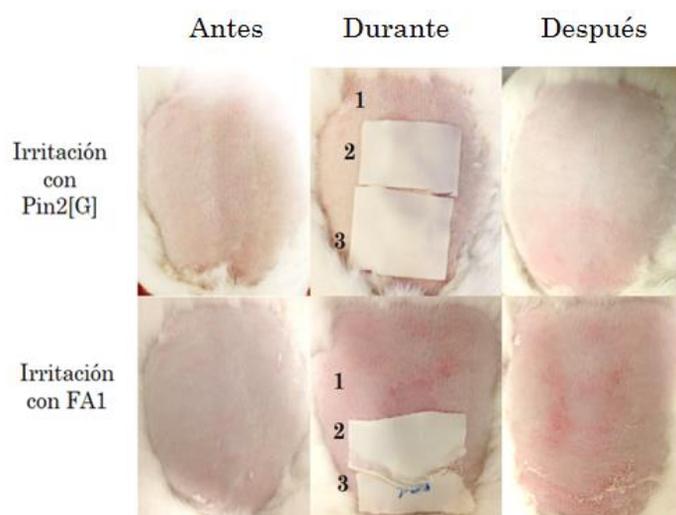
Molécula	HC <sub>50</sub>	ID (%)	HC <sub>50</sub> /ID	Clasificación
Pin2[G]	1.23±0.06	19.23	0.06	Muy irritante
FA1	1243	184.61	6.73	Moderadamente irritante

Según la clasificación de la DataBase *service on Alternative Methods to animal experimentation* (DB-ALM) Pin2[G] se considera un péptido muy irritante y FA1 moderadamente irritante.

Este ensayo actúa como un sustituto a la prueba de irritación en mucosas y de la periferia ocular, también conocida como prueba de Draize, por lo que con la relación HC<sub>50</sub>/DI se podría decir que Pin2[G] resultaría sumamente irritante en el caso de ser usado en infecciones de mucosas, mientras que FA1 solo causaría una leve irritación.

### 8.7 Irritación dérmica aguda

En busca de la vía de administración más idónea de un modelo *in vivo* se hicieron pruebas de irritación aguda en piel, las cuales informan de la capacidad de una sustancia para causar eritema o edema al momento de ser aplicada, esto mediante la aplicación de una cantidad específica del péptido sobre el dorso rasurado de un conejo durante 3 min, 1 hora y 4 horas.



**Fig. 9. Ensayo de irritación aguda.** Para este ensayo se aplican 10 µg de Pin2 [G], y 30 µg de FA1 diluidos en PBS sobre el dorso rasurado de un conejo, estas zonas se cubren con gaza y se protegen con cinta adhesiva. La gaza 1 se retira a los 3 min (1), la segunda a la hora (2) y la tercera a las tres horas (3). En la imagen se muestra el dorso del conejo **Antes** de la aplicación, **Durante** el contacto del péptido con la piel y **Después** de que se retiraran todas las gazas.

Tras la prueba se determinó que Pin2[G] y FA1 carecen de efecto irritante, aun después de los 14 días en los que se mantuvo en vigilancia a los conejos. Tal y como se puede observar en la Figura 9. Con base en estos resultados se clasifica a los péptidos según la tabla que proporciona la *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2500* (Tabla 6).

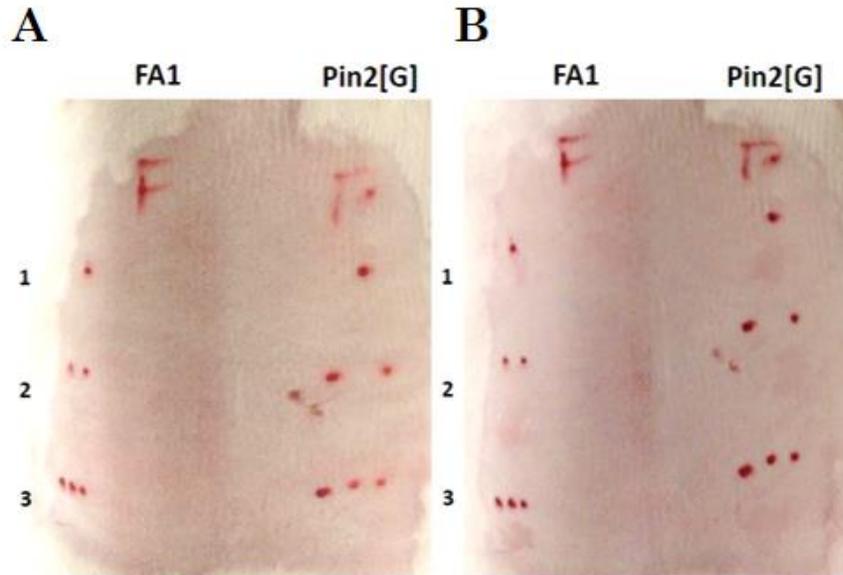
**Tabla 6. Clasificación de efecto irritante agudo.** En sombreado se muestra la clasificación de cada péptido.

	Pin2[G]	FA1
Eritema y formación de escara		
Sin eritema	<b>0</b>	0
Eritema apenas perceptible	1	<b>1</b>
Formación de edema		
Sin edema	<b>0</b>	<b>0</b>

Como se observa, la interacción de los péptidos con la piel no mostró efectos irritantes. Por lo que su aplicación como molécula terapéutica en infecciones tópicas que no involucren membranas o exposición del sistema vascular podría ser factible.

### 8.8 Toxicidad dérmica aguda

Para determinar la viabilidad de aplicar de manera prolongada los péptidos en la piel se realizó el ensayo de toxicidad dérmica, en la que se usaron diferentes concentraciones de péptidos y se observó su efecto tras 24 horas de exposición. Esto con la finalidad de descartar un posible efecto contraproducente en el tratamiento.



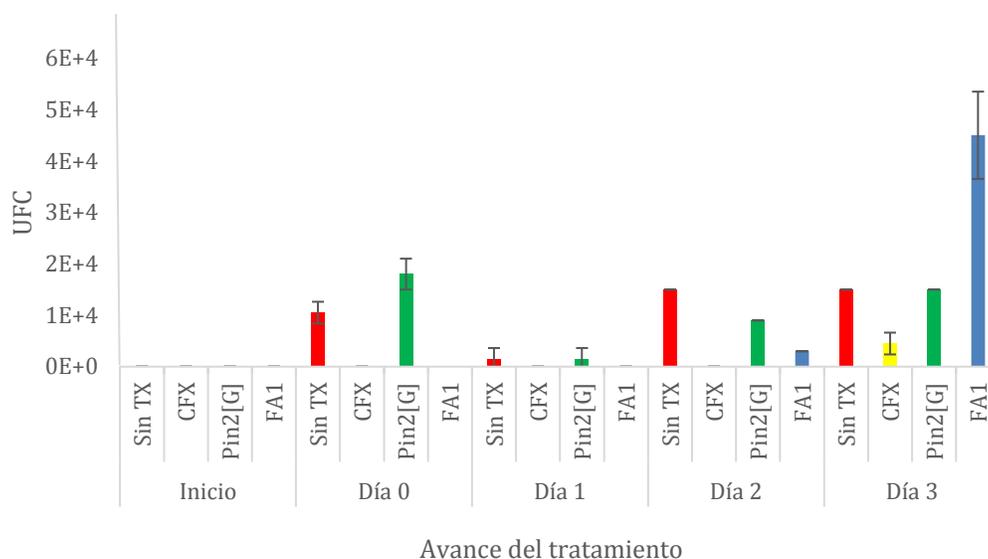
**Fig. 10. Exposición prolongada de FA1 y Pin2[G] en piel.** Se reta durante 24h al conejo con diferentes concentraciones de péptido aplicadas sobre el dorso rasurado y posteriormente se reporta la presencia de eritema o edema. El conejo se mantiene bajo vigilancia durante 14 días registrando su estado anímico y la recuperación del pelaje. En este caso no se observó diferencia en la piel entre el inicio (**A**) y el final de la prueba (**B**). **1.** Concentración 30 y 25  $\mu\text{g}$  de FA1 y Pin2[G], **2.** 60 y 51  $\mu\text{g}$  de FA1 y Pin2[G], **3.** 90 y 77  $\mu\text{g}$  de FA1 y Pin2[G], respectivamente. Este ensayo se hace por triplicado.

Como se puede apreciar en la Figura 10 no hubo cambio perceptible en la epidermis del conejo antes y después de la prueba, durante los siguientes días se monitoreó el estado anímico y peso del conejo sin que se reportara algún tipo de efecto secundario e incluso se registró la recuperación completa del pelo. Cabe mencionar que estas guías consideran como controles a la piel adyacente a los sitios de prueba y no recomiendan el uso de agentes que aseguren el efecto irritante por el daño al que se expone al modelo de prueba.

### 8.9 Irritación subcutánea

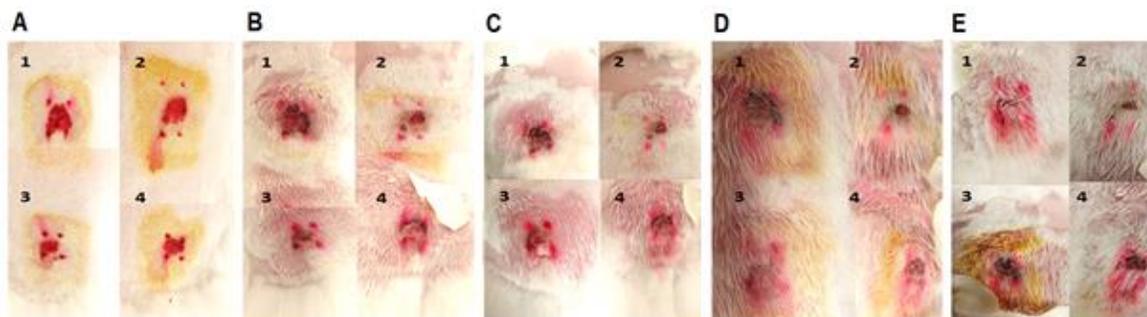
Los resultados de los ensayos de toxicidad dérmica contrastan con los experimentos *in vitro* en cuanto a la seguridad que presentan los péptidos según la vía de administración que se use, por lo que se decidió analizar el efecto de los péptidos en heridas poco profundas que no fueron previamente infectadas, esto para conocer únicamente el daño que podrían generar los péptidos las capas subdérmicas. Para esto, se hicieron heridas de menos de  $1\text{cm}^2$  de área en las que se aplicó un tratamiento con los péptidos Pin2[G] (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y FA1 (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), un

antibiótico convencional (ceftriaxona, 100 µg/ml) y una herida que no fue tratada, estos últimos dos como control. Se tomaron fotografías de las heridas para reportar su evolución durante el tratamiento y analizar la existencia o ausencia de algún tipo de daño causado por los péptidos, el cual se presentaría como dificultad para cicatrizar o nulo crecimiento de pelo. Por otro lado, el conteo diario de colonias, en agar Mueller-Hinton, informó de una recuperación o pérdida de la microbiota de la piel.



**Fig. 11. Conteo de colonias del modelo de irritación *in vivo* en herida de conejo sin infección previa.** Para determinar el efecto que tendrían los péptidos en heridas superficiales se hicieron cuatro heridas (<1cm<sup>2</sup>) en el dorso rasurado de un conejo y se recolectó muestra mediante raspado con hisopo para hacer conteo de UFC (**inicio**) 24 horas después se aplicaron los diferentes tratamientos cada herida recibió un tratamiento diferente. **Sin TX**: Herida sin tratamiento; **CFX**: Herida tratada con 100 µg/mL de ceftriaxona; **Pin2[G]**: Herida tratada con 10 µg/mL de Pin2[G]; **FA1**: Herida tratada con 30 µg/mL de FA1. Cada 24h se hizo recuento bacteriano hasta el **Día 3**. Se muestra el promedio de dos mediciones, cada una hecha por triplicado, y su desviación estándar.

Como se puede observar, en la Figura 11, al inicio del protocolo no se recuperaron bacterias, sin embargo, conforme el tratamiento avanzaba el número de bacterias que se pudieron recuperar fue en aumento. Las heridas tratadas con Pin2[G] y CFX mantuvieron un nivel bajo de UFC's (<2x10<sup>4</sup>) mientras que en el tratamiento con FA1 el número de bacterias fue mayor que en las otras heridas (≈4x10<sup>4</sup>), cabe aclarar que el número de colonias aisladas del tratamiento de FA1 no son suficientes para ser consideradas una infección.

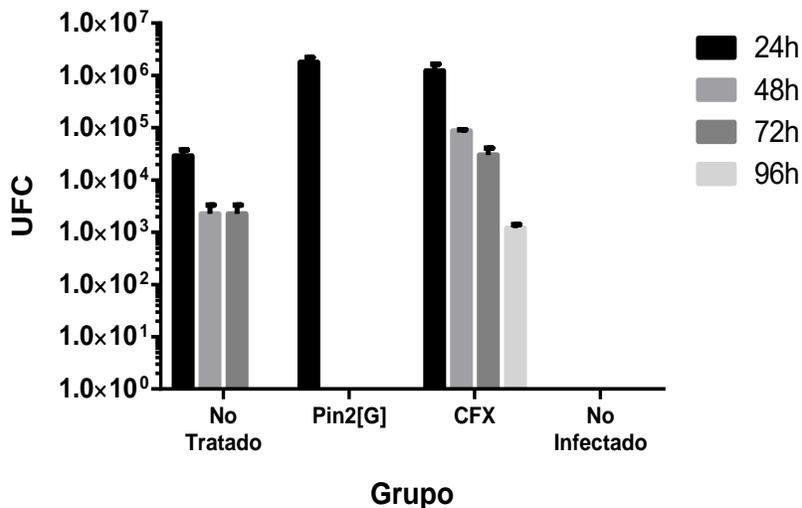


**Fig. 12. Evolución de las heridas en las que se hizo la prueba de irritabilidad subcutánea.** Fotografías tomadas a lo largo del tratamiento para registrar cicatrización y recuperación de pelo: **A** Inicio, **B** día 0, **C** día 1, **D** día 2, **E** día 3. **1.** Sin Tratamiento; **2.** CFX [100 µg/mL]; **3.** Herida tratada con 10 µg/mL de Pin2[G]; **4:** Herida tratada con 30 µg/mL de FA1.

El tratamiento con antimicrobianos no impidió la recuperación de las heridas ni el crecimiento de pelaje (Figura 12). Después de catorce días de finalizado el tratamiento las heridas estaban cicatrizadas y cubiertas de cabello. Por lo que podemos considerar que, a pesar de las complicaciones que un tratamiento sistémico generaría, Pin2[G] y FA1 pueden ser usados para tratar infecciones tópicas superficiales

#### 8.10 Modelo de infección *in vivo*

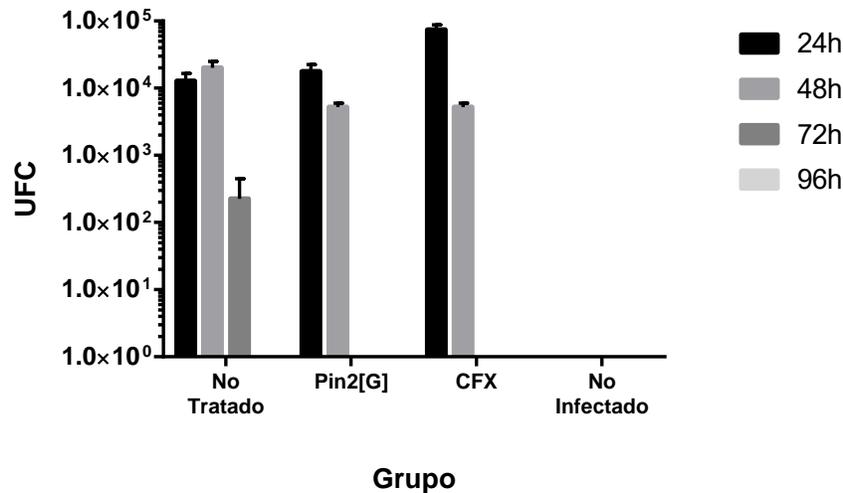
Con los resultados *in vitro* y la posibilidad de administrar un tratamiento con AMP's a nivel subcutáneo se procedió a establecer el modelo de infección en heridas en conejo, para esto se consideró la MIC de Pin2[G] y FA1 contra *S. aureus* UDP13 y *P. aeruginosa* UDP3. Para establecer la infección se hicieron cuatro heridas en el dorso rasurado de un conejo nueva zelanda, tres fueron infectadas con  $3 \times 10^8$  cel y la cuarta quedó sin inocular para servir como control negativo. De las tres heridas infectadas una fue tratada con PBS y las otras dos con péptido o ceftriaxona. Los resultados se muestran en la Figura 13.



**Fig. 13. Recuento de UFC del modelo de infección con *S. aureus* UDP13.** Se hicieron cuatro heridas (<1cm<sup>2</sup>) tres de estas se infectaron con *S. aureus* UDP13. Cada una recibió diferentes tratamientos y desde el inicio de la infección hasta el día 4 se hizo recuento bacteriano para conocer la evolución de la infección. **No tratado:** Herida sin tratamiento; **Pin2[G]:** Herida tratada con 50 µg/mL de Pin2[G]; **CFX:** Herida tratada con 100 µg/mL de ceftriaxona; **No infectado:** Herida sin infección tratada con PBS. Se muestra el promedio de dos experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.

En este primer tratamiento se puede observar el efecto antimicrobiano que tiene Pin2[G] contra una infección de *S. aureus* UDP13 en herida cutánea superficial de conejo. El establecimiento de la infección se logró tras tres inoculaciones cada 8 horas. Desde el primer día de tratamiento el número de bacterias se ve drásticamente reducido. Mientras que en la herida tratada con ceftriaxona y en la que se aplicó PBS1X se mantuvo la infección, aunque, eventualmente, el número de bacterias se reduce drásticamente, posiblemente debido a la respuesta inmune del conejo. El efecto antibacteriano en el modelo animal se correlaciona con los resultados obtenidos *in vitro*.

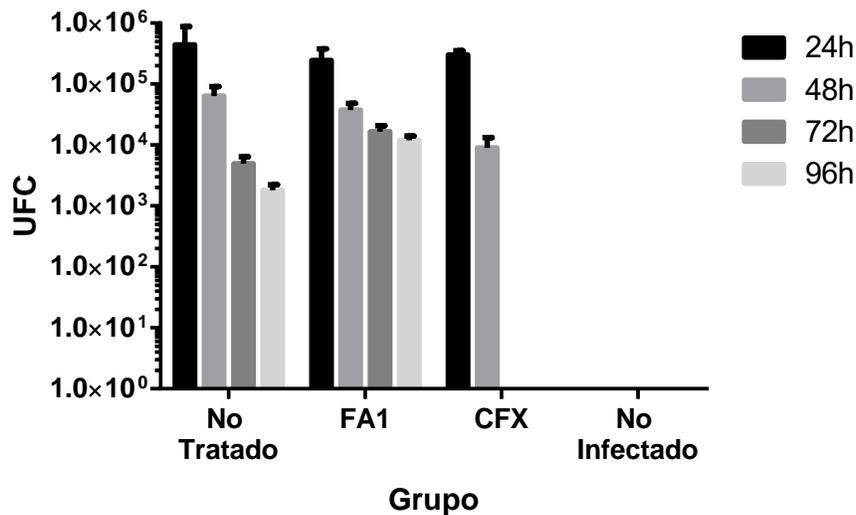
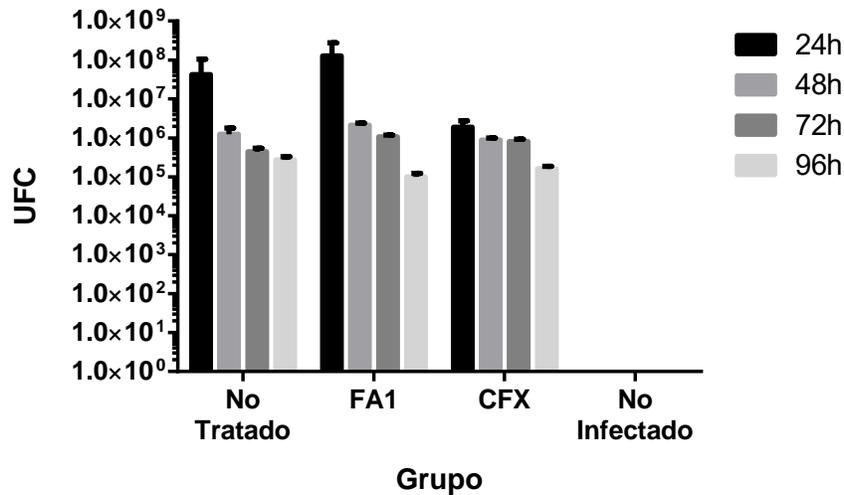
Para continuar con la caracterización del efecto *in vivo* de Pin2[G] se produjo una infección subcutánea con *P. aeruginosa* UDP3 para ser tratada con 40 µg/mL del péptido. En este caso solo se necesitaron de dos inoculaciones, a las 0 y 12 horas, con 10<sup>8</sup> cel/mL para establecer una infección. Después de 24 h de la primera inoculación ya se contaba con un alto número de bacterias en cada herida, lo que dio lugar a que se iniciara con el tratamiento cada 24 h. La evolución de este se muestra en la Figura 14.



**Fig. 14. Recuento de UFC del modelo de infección con *P. aeruginosa* UDP3.** Se hicieron cuatro heridas (<1cm<sup>2</sup>) tres de estas se infectaron con *P. aeruginosa* UDP3. Cada una recibió diferentes tratamientos y desde el inicio de la infección hasta el día 4 se hizo recuento bacteriano para conocer la evolución de la infección. **No tratado:** Herida sin tratamiento; **Pin2[G]:** Herida tratada con 40 µg/mL de Pin2[G]; **CFX:** Herida tratada con 100 µg/mL de ceftriaxona; **No infectado:** Herida sin infección tratada con PBS. Se muestra el promedio de dos experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.

En este caso, al igual que en el anterior, se logró erradicar la infección, sin embargo, esto fue tras la segunda aplicación del tratamiento (72h). Al igual que en el experimento anterior el número de UFC se redujó totalmente tras tres días de tratamiento. Los resultados muestran la efectividad del tratamiento con Pin2[G] tanto como para contrarrestar el crecimiento de *S. aureus* como el de *P. aeruginosa*, así como una correlación con los datos obtenidos *in vitro*.

Finalmente se procedió a caracterizar el efecto *in vivo* de FA1 en el tratamiento de infecciones subcutáneas contra *P. aeruginosa* UDP3 y *S. aureus* UDP13, este último se hizo para corroborar lo reportado *in vitro*. Se siguió el mismo procedimiento que con las infecciones anteriores y se administraron 50 µg/mL de FA1 cada 24 h durante 3 días. Nuevamente se hicieron dos inoculaciones y el tratamiento inició 24 h después de la primera. Los resultados de este tratamiento se muestran en la Figura 15.



**Fig. 15. Recuento de UFC del modelo de infección tratado con FA1.** Se hicieron cuatro heridas ( $<1\text{cm}^2$ ) tres de estas se infectaron con *S. aureus* UDP13 (**superior**) y *P. aeruginosa* UDP3 (**inferior**). Cada una recibió diferentes tratamientos y desde el inicio de la infección hasta el día 4 se hizo recuento bacteriano para conocer la evolución de la infección. **No tratado:** Herida sin tratamiento; **FA1:** Herida tratada con  $50 \mu\text{g/mL}$  de FA1; **CFX:** Herida tratada con  $100 \mu\text{g/mL}$  de ceftriaxona; **No infectado:** Herida sin infección tratada con PBS. Se muestra el promedio de dos experimentos, cada uno hecho por triplicado, y su desviación estándar.

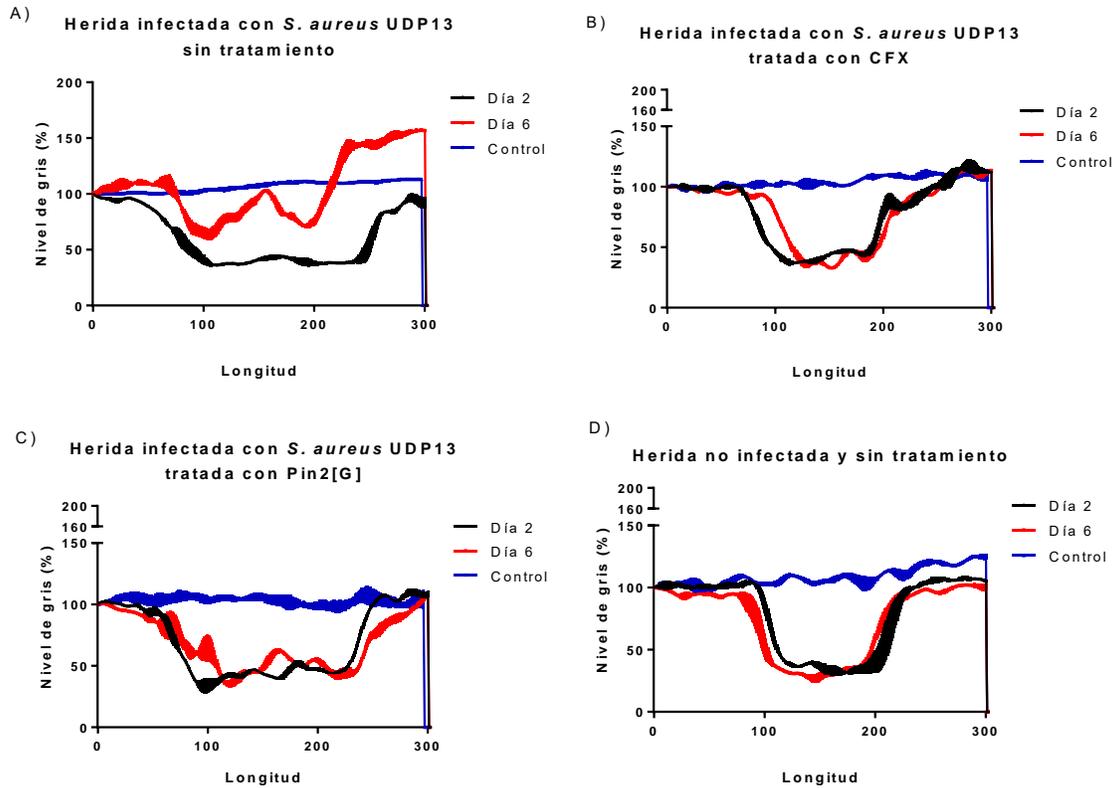
El modelo de infección con *S. aureus* UDP13 no registró decremento en el número de UFC recuperadas de la herida infectada y tratada con FA1, lo que corrobora la falta de efecto antimicrobiano observada *in vitro*. Sin embargo, y contrario a lo que se había observado en la placa de caldo MH, el tratamiento con FA1 tampoco inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* UDP3, de hecho, se registró un aumento en el número de bacterias

recuperadas, que incluso resulta superior al total de UFC obtenidas en las heridas tratadas con PBS1X o antibiótico. En este modelo se continuaron recuperando UFC tras las 96h de tratamiento, lo que habla de un mecanismo de defensa inactivo en estos modelos, pero presente en el tratamiento con Pin2[G].

Para comprobar que las UFC recuperadas de los modelos de infección correspondían a *S. aureus* se hicieron pruebas de catalasa y oxidasa, así como una reinoculación en medio sal y manitol, que es un medio que nos permite diferenciar entre *S. aureus* y *S. epidermidis*. El crecimiento de *P. aeruginosa* se comprobó por las características morfológicas de sus colonias: planas, difusas y por la liberación de cromóforos.

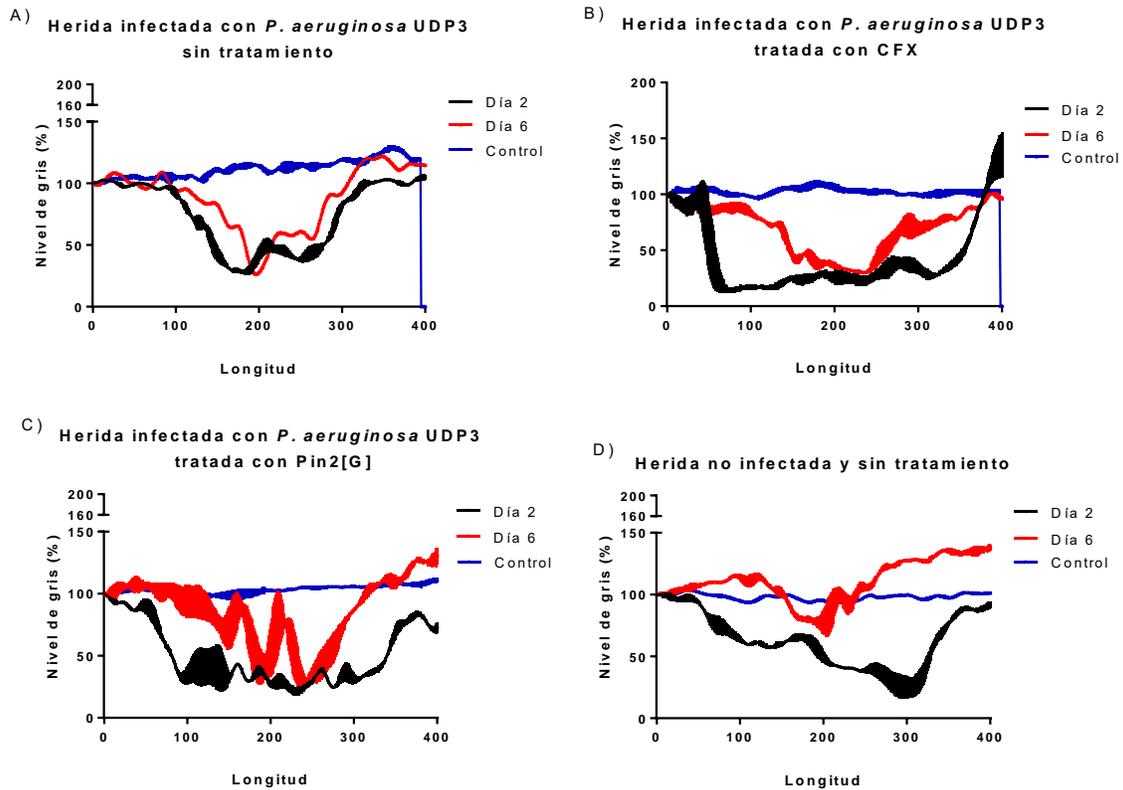
### 8.11 Cicatrización de heridas

El proceso de cicatrización involucra la recuperación de la hemostasis, inflamación, proliferación celular y el remodelado de las capas de la piel. Estos promueven la activación y diferenciación de diversas líneas celulares, así como el desencadenamiento de vías de señalización efectoras de la respuesta inmune o de la maduración celular (Guo *et al.*, 2010). Previamente se han establecido modelos de análisis de imagen para el estudio de la recuperación de heridas con base en el área que estas abarcan; usando programas especializados en el reconocimiento de patrones y crecimiento de regiones (Papazoglou *et al.*, 2010). Para determinar si el tratamiento con Pin2[G] o FA1 favorece la cicatrización se midió el cambio de tonalidad y el área de las heridas durante los seis días de tratamiento, lo cual nos brinda información sobre la recuperación transversal y longitudinal del epitelio. Los resultados del análisis de tonalidad se muestran en las Figuras 16, 17 y 18.



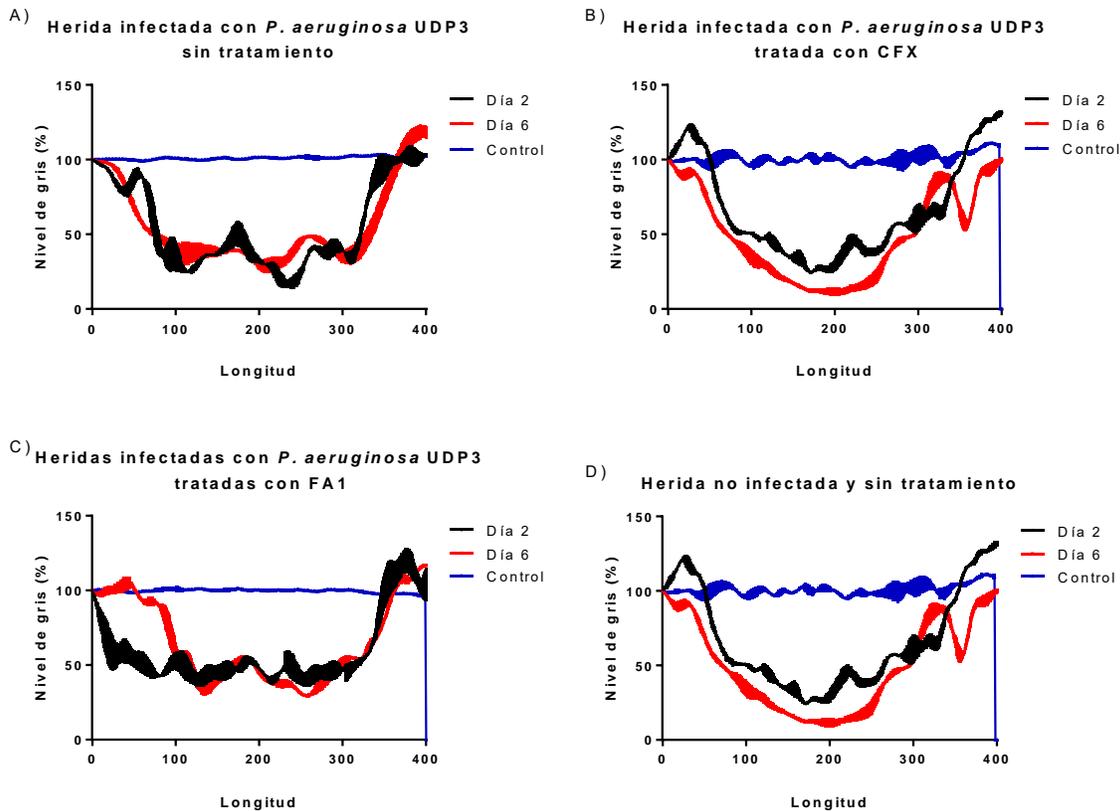
**Fig. 16. Análisis de heridas infectadas con *S. aureus* UDP13 tratadas con Pin2[G].** En cada imagen se compara el tamaño y tonalidad de las heridas: al establecer la infección (Día 2) y una vez finalizado el tratamiento (Día 6) con la de la piel intacta (control). Cada medición se hizo por triplicado y la longitud representa los píxeles de imagen. Se muestra el promedio de las mediciones y la desviación estándar.

En la Fig. 16 se muestra la evolución de las heridas infectadas con *S. aureus* UDP13 sometida a diferentes tratamientos. Se puede observar cómo tras los seis días ninguna herida logró recuperar la apariencia de la piel sana siendo la herida tratada con ceftriaxona y la que fue infectada pero no recibió tratamiento las que mostraron cierta recuperación, lo que indica una recuperación del epitelio.



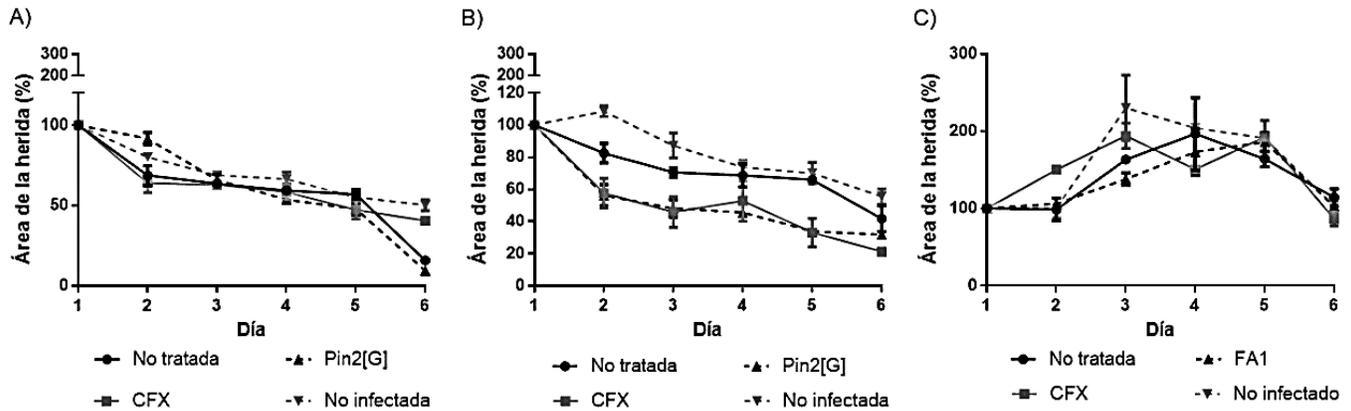
**Fig. 17. Análisis de heridas infectadas con *P. aeruginosa* UDP3 tratadas con Pin2[G].** En cada imagen se compara el tamaño y tonalidad de las heridas: al establecer la infección (Día 2) y una vez finalizado el tratamiento (Día 6) con la de la piel intacta (control). Cada medición se hizo por triplicado y la longitud representa los pixeles de imagen. Se muestra el promedio de las mediciones y la desviación estándar.

En el caso de las heridas infectadas con *P. aeruginosa* UDP3 se observa cómo la que no fue tratada hubo incluso un ligero aumento en el deterioro de la piel (Fig.17a), mientras que la que fue tratada con ceftriaxona presentó cierta recuperación sin llegar a presentar las características del control (Fig. 17b). En este caso Pin2[G], pese a haber detenido la infección, disminuyó ligeramente el diámetro de la herida, pero sin llegar a ser determinante en el desarrollo celular basal que favorecería la recuperación del epitelio.



**Fig. 18. Análisis de heridas infectadas con *P. aeruginosa* UDP3 tratadas con FA1.** En cada imagen se compara el tamaño y tonalidad de las heridas: al establecer la infección (Día 2) y una vez finalizado el tratamiento (Día 6) con la de la piel intacta (control). Cada medición se hizo por triplicado y la longitud representa los pixeles de imagen. Se muestra el promedio de las mediciones y la desviación estándar.

En el caso de las heridas infectadas con *P. aeruginosa* UDP3 del conejo tratado con FA1 se observa cómo en todos los casos, a excepción de la que recibió ceftriaxona, se registró un deterioro de la piel e inclusive aumento en el diámetro y diferencia de tonalidad con respecto a la piel sana. El aumento de daño en la herida en la que se aplicó FA1 se podría deber a que, como se vio en el recuento bacteriano, este no inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* en el modelo *in vivo*, lo que permite que la bacteria se siga estableciendo y, por lo tanto, aumente la afectación a la piel.



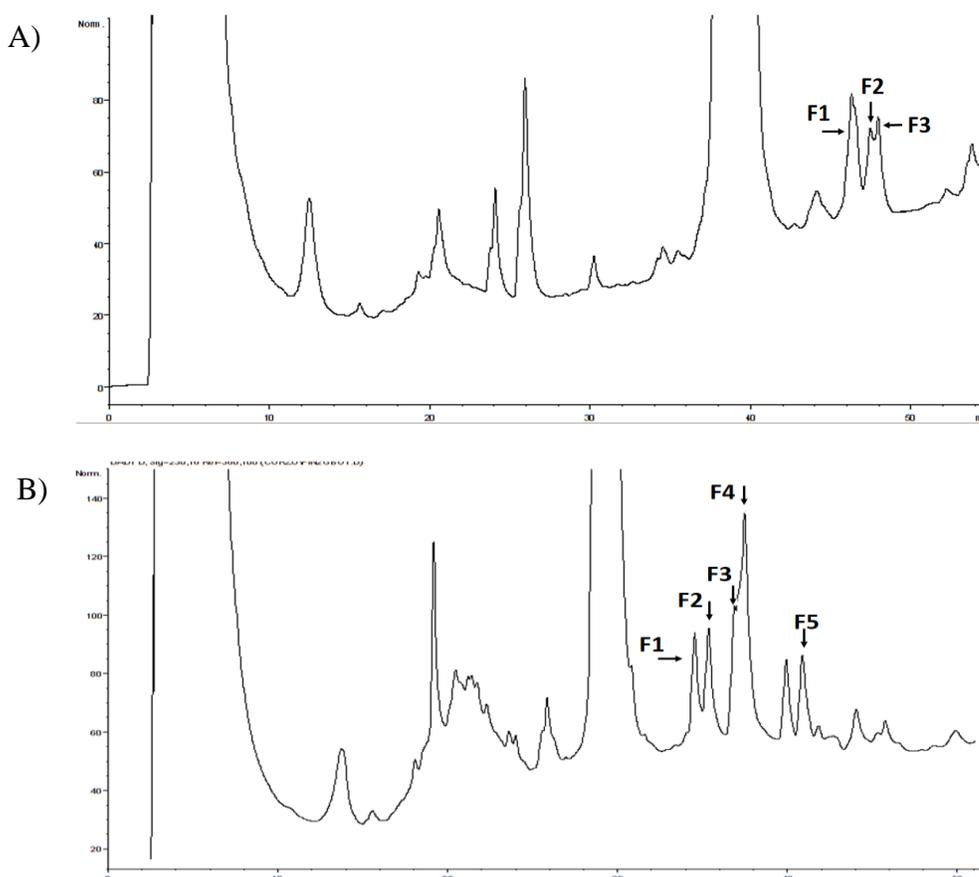
**Fig. 19. Análisis de recuperación de herida según su área.** Cada día se midió el área de las heridas para determinar si existía un favorecimiento de la cicatrización al aplicar el tratamiento con AMP. (A) Herida infectada con *S. aureus* UDP13 y tratada con Pin2[G] (B) Herida infectada con *P. aeruginosa* UDP3 y tratada con Pin2[G] (C) Herida infectada con *P. aeruginosa* UDP3 y tratada con FA1. Se muestra el promedio de mediciones por triplicado con desviación estándar.

En cuanto a la medición del área de las heridas, se observa un comportamiento característico de cada modelo. En el caso de la infección con *S. aureus* UDP13 la herida tratada con Pin2[G] y la que no recibió tratamiento fueron las que disminuyeron su área casi en su totalidad (Fig. 19a), Pin2[G] muestra un efecto similar en la herida en la que se inoculó *P. aeruginosa* UDP3, ya que presenta, junto al control de ceftriaxona, una mayor velocidad de cicatrización que las heridas no tratadas (Fig. 19b). Con estos resultados se infiere de un posible efecto de los péptidos sobre la recuperación del epitelio. Finalmente, el análisis del modelo de infección con *P. aeruginosa* tratado con FA1 revela cómo dicho péptido, al igual que en el recuento bacteriano y en el análisis de recuperación de herida, carece de actividad cicatrizante; mostrando incluso un incremento del área de la herida (Fig. 19c).

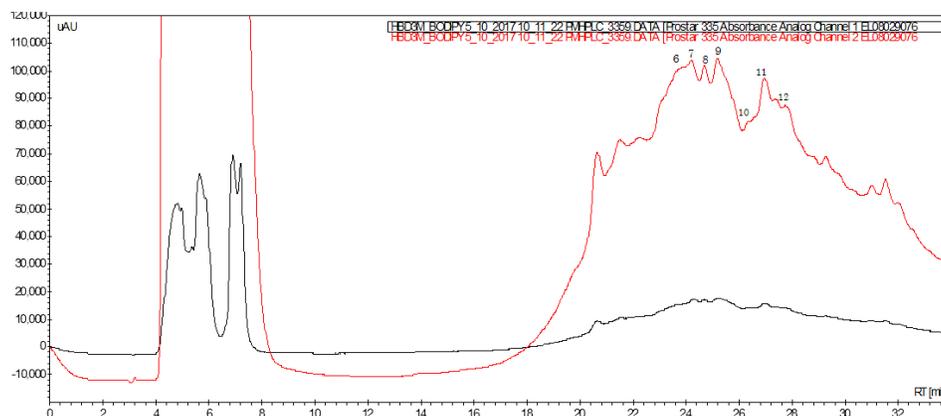
Por último, cabe mencionar cómo, en los tres modelos, la herida no infectada fue la que tardó más en recuperarse, posiblemente por la falta de un agente que estimulara a la liberación de citocinas y factores de crecimiento estimulados por la presencia de un patógeno o por la activación de alguna vía de señalización por parte de los antimicrobianos.

### 8.12 Marcaje de péptidos con fluoróforo

La conjugación de los péptidos con BODIPY se realizó incubando cada péptido en buffer de carbonatos junto con el fluoróforo diluido en DMSO para posteriormente purificarlo por HPLC de fase reversa con una columna Vydac 218TP (C<sub>18</sub>, 4.6 x 250 mm). El gradiente fue de 20-80 % de B en 60 min, donde el solvente B fue de Acetonitrilo + 0.1 % de TFA y con un flujo de 1mL/min. Durante la purificación se recuperaron: tres fracciones que corresponden a Pin2[G]+BODIPY; 5 fracciones de FA1+BODIPY; y 7 de HBD3M+BODIPY (Figuras 20, 21 y 22 respectivamente)

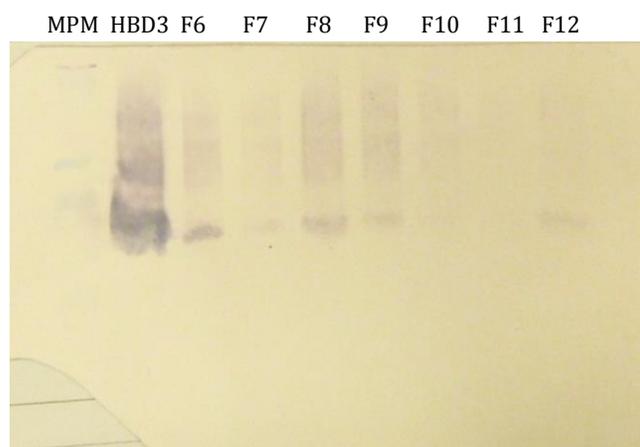


**Fig. 20. Cromatograma de la purificación de los AMP marcados con BODIPY. A) Pin2[G] conjugado con BODIPY, se recolectaron las fracciones F1, F2 y F3. B) FA1 conjugado con BODIPY. Se recolectaron las fracciones F1, F2, F3 F4 y F5. Columna Vydac 218TP. C<sub>18</sub>. 10 $\mu$ . 4.6 x 250 mm. 20-80% de AcNH<sub>3</sub>+0.1% de TFA en 60 min. 1mL/min.**



**Fig. 21. Cromatograma de la purificación de HBD3M unido a HBD3M.** Se recolectaron las fracciones F6, F7, F8, F9, F10, F11 y F12. Columna Vydac 218TP. C<sub>18</sub>. 10 $\mu$ . 4.6 x 250 mm. 20-80% de AcNH<sub>3</sub>+0.1% de TFA en 60 min. 1mL/min.

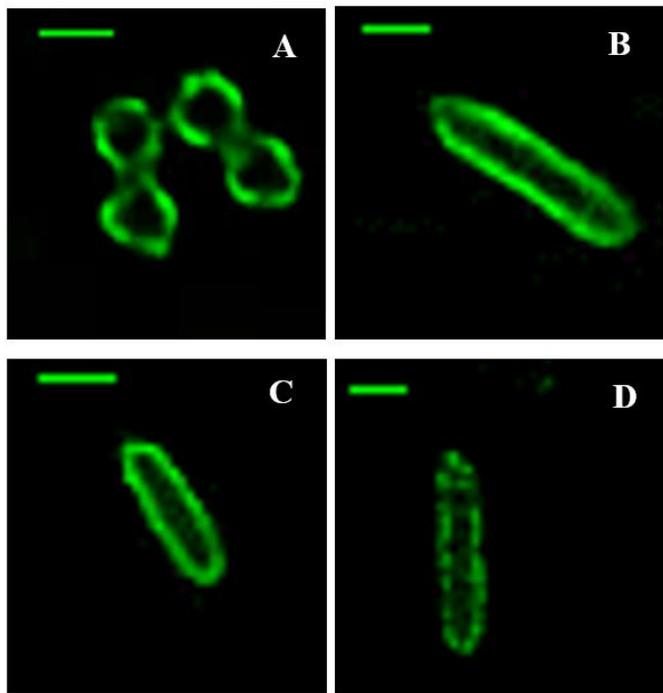
Se calculó una masa teórica para Pin2[G]+BODIPY de 2,846.2 Da (2,572.0 Da de Pin2[G] mas 274.2 Da de BODIPY), para FA1+BODIPY de 3,282.8 Da (3,008.6 de FA1 mas 274.2 de BODIPY), y de 7,535.6 Da para HBD3M+BODIPY (7146.4 de la HBD3M mas 274.2 de BODIPY) se confirmó la masa molecular de los conjugados de Pin2[G] y FA1 por espectrometría de masas (Anexo 2) y el de HBD3M mediante western blot y visualización por transiluminador (Figura 22).



**Fig. 22. Western blot de las fracciones recolectadas durante el marcaje de HBD3M con BODIPY.** Las fracciones recolectadas durante la purificación de HBD3M se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, posteriormente esta se bloqueó con TBST-milk y se agregó un anticuerpo anti-histidina para reconocer a la proteína. Finalmente se revela y se detiene la reacción con agua corriente. (MPM) Marcador de peso molecular, (HBD3) HBD3M control sin marcar, (F6-12) Fracciones 6-12 de HBD3M macaradas con BODIPY.

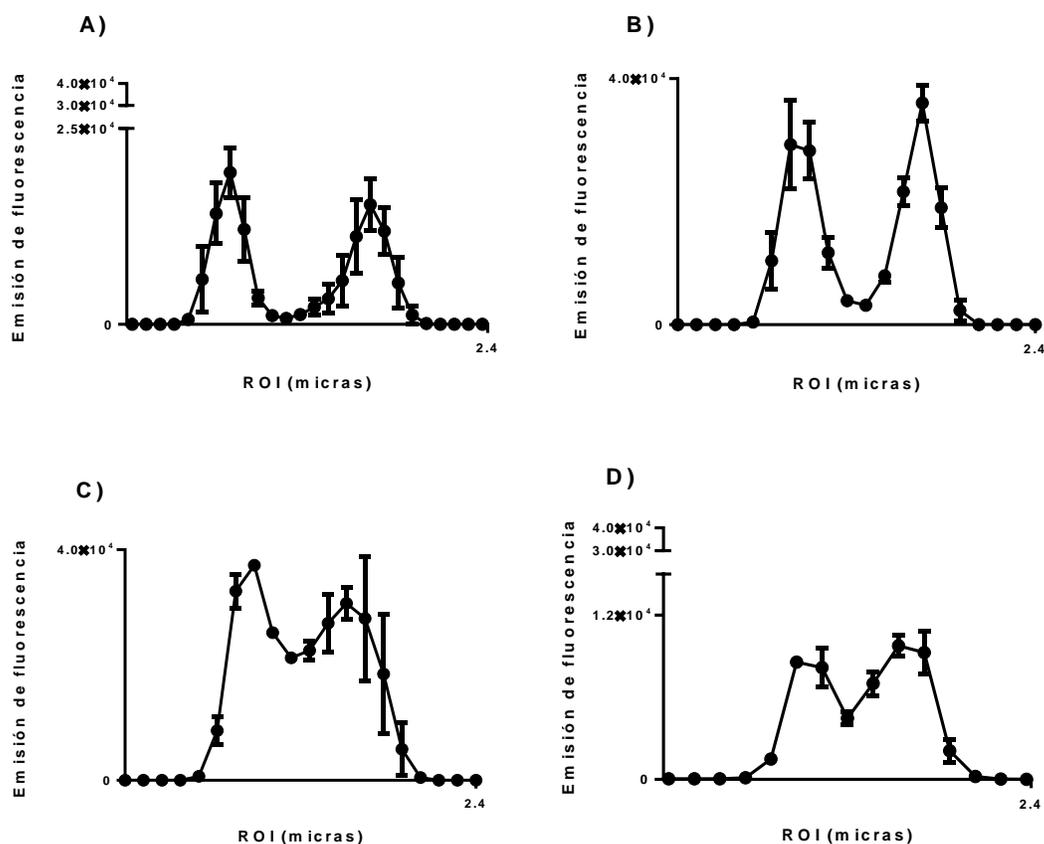
### 8.13 Interacción bacteria péptido

Para determinar la distribución celular de los péptidos en las células bacterianas, se incubaron  $1 \times 10^8$  cel/mL de *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 17853 con los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3M marcados con BODIPY, esto teniendo en cuenta la MIC de cada uno según la bacteria correspondiente, y tratando de emular las condiciones *in vitro* previamente estudiadas. Posteriormente se obtuvieron imágenes de fluorescencia por microscopía confocal en las que se observa la interacción bacteria-péptido. Durante estos experimentos se observa que FA1 no interactúa con *S. aureus* ATCC 29213, lo cual es acorde con lo reportado en los ensayos de concentración mínima inhibitoria, y en cierto modo explica su falta de efecto antimicrobiano contra dicha bacteria. Las imágenes obtenidas fueron procesadas aplicando un algoritmo de deconvolución para corregir los efectos de la sobreexcitación de la fluorescencia, esto con el programa Huygens Essential usando el algoritmo *Quick Maximum Likelihood Estimation* (QMLE), predeterminado en Huygens, con SNR=40 y 40 iteraciones. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 23.



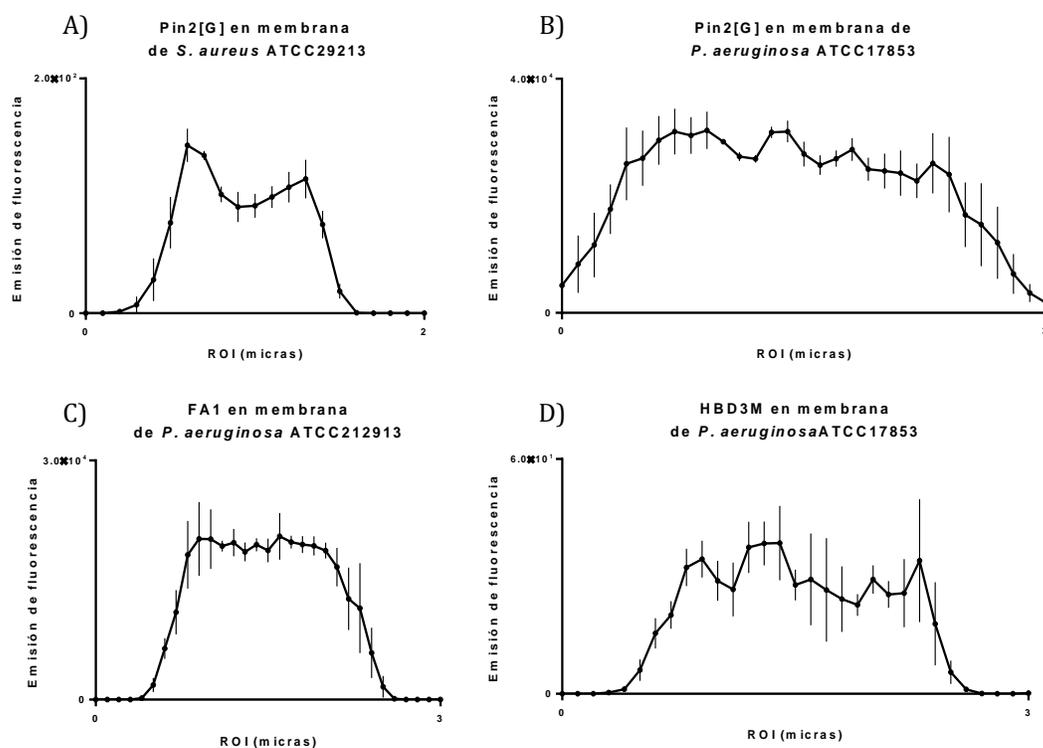
**Fig. 23. Imágenes de fluorescencia de péptido marcado con BODIPY en células bacterianas.** Mediante microscopía de fluorescencia se puede observar la interacción bacteria-péptido según sea el caso **A)** *S. aureus* ATCC 29213 + Pin2[G] **B)** *P. aeruginosa* ATCC 17853 + Pin2[G] **C)** *P. aeruginosa* ATCC 17853 + FA1 **D)** *P. aeruginosa* ATCC 17853 + HBD3M. La escala representa 1µm.

Para conocer la diferencia de concentración de péptido en membrana y en citosol se analizó el perfil de emisión de fluorescencia de las ROI de cada bacteria, las cuales se establecieron como rectas transversales de 2.4 micras. Con esto se cuantificó la emisión de fluorescencia proveniente de cada célula, para así determinar si el péptido se mantiene a nivel de membrana o bien si se internaliza. En caso de que el péptido se mantenga en la membrana se observarían dos picos separados por un valle, mientras que en el caso de internalizarse se observaría que dicho valle emite fluorescencia similar a la de los picos o incluso una distribución similar a una campana de Gauss. Los resultados de este análisis se muestran en las Figura 24.



**Fig. 24. Distribución de péptidos en células bacterianas.** Pin3[G], FA1 y HBD3M marcados con BODIPY se incubaron por 5 min con *S. aureus* ATCC21293 o *P. aeruginosa* ATCC17853. La emisión de fluorescencia se detecta con microscopio confocal y esto determina la localización celular del péptido. (A) Distribución de Pin2[G] en *S. aureus* (membrana); (B) Distribución de Pin2[G] en *P. aeruginosa* (membrana); (C) Distribución de FA1 en *P. aeruginosa* (membrana y citosol); (D) distribución de HBD3M en *P. aeruginosa* (membrana y citosol). Se muestra el promedio de tres mediciones con desviación estándar. Cada experimento fue hecho por duplicado.

A partir de estos datos se puede suponer el mecanismo de acción de cada péptido que en el caso de Pin2[G] la emisión de fluorescencia predominante en la membrana celular habla de un mecanismo de acción por poro toroidal o barril. Mientras que la presencia de FA1 y HBD3M tanto en membrana como en citoplasma refiere a la capacidad de ambos péptidos para interactuar con la periferia celular y de su acción en el espacio intracelular, efecto que se atribuye al modelo de carpeta y blanco citoplasmático (Imagen 2).



**Fig. 25. Distribución de péptidos en la membrana bacteriana.** Se analiza la emisión de fluorescencia a lo largo de la membrana bacteriana, lo que indica la distribución de los péptidos en esta. Pin2[G] en *S. aureus* ATCC21293 (A) y *P. aeruginosa* ATCC17853 (B). FA1 (C) y HBD3M (D) en *P. aeruginosa* ATCC17853. Se muestra el promedio de mediciones por triplicado con desviación estándar.

Se observó que cada péptido cubre de forma característica a las bacterias. Por lo que se decidió establecer una segunda ROI que abarcara a la membrana celular (Figura 25). Con lo que se obtiene que Pin2[G] tiende a aglomerarse en regiones específicas de la membrana de *S. aureus* (Fig. 25a); mientras que hay una distribución uniforme de Pin2[G] y FA1 en la de *P. aeruginosa* (Fig. 25b y c). Mientras que el patrón de fluorescencia que emite HBD3M parece formar polímeros en la membrana de *P. aeruginosa*.

## 9. Discusión

Durante la purificación de los péptidos se observó la diferencia en la hidrofobicidad de ambos compuestos, Pin2[G] se purificó bajo una concentración más alta de acetonitrilo (61%). Esto se hace notar ya que durante el desarrollo de péptidos sintéticos se ha observado que hay cierta relación entre la hidrofobicidad y su actividad antimicrobiana ya que contienen más residuos alifáticos, por lo que su efecto bactericida está relacionado a su hidrofobicidad (Kim *et al.*, 2005). Esto se puede observar durante nuestros ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano en los que, tanto en medio sólido como en medio líquido, se necesita de una concentración menor de Pin2[G] que la de FA1 para generar el efecto antimicrobiano. Por otro lado, también se observa la incapacidad de HBD3-M para inhibir el crecimiento bacteriano en un medio sólido [Tabla 4; Figura 5 y 6]. Esta diferencia entre el efecto antimicrobiano en un medio sólido o líquido se ha reportado previamente y es que se asume que esto sucede por la interacción más homogénea que hay entre el antimicrobiano con las bacterias en un caldo de cultivo. Como se observa, esto sucede en nuestras determinaciones ya que en algunos casos la MIC fue diez veces más alta en agar. Antibióticos como la vancomicina tienen mayor efecto en cepas de *S. aureus* planctónicas que en las que forman biopelícula (Jefferson *et al.*, 2004). Con relación a esto se pueden citar los trabajos anteriores en los que se ha establecido la MIC de los péptidos. Como lo reportado por Arenas *et al.* (2016) en el que Pin2[G] determinó una MIC para *S. aureus* ATCC 21293 de 25 µg/mL, que es mayor que la que se se registro esn este trabajo (7.5 µg/mL), pero nuestros resultados coinciden cuando se trata de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC >50 µg/mL). En el caso de FA1, la MIC para las cepas de *P. aeruginosa* es similar a la reportada por Sánchez *et al.* (2013) para sus aislados clínicos con la misma bacteria. Sin embargo, nuestros resultados difieren en la MIC para *S. aureus* la cual no se logró determinarla. Aunque Sánchez *et al.* (2013) reportaron un valor de 10 mg/mL para dicha bacteria, cabe mencionar que en este trabajo no se llegó a probar una concentración tan alta. Por otro lado, la MIC que se observó para *P. aeruginosa* con HBD3-M fue casi 4 veces más alta que la reportada por Corrales *et al.* (2013), mientras que, a diferencia de su estudio, no se logró inhibir el crecimiento de *S. aureus*.

Para conocer el efecto que tienen los péptidos Pin2[G] y FA1 sobre una membrana eucariota se determinó la concentración hemolítica media (HC<sub>50</sub>) la cual consiste en cuantificar la hemoglobina que se libera por la lisis eritrocitaria que puede ocurrir cuando estas células se ponen en contacto con ellos. Para esto se consideró la MIC de Pin2[G] y FA1, ya que indicaría la capacidad de los péptidos para tratar una infección que involucrara al sistema vascular, ya que, no resultaría conveniente usar una molécula que afecte más a células eucariotas que a bacterias. En el caso de Pin2[G] la HC<sub>50</sub> observada (1.2 µg/mL = 0.8 µM) [Figura 8] es cercanamente similar a la determinada por Rodríguez *et al.* (2014) (1.4 µM). Por otro lado, aunque no se logró obtener la HC<sub>50</sub> de FA1 de manera directa, sí se calculó un valor aproximado (1,243 µg/mL=413 µM), el cual es un valor muy bajo, pero similar al determinado por Sánchez *et al.* (2013) de 824 µM. Con respecto a la HC<sub>50</sub> de HBD3-M no fue determinada dada la alta MIC que presenta, por lo que se espera que su capacidad de hemólisis sería muy baja, de hecho, Corrales *et al.* (2013) trató de determinarla sin tener éxito probando concentraciones de hasta 50 µM. Con los resultados de MIC y hemólisis se aprecia la diferencia que existe entre el efecto de la carga en una molécula y su hidrofobicidad. Ya que, por un lado, FA1 es más catiónica que Pin2[G]; esto es, +11.4 y +10, respectivamente, pero la primera es menos hidrofóbica que la segunda. Esto es de notar, ya que la interacción péptido-membrana se basa principalmente en las fuerzas electrostáticas y la hidrofobicidad de ambos. Teóricamente, ambos péptidos deberían de ser muy afines a las membranas aniónicas de las bacterias, ricas en fosfatidilglicerol, cardiolipina o fosfatidilserina, pero poco propensas a unirse a las membranas neutras de los eritrocitos. Este comportamiento se mantiene en FA1, pero Pin2[G] llega a tener una mayor afinidad por las membranas neutras que por las aniónicas. Probablemente esto se pueda deber a una mayor influencia de la hidrofobicidad de Pin2[G] en su mecanismo de acción. Tomando a consideración la hidrofobicidad, es aquí donde FA1, que es mucho menos hidrofóbico que Pin2[G] pero que tiene una carga mayor (+11.4), muestra su selectividad hacia células bacterianas, ya que la HC<sub>50</sub> está bastante lejos de la MIC, pero a su vez esta selectividad bacteriana también la hace ineficiente ante bacterias Gram- positivas. Esto también podría deberse a la composición lipídica de la membrana; esto es, *P. aeruginosa* es rica en fosfatidiletanolamina y dimanosildiácilglicerol, mientras que *S. aureus* se compone principalmente de cardiolipina y fosfatidilglicerol. Similar a estos resultados se puede mencionar el caso del antimicrobiano

C<sub>12</sub>K-7<sub>a8</sub> que es ocho veces más eficaz contra *P. aeruginosa* que contra *S. aureus* (Roten *et al.*, 2008). Dado esto, y dados diversos reportes sobre la contradictoria relación carga/hidrofobicidad (Sani *et al.*, 2016), no se podría anticipar el comportamiento que tendría un AMP al encontrarse en un medio que contenga tanto bacterias como células eucariotas.

Como complemento a la determinación de la HC<sub>50</sub> se calculó el índice de desnaturalización de hemoglobina (ID%) el cual da un referente del daño que sufren las proteínas al estar en un medio con una alta concentración de péptidos. Dicho índice, y su relación con la HC<sub>50</sub> indican la capacidad irritante de un compuesto sobre superficies mucosas, al grado de ser considerado una alternativa al estudio de irritación ocular (Mehling *et al.*, 2007). La relación HC<sub>50</sub>/ID% colocan a Pin2[G] como un agente sumamente irritante, lo que sumado a su sensibilidad hacia enzimas endoproteolíticas (Arenas *et al.*, 2016) limita su posible aplicación terapéutica en infecciones sistémicas o de mucosas. Por otro lado, la condición de FA1 como un agente moderadamente irritante y su sensibilidad a enzimas proteolíticas, tanto digestivas como vasculares [Tabla 5] (Arenas *et al.*, 2016) lo convierte en un agente viable en infecciones de mucosas, pero al igual que Pin2[G] poco recomendable para tratamientos sistémicos.

Se puede atribuir la diferencia del efecto de los AMPs en un medio líquido al medio sólido en que se ha demostrado que los antimicrobianos alcanzan un valor de transporte más alto cuando se trata de bacterias planctónicas, lo cual se vería representado en el medio líquido, que cuando están adheridas a una superficie con la capacidad de formar una biopelícula, ya que esta disminuye el coeficiente de difusión del péptido, haciendo que cantidades subinhibitorias del péptido alcancen a la bacteria o que también puede que la concentración inhibitoria tarde más en lograrse, con lo que la bacteria tendría el tiempo necesario para montar una defensa ante el compuesto o bien, puede simplemente nunca alcanzar su blanco perdiéndose en un laberinto de exopolisacáridos y canales de agua. De hecho, se ha demostrado cómo la exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos induce a la expresión de proteínas homólogas (Zheng *et al.*, 2002; Utaida *et al.*, 2003; Jeffeson *et al.*, 2005). De hecho, las características del biofilm podría favorecer un lento crecimiento bacteriano, lo que trae consigo resistencia a antibióticos (Zheng *et al.*, 2003).

En la búsqueda de una vía de administración ideal se probó el efecto irritante agudo en piel que podrían tener Pin2[G] y FA1, esto según el método propuesto por la *Health Effects Test Guidelines*, en la que se pone en contacto una concentración determinada de péptido sobre la piel de un animal, en este caso un conejo albino, durante ciertos intervalos de tiempo, esto con el fin de observar si después de estar en contacto hay aparición de eritema o edema, ya sea de manera instantánea o como efecto colateral. En esta prueba ninguno de los péptidos causó algún tipo de daño a la dermis, lo que apoya la idea de que puedan ser usados contra infecciones tópicas no profundas. Como complemento se realizaron ensayos de toxicidad dérmica, en los que se expone la piel del conejo con diferentes concentraciones de los péptidos durante 24 horas. En este ensayo tampoco se observa algún tipo de daño, irritación, edema o eritema. Teniendo en cuenta los ensayos previos en los que se observó cómo un tratamiento sistémico o a nivel de mucosas no es posible, dado el daño que los péptidos pueden causar, y los estudios sobre cómo no hay afectación en piel se decidió probarlos en un modelo de infección superficial. Los modelos de infección en piel alcanzan diferentes niveles, superficial, profundo y visceral. Diversos estudios se han hecho en estos tres tipos de modelo se han realizado y, a su vez, estos se han probado en un amplio número de modelos bacterianos y animales (Dai *et al.*, 2011). Considerando esto se decidió probar la toxicidad de Pin2[G] y FA1 en una herida superficial, ya que en estas capas de la dermis la irrigación sanguínea es mínima y las características del epitelio podrían brindar resistencia ante el tratamiento. Así mismo, se monitoreó el número de bacterias que podían empezar a colonizar las heridas que, al no existir una infección previa, podría presuponer que pertenecen a la microbiota de la piel. Al final del tratamiento no se observó daño en el epitelio, de hecho, tras dos semanas de recuperación las heridas sanaron completamente al punto de que hubo crecimiento de pelo en ellas [Figura 11]. Por otro lado, en cuanto al monitoreo bacteriano en las heridas en el conejo, como era de esperarse se mantuvo cierto número de bacterias que podrían ser parte de la propia microbiota de su piel, ya que estos números en ningún momento llegaron a ser lo suficientemente altos como para desarrollar una patología. Sin embargo, resulta interesante denotar cómo la herida tratada con FA1 fue la que presentó un incremento en el número de bacterias presentes en la herida. Como estudio adicional, de corroborarse la influencia positiva que tiene FA1 sobre el crecimiento bacteriano en modelos *in vivo* se podría identificar el tipo de microorganismos que se ven beneficiados por esto.

Posteriormente, se inició el tratamiento en un modelo de infección en heridas superficiales en piel de conejo. En el que se comparó la eficacia de los péptidos contra la del antibiótico betalactámico ceftriaxona, que es usado en el tratamiento de infecciones superficiales (Stevens *et al.*, 2014), así como observar el desarrollo de la infección sin que exista un tratamiento para contrarrestarla. En el caso de la infección con *S. aureus* UDP13 o *P. aeruginosa* UDP3 al final del protocolo cada herida fue capaz de recuperarse, pero en la que se aplicó Pin2[G] el número de UFC disminuyó drásticamente desde el primer día de tratamiento. Esto refleja su eficacia y la falta de un efecto tóxico a las células de la piel. Una vez finalizado el tratamiento se observó cómo después de los 14 días siguientes las heridas se recuperaron totalmente. Esto suma Pin2[G] al grupo de AMP que puede ser utilizados para tratar infecciones superficiales [Figura 13 y 14] (Gordon *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2014). Cabe mencionar la eliminación de la infección a las 96h de haberse establecido, esto puede deberse a que *S. aureus* y *P. aeruginosa* son patógenos oportunistas, por lo que necesitan de un modelo inmunocomprometido para establecer una colonización idónea. Dicho modelo no puede llevarse a cabo por la sensibilidad de los conejos a sufrir diversas infecciones cuando se les inmunosuprime, infecciones que podrían intervenir en los resultados del experimento. Otra posible explicación es el estímulo de la respuesta inmune por parte del AMP, fenómeno que ya se ha registrado previamente (Hilche *et al.*, 2013).

Por otro lado, el tratamiento de la infección con *P. aeruginosa* UDP3 con FA1 resultó contraproducente [Figura 15], ya que no hubo una disminución en el número de bacterias e incluso este se mantuvo ligeramente más elevado que el de la herida sin tratamiento, además de que contrario al modelo anterior en este no se observa un decremento en el número de UFC tras 96h de tratamiento, por lo que en este no se puede sospechar de una intervención del sistema inmune del conejo. Esto podría estar relacionado al fenómeno observado previamente durante el tratamiento de la herida sin infección. Este fenómeno puede ser explicado por la falla en la estructura peptídica cuando interacciona con proteínas propias del huésped, la falta de interacción entre bacteria y péptido, o por la activación de algún sistema de señalización que promueva el crecimiento bacteriano. Tocando el primer punto se puede mencionar el estudio de estabilidad peptídica realizado por Arenas *et al.* (2016) en el que se observa la imposibilidad de purificar íntegro a FA1 tras ser incubado con plasma sanguíneo o sobrenadante de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, por lo que es posible que el péptido se una

fuertemente a algún componente presente en el plasma, o bien sea desnaturalizado y por lo tanto su efecto se pierda. Diversos estudios han analizado el efecto que tiene el biofilm en favorecer la resistencia bacteriana ante agentes antimicrobianos. En condiciones planctónicas las bacterias son expuestas constantemente a la merma de su población por agentes propios del ambiente, p.ej. fagos, amebas, desinfectantes industriales o elementos naturales con propiedades antimicrobianas. Sin embargo, el establecimiento de una comunidad bacteriana o polimicrobiana interconectada entre sí permite el desarrollo de colonias bacterianas que difícilmente son afectadas por su medio, ya que están protegidas por los microorganismos más superficiales, por otras moléculas contenidas en el biofilm (Costerton *et al.*, 1999). En este caso en un biofilm bacteriano existiría una nula interacción péptido-bacteria, ya que, previamente, se ha registrado cómo un antimicrobiano puede atravesar en su totalidad este medio y en ningún momento interactuar con la bacteria (Jefferson *et al.*, 2005), de hecho, se ha comprobado que la producción de este permite que la bacteria sea resistente incluso contra detergentes como el dodecil sulfato de sodio (Costerton, *et al.*, 1999). Otro factor de resistencia brindado por ser parte del biofilm es que los microorganismos entran una fase de lento crecimiento, lo que les permite sobrevivir a un tratamiento antimicrobiano que tenga como blanco afectar a su metabolismo, disminuyendo así el impacto que estos puedan tener (Brown *et al.*, 1998; Rangarajan *et al.*, 2013) o bien, puede darse el tiempo suficiente para que la bacteria desarrolle resistencia al antibiótico (Dunne *et al.*, 1993). Como punto a favor de esta teoría se puede mencionar que, durante los ensayos de dilución seriada, se parte de una población bacteriana planctónica, por lo que no se da oportunidad de que *P. aeruginosa* genere alginato y, por lo tanto, un biofilm. Mientras que en la infección este ya estaría formado al momento de iniciar el tratamiento. Sin embargo, de ser este el mecanismo por el cual FA1 no es efectivo en el tratamiento de la infección *in vivo*, queda la duda de por qué Pin2[G] sí logra sobrepasar el biofilm e interaccionar con *P. aeruginosa* y por tanto mermar su crecimiento. Para entender esto se podrían hacer ensayos de difusión usando fluorescencia para conocer las características de desplazamiento de los péptidos cuando se encuentran en dichas condiciones (Dunne *et al.*, 1993; Jefferson *et al.*, 2004; Oubekka *et al.*, 2012).

Para tocar el punto correspondiente a la activación de un sistema de señalización se puede mencionar el artículo de Limoli *et al.* (2014) en el que se demuestra la tendencia a la mutagénesis en cepas de *P. aeruginosa* ante un tratamiento con el péptido antimicrobiano

LL-37. En dicho artículo se menciona cómo la estructura de LL-37 interactúa con el ADN bacteriano y desencadena la activación de vías de señalización que participan en la síntesis de alginato. Esto ocurre porque, en la biopelícula formada previo al tratamiento, el péptido ve disminuida su difusión y no alcanza la concentración necesaria para anular el crecimiento bacteriano, ante tal escenario se lleva a cabo un fenómeno denominado “hormesis” en el que un microorganismo aprovecha dosis subinhibitorias de algún antimicrobiano para estimular la síntesis de proteínas que favorecerán su supervivencia (Rothstein *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2006; Yim *et al.*, 2007; Sengupta *et al.*, 2013). Como es el caso de la polimixina B, que estimula la formación de cápsula celular en *Klebsiella pneumoniae*, limitando así la interacción entre el AMP y la bacteria (Llobet *et al.*, 2008). Es así que se puede proponer el papel de FA1 como un péptido partícipe en este fenómeno, lo cual explicaría la falta de relación entre resultados *in vitro* e *in vivo*, así como responder a la duda generada en la segunda propuesta respecto a la selectividad del biofilm por FA1, pero no por Pin2[G]. Probablemente un incremento en la dosis de tratamiento, que aumente la probabilidad de interacción péptido-bacteria, sea suficiente para romper la hormesis y permita inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en el modelo *in vivo*.

En cuanto a los análisis de cicatrización encontramos cierta relación entre el tratamiento con Pin2[G] y un estímulo en la cicatrización (Fig. 19a y b) aunque en este estudio solo nos limitamos al análisis macroscópico de la cicatrización. Estudios previos han reportado que los AMP pueden ser efectores de la respuesta cicatrizante, al estimular diversas vías de señalización que participan en la inflamación y diferenciación celular, debemos de analizar si tal efecto es observable. Previamente se ha comprobado el papel de los AMP en la recuperación de heridas en la piel mediante la producción de citocinas, migración y proliferación celular y en algunos casos se les atribuyen propiedades angiogénicas (Mangoni *et al.*, 2016). Tal es el caso de los péptidos LL-37, CaTx-II, HB-107, entre otros, que participan en la neurovascularización, estimulación de la síntesis de colágeno y la inducción de la filtración de leucocitos, respectivamente (Koczulla *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Samy *et al.*, 2014). El estímulo a la cicatrización se puede deber al propio efecto antimicrobiano, ya que un factor que complica la reparación de la piel es el desarrollo de la enfermedad que puede limitarse a ser una contaminación, evolucionar a una infección o convertirse en un fenómeno invasivo en el que se vean comprometidos tejidos profundos (Guo *et al.*, 2010) es

probable que en el modelo de *P. aeruginosa* UDP3 tratada con FA1 se haya llevado a cabo este último. Con la inhibición del crecimiento bacteriano se disminuyen procesos intrínsecos asociados a la respuesta inmune del hospedero, ya sea la activación de la inflamación y la secreción de metaloproteasas que degradan a la matriz extracelular y desfavorecen la síntesis de factores de crecimiento (Guo *et al.*, 2010) por lo que, al detener la infección, previene el desarrollo de complicaciones asociadas a la inflamación crónica. Por otro lado, y existe la posibilidad de que Pin2[G] participe como efector de la respuesta inmune y así estimule células fagocíticas, como los macrófagos, a liberar citocinas que promuevan a la inflamación y a su vez la limpieza de residuos de células apoptóticas para prevenir la prolongación del efecto inflamatorio o también la estimulación de queratinocitos, fibroblastos y la angiogénesis y con esto contribuir a la regeneración de la piel (Meszaros *et al.*, 2000; Mosser *et al.*, 2008).

Finalmente, para hablar del estudio de visualización se debe contextualizar lo que ha sido la principal interrogante durante el desarrollo del AMP, aquella enfocada en cómo llevan a cabo su mecanismo de acción. Un primer paso en el entendimiento de esto es localizar la región celular en la que actúan. Trabajo para el que las diferentes técnicas de microcopía han sido empleadas. En este campo se ha llegado al punto de poder evaluar, por microscopía de fuerza atómica, electrónica o confocal, el efecto de diversos AMP en células aisladas (Choi *et al.*, 2017). Como parte de análisis de la distribución de Pin2[G] y FA1 en bacterias se les marcó con el fluoróforo BODIPY, el cual reacciona con la amina libre de las lisinas y que ha sido ampliamente usado para el estudio de interacción péptido-bacteria (Benincasa *et al.*, 2009). De esta unión se obtuvieron dos productos de Pin2[G]+BODIPY y tres de FA1+BODIPY. El paso siguiente fue observar cómo los péptidos marcados interactúan con *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 17853. Tras el registro, tratamiento de imágenes y posterior obtención del perfil de emisión de fluorescencia [Figura 24] se puede sugerir sobre el espectro de acción de FA1 y Pin2[G] a nivel de membrana, al menos, cuando se les trata con la concentración correspondiente a la mínima inhibitoria. Cabe mencionar la nula interacción entre FA1 y *S. aureus* ATCC 29213, lo cual explica los resultados obtenidos *in vitro* en los FA1 no inhibió el crecimiento bacteriano. En cuanto a HBD3M se registró una preferencia por la membrana celular pero también una internalización al citoplasma, fenómeno que se ha registrado previamente. Junto a esto se estableció una segunda ROI que nos brindaría

información sobre la distribución que tienen estos tres péptidos en la membrana celular; por un lado, Pin2[G] y FA1 presentan una distribución uniforme en la membrana de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mientras que en el análisis de la HBD3M se detectaron varias regiones en las que se concentraba la emisión de fluorescencia, lo que nos puede hablar de la posible formación de oligómeros o conglomerados de  $\beta$ -defensina en la membrana celular [Figura 25]. Experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) y dinámica molecular de Sudheendra (2015) sugieren un mecanismo de internalización en el que el C-terminal tiene una función primordial ya que las cargas positivas con las que cuenta son las más influyentes al interactuar con el LPS bacteriano en el que la HBD3 se internaliza y adquiere una estructura de  $\alpha$ -helice con el N-terminal funcionando como brazo propulsor que desestabiliza a la membrana.

Con la información recabada se podrían proponer mejoras a las características antimicrobianas de los péptidos, ya sea cambiando la dosificación de los péptidos o haciendo tratamientos en combinación con antibióticos. Además, se podrían sugerir estudios adicionales enfocados a estudiar la respuesta de las bacterias a la perturbación en la membrana, por ejemplo, estudio de síntesis de proteínas de respuesta a estrés (Limoli *et al.*, 2014). O bien, analizar si bajo un efecto de gradiente de concentración de péptido o análisis a través del tiempo el mecanismo de acción se modifica (Rangarajan *et al.*, 2013). Incluso resultaría viable analizar el efecto de un AMP en diferentes momentos del crecimiento bacteriano, ya que nuestras cepas fueron tratadas durante la fase estacionaria, esto sale a mención por la predilección que tienen ciertos AMP por células en fase exponencial, atacando el septo de la división celular, pero que tener decrecer su efectividad en células en fase estacionaria (Chileveru *et al.*, 2015; Kurushima *et al.*, 2015).

Con lo mencionado se puede decir que el análisis de las características antimicrobianas de los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3M debe de ser complementado con estudios enfocados en la interacción bacteria-péptido. Así como el papel que tendrían durante diferentes tipos de infección, en los que la relación entre células bacterianas y eucariotas genere una competencia en la afinidad del péptido por alguna de ellas. De igual forma, la tendencia de los AMP a participar en la señalización de la respuesta inmune abre la pregunta del papel que Pin2[G], FA1 y principalmente HBD3M podrían tener sobre ella. La continuidad de esta investigación, así como su complementación con la información de una posible sinergia entre

antibióticos y péptidos, tendrá un papel importante en el desarrollo de nuevas terapias contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos.

Hasta este punto se ha discutido del potencial terapéutico de Pin2[G], FA1 y se mantiene la idea de hayar una vía de administración que permita un tratamiento que incluya a la HBD3M, pero no se ha discutido sobre la meta final de este proyecto, que es considerar a estos péptidos como productos viables en el tratamiento de pacientes con infección cutáneas y subcutáneas como podría ser el pie diabético. Y es que, la necesidad de desarrollar nuevas terapias se enfoca en dos frentes: el hallazgo de nuevos agentes antimicrobianos, considerando que, en su mayoría, se aíslan antibióticos principalmente de microorganismos *Actinomicetos* que habitan en el suelo, es por esto que se ha propuesto estudiar antimicrobianos aislados del ambiente marino, péptidos antimicrobianos de animales, plantas o derivados de bacteriocinas, o el desarrollo de homólogos membranales de bacterias y hongos; por otro lado, se estudia también la aplicación de antimicrobianos que funcionen a nivel intracelular. Pero, a diferencia de los antibióticos convencionales, estas nuevas moléculas tendrían especificidad por blancos celulares específicos del patógeno, disminuyendo así el daño al hospedero (Aminov, 2010; López-Meza *et al.*, 2011). Con esto planteado se puede notar cómo Pin2[G] y FA1 cumplen como antimicrobianos desarrollados considerando los dos enfoques mencionados, son AMP novedosos derivados de péptidos encontrados en animales, en este caso veneno de alacranes, y presentan especificidad por blancos microbianos membranales y posiblemente intracelulares, esto último en el caso de FA1 y HBD3M. Lo que amplía el enfoque que se pueda dar en la terapia basada en estos antimicrobianos.

Se tiene registro de AMPs con probado efecto *in vitro*: epidermina, cinamicina, microcina C7-C51, MccJ25, MccB17, mersacidina, nisina (López-Meza *et al.*, 2011; Cotter *et al.*, 2013), los cuales podrían tener aplicaciones biomédicas. Tal es el caso de la mersacidina y la nisina, que resultan efectivos en el tratamiento en modelos *in vivo* de infecciones respiratorias causadas por *S. aureus* MRSA y *Streptococcus pneumonia* (Kruszewska 2004, Kwaadsteniet, 2009) o el péptido B-Ny266 que contrarresta infecciones peritoneales por *S. aureus* (Mota *et al.*, 2005). Sin embargo, el éxito de estudios *in vitro* e *in vivo*, e incluso ensayos clínicos, pierde importancia cuando el AMP no presenta ventajas respecto al tratamiento normal, como sucedió con el pexiganano, un derivado sintético de la magainina, que llegó incluso a tener resultados exitosos en pruebas de fase III, contrarrestando

infecciones tópicas en pacientes con pie diabético, pero que no fue aprobado por la FDA ya que no era más efectivo que el tratamiento convencional para la misma enfermedad. Mismo fallo en el que caen AMPs como el isegano, omigano, y XMP.629 (Gordon *et al.*, 2005). Como solución a este problema se plantea establecer dosificaciones de AMP mezclados con antibióticos contra infecciones por patógenos MMR. Se puede mencionar lo reportado por Arnusch *et al.* (2012) que caracterizó el efecto del acoplamiento de vancomicina a variantes derivadas de la magainina 2 con modelos membranales, crecimiento bacteriano y efectos en células eucariotas, encontrando un incremento en la actividad antimicrobiana contra *Enterococcus spp.* resistentes a vancomicina. Al disminuir la concentración de antibiótico y el antimicrobiano se inhibe el crecimiento bacteriano y se previenen los efectos secundarios que el tratamiento pueda tener en el paciente, tal es la propuesta de Chen *et al.* (2015) que acopló variantes del AMP ubicidina a cloranfenicol, medicamento conocido por la toxicidad que presenta en tratamientos prolongados, este acoplamiento mejoró la actividad contra infecciones con *E. coli* y *S. aureus* y además probó ser menos perjudicial para las células eucariotas que la administración de cloranfenicol solo. Por el contrario, estudios como el de Ghaffar *et al.* (2015) que acopló indolicina a levofloxacina, prueban que la mezcla antibiótica/antimicrobiano no siempre genera un efecto sinérgico y que incluso puede disminuir su efectividad. Con esto en consideración surge la propuesta experimental de analizar el efecto sinérgico que podrían tener Pin2[G], FA1 y HBD3M en sistemas *in vitro* y en modelos animales. Analizando los cambios que se presenten en cuando a duración de la infección y efectos en el hospedero.

Finalmente, se puede hablar de un efecto positivo en el tratamiento de infecciones subcutáneas con el péptido Pin2[G], considerando como positivo la inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* sin comprometer la integridad del modelo animal. Por lo que esta molécula puede ser viable para su aplicación en infecciones subcutáneas. Sin descartar un posible tratamiento con FA1, encontrando una dosificación idónea, y la administración de HBD3M en mezclas con antibióticos. Una última mención es la posibilidad de que el tratamiento basado en AMP sintéticos genere, eventualmente, bacterias resistentes a los AMP producidos por el cuerpo. Por lo que, pese a que existen pocos reportes de esto, se debe de tener especial cuidado al establecer una terapia (Nuri *et al.*, 2015).

## 10. Conclusiones

- Los péptidos Pin2[G], FA1 y HBD3M pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* y Pin2[G] también el de *S. aureus*.
- Pin2[G] y FA1 son péptidos bactericidas.
- Pin2[G] y FA1 no pueden ser aplicados vía sistémica, en mucosas o en la órbita ocular dada su capacidad irritante.
- La aplicación de Pin2[G] en modelos de infección subcutánea contrarresta el crecimiento bacteriano sin dañar al epitelio. Mientras que, FA1 no actúa como antimicrobiano en el modelo *in vivo*.
- Pin2[G] podría promover mecanismos de cicatrización.
- El mecanismo de acción bactericida de Pin2[G] y FA1 es a nivel de membrana. Sin embargo, parecen operar de manera particular en la membrana de la bacteria en cuestión.
- El daño a membrana de HBD3M podría deberse a la formación de conglomerados.
- El tratamiento de infecciones tópicas basado en AMP, como Pin2[G], puede favorecerse si se usa un excipiente adecuado; el de FA1 si se establece una dosificación efectiva y el de la HBD3M si se aplica en combinación con antibióticos.
- Es de suma importancia que se continúe con la caracterización de los péptidos a nivel sistémico, así como no descartar la posibilidad de que aparezcan cepas resistentes a los mismos.

## **11. Perspectivas**

- Analizar el efecto histológico del tratamiento con AMP
- Determinar la existencia de efectos sobre el sistema inmune por parte de los péptidos.
- Optimizar el tratamiento y la vía de administración.
- Establecer tratamientos que involucren combinación con antibióticos que generen un efecto sinérgico.
- Probar el efecto de los AMP en nuevos modelos de infección.

## Referencias

1. Academies, N. R. C. of the N. (2011). *Guide for the care and use of Laboratory animals*. (T. N. A. Press, Ed.) (8th ed.). Washington, D.C.
2. Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in IMMUNOLOGY*, 1(134), 1–7.
3. Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R., & Corzo, G. (2016). Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics. <http://doi.org/10.3390/molecules21020225>
4. Arnusch C.J., Pieters R.J., Breukink E. (2012). Enhanced membrane pore formation through high-affinity targeted antimicrobial peptides. *PLoS ONE*. 7:701 doi: 10.1371/journal.pone.0039768.
5. Avci, P., Magesh, S., Asheesh, G., Melo, W. D., Huang, Y.-Y., Rui, Y., . . . Kumar, R. (2013). Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.*, 8(3), 331–335.
6. Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6, 1543–1575.
7. Benincasa, M., Pacor, S., Gennaro, R., & Scocchi, Ma. (2009). Rapid and Reliable Detection of Antimicrobial Peptide Penetration into Gram-Negative Bacteria Based on Fluorescence Quenching. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8), 3501–3504.
8. Bergström, F., Mikhalyov, I., Hägglöf, P., Wortmann, R., Ny, T., & Johansson, L. (2002). Dimers of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) with Light Spectroscopic Applications in Chemistry and Biology. *J. AM. CHEM. SOC.*, 124(2), 196–204.
9. Bocchini, G., Bobone, S., & Stella, L. (2011). Fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations in studies on the mechanism of membrane destabilization by antimicrobial peptides, 2281–2301. <http://doi.org/10.1007/s00018-011-0719-1>
10. Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., Scott, M. G., & Hancock, R. (2005). Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5), 1727–1732.
11. Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V., & Gallo, R. L. G. (2005). Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides.
12. Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2005). Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 9–13. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x>
13. Brogden K. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 3, 238-250
14. Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 24–30.
15. Brown, M. R., Allison, D. G., & Gilbert, P. (1998). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chem*, 22(6), 777–780.
16. Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, et al. (2012) Antibacterial Activity and Mechanism of a Scorpion Venom Peptide Derivative *In Vitro* and *In Vivo*. *PLOS ONE* 7(7): e40135. doi: 10.1371/journal.pone.0040135

17. Carmona, G., Rodríguez, A., Juárez, D. Corzo, G., Villegas, E. 2013. Improved Protease Stability of the Antimicrobial Peptide Pin2 Substituted with D-Amino Acids *Protein J*, 32, 456-466.
18. Chen H., Liu C., Chen D., Madrid K., Peng S., Dong X., Zhang M., Gu Y. (2015). Bacteria-targeting conjugates based on antimicrobial peptide for bacteria diagnosis and therapy. *Mol. Pharm*:2505–2516. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00053.
19. Chileveru, H.R. Lim, S.A., Chairatana P., Wommack, A.J., Chiang, I.L. and Nolan, E.M. (2015) Visualizing attack of *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide human defensin 5. *Biochemistry* 54, 1767–1777 23.
20. Choi, H., Rangarajan, N., & Weisshaar, J. C. (2017). HHS Public Access, 24(2), 111–122. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2015.11.004.Lights>
21. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
22. Conejo García, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez Jiménez, F. J., Klüver, E., Adermann, K., ... Forssmann, W. (2001). Human b-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB Journal*, 15, 1819–1821.
23. Corrales-García, L., Ortiz, E., Castañeda-delgado, J., Rivas-Santiago, B., & Corzo, G. (2013). Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human b -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 89(1), 33–43. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>
24. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*, 45, 35–45.
25. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Microbes, Immunity, and Disease*, 284, 1318–1322.
26. Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 95–105.
27. Dai, T., Kharkwal, G. B., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., Bil de Arce, V., & Hamblin, M. R. (2011). Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*, 2(4), 296–315.
28. Davies, J., Spiegelman, G. B., & Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 445–453.
29. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, et al. (2008) Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 16: 23–29.
30. DB-ALM Protocol n ° 37 (2010): Red Blood Cell (RBC) Test System Résumé, 1–12.
31. De Kwaadsteniet, M.; Doeschate, K. & Dicks, L. (2009). Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 48, No. 1, 65-70, 0266-8254.
32. Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeenan, T., Smith, E., & Rhoads, D. (2008). Polymicrobial Nature of Chronic Diabetic Foot Ulcer Biofilm Infections Determined Using Bacterial Tag Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One*, 3(10), e3326.

33. Dunne, W. M., Mason, E., & Kaplan, S. L. (1993). Diffusion of Rifampin and Vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* Biofilm a, 37(12), 2522–2526.
34. Espinosa Arredondo, A., & Espinosa López, F. R. (2012). Diagnóstico y tratamiento médico-quirúrgico del pie diabético infectado. En *Terapéutica en Enfermedades Infecciosas* (6th ed., pp. 981–1004). México.
35. Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, Belcher AM. 2010. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol.* 5:280–285. [PubMed: 20228787]
36. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides : form follows function, 11(January). <http://doi.org/10.1038/nrd3591>
37. Fletcher J. Best practice: choosing an appropriate antibacterial dressing. *Nurs Times* 2006; 102:46–9.
38. French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections the potential role of daptomycin, (October), 1107–1117. <http://doi.org/10.1093/jac/dk1393>
39. Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, et al. (2005). Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res.* 579:172-81.
40. Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses, (September), 159–173. <http://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
41. Ghaffar K.A., Hussein W.M., Khalil Z.G., Capon R.J., Skwarczynski M., Toth I. (2015). Levofloxacin and indolicidin for combination antimicrobial therapy. *Curr. Drug Deliv*: 12:108–114. doi: 10.2174/1567201811666140910094050.
42. Gordon, R. J., & Loxy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Suppl 5), S350–S359.
43. Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., & McDermott, A. M. (2005). A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Current Eye Research*, 30(7), 505–515. <http://doi.org/10.1080/02713680590968637>
44. Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res*, 89(3), 219–229.
45. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. (2002) Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 75:51-7.
46. Hata, T. R., & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial Peptides, Skin Infections and atopic Dermatitis. *Semin Cutan Med Surg.*, 27(2), 144–150.
47. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2500 Acute Dermal Irritation
48. Hilchie, A. L., Wuerth, K., & Hancock, R. E. W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Publishing Group*, 9(12), 761–768. <http://doi.org/10.1038/nchembio.1393>
49. Human Pathogens and Toxins Act. S.C. 2009, c. 24. Government of Canada, Second Session, Fortieth Parliament, 57-58 Elizabeth II, 2009, (2009).
50. Jefferson, K. K., Goldman, D. A., & Pier, G. (2005). Use of confocal microscopy To analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2467–2473.

51. Jiménez Sánchez, K. E. (2015). Evaluación de la combinación de péptidos antimicrobianos con antibióticos comerciales para la inhibición de bacterias presentes en infección de pie diabético. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
52. Jones, T., Yeaman, M. R., Sakoulas, G., Yang, S., Proctor, R. A., Sahl, H., ... Bayer, A. S. (2016). Failures in Clinical Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection with Daptomycin Are Associated with Alterations in Surface Charge, Membrane Phospholipid Asymmetry, and Drug Binding □, 52(1), 269–278. <http://doi.org/10.1128/AAC.00719-07>
53. Jung Kim, D., Lee, Y. W., Park, M. K., Shin, J. R., Lim, K. J., Cho, J. H., & Kim, S. C. (2014). Efficacy of the designer antimicrobial peptide SHAP1 in wound healing and wound infection. *Amino Acids*, 46(10), 2333–2343. <http://doi.org/10.1007/s00726-014-1780-5>
54. Kilpadi DV, Feeley TD, Kiel JW. (2007). Therapy normalizes vascular response of injured tissue in full-thickness wounds in rabbits. *Ann Plast Surg*, 58:555-60
55. Kim, S., Kim, S. S., & Jae Lee, B. (2005). Correlation between the activities of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. *Peptides*, 26, 2050–2056.
56. Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., ... Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1665–1672. <http://doi.org/10.1172/JCI17545>
57. Kruszevska, D.; Sahl, H.; Bierbaum, G.; Pag, U.; Hynes, S. & Ljungh, A. (2004). Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rinitis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 54, No. 3, 648-653, 0305-7453.
58. Kurushima, J., Nakane, D., Nishizaka, T., & Tomita, H. (2015). Bacteriocin Protein BacL 1 of *Enterococcus faecalis* Targets Cell Division Loci and Specifically Recognizes L -Ala 2 - Cross-Bridged, 197(2), 286–295. <http://doi.org/10.1128/JB.02203-14>
59. Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3), 131–141.
60. Lasch P, Schultz CP, and Naumann D (1998) The influence of poly-(L-lysine) and porin on the domain structure of mixed vesicles composed of lipopolysaccharide and phospholipid: an infrared spectroscopic study. *Biophys J* 75:840–852.
61. Lee, P., Rudisill, J., Lin, K., Zhang, L., Harris, S., Falla, T., & Gallo, R. L. (2004). HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropine B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen*, 12(3), 351–358.
62. Life technologies. (1996). Amine-Reactive Probes | 2 Labeling Proteins, 1996, 1–11. <http://doi.org/MAN0001774>
63. Limoli DH, Rockel AB, Host KM, Jha A, Kopp BT, et al. (2014) Cationic Antimicrobial Peptides Promote Microbial Mutagenesis and Pathoadaptation in Chronic Infections. *PLOS Pathogens* 10(4): e1004083. doi: 10.1371/journal.ppat.1004083.
64. Lipsky, B. A., Berendt, A., Deery, H., Embil, J., Joseph, W., Karchmer, A., Lew, D., et al., (2004). Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical Infectious Diseases*, 39(7), 885–910. <http://doi.org/10.1016/j.pmr.2009.06.007>
65. Llobet, E., Tomás, J. M., & Bengoechea, J. A. (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, 154(12), 3877–3886. Retrieved from <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/022301-0>

66. López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J. A., & Loeza-Lara, P. D. (2011). Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application. In D. S. Olsztynska (Ed.), *Biomedical Engineering, trends, Research and technologies* (1st ed., pp. 275–304). InTech.
67. Lozano, J. S., Sebastián, M. S., González, F., Sampelayo, T. H., & Gómez, M. L. N. (2011). Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. In ERGON (Ed.), *Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos de Infectología* (1 ed., pp. 159-175). España: SEIP-AEP.
68. Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., & DeLeo, F. R. (2013). Mouse Model of *Staphylococcus aureus* Skin Infection. In I. C. Allen (Ed.), *Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols* (Vol. 1031, pp. 109-116): Springer Science+Business Media.
69. Mangoni, M. L., McDermott, A. M. and Zasloff, M. (2016), Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol*, 25: 167–173. doi:10.1111/exd.12929
70. Marr A., Gooderham W. And Hancock R. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Op. Pharm.* 6(5):468-472.
71. Matsuzaki, K., Murase, O., Fuji, N., & Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35, 11361–11368.
72. McBride, S. M., & Sonenshein, A. L. (2017). The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*, (2011), 1457–1465. <http://doi.org/10.1099/mic.0.045997-0>
73. Mehling, A., Kleber, M., & Hensen, H. (2007). Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 747–758.
74. Mendes, J., & Neves, J. (2012). Diabetic Foot Infections: Current Diagnosis and Treatment. *The Journal of Diabetic Foot Complications*, 4(2), 26–45.
75. Mestas, J., & Christopher, H. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Imm*, 172(5), 2731-2738.
76. Meszaros, A. J., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2000). Macrophage-Induced Neutrophil Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 165, 435–441.
77. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 958–969.
78. Mota-Meira, M., Morency, H. & Lavoie, M. C. (2005). In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 869–871.
79. Muñoz, A., & Read, N. D. (2012). Live-cell imaging and analysis shed light on the complexity and dynamics of antimicrobial peptide action. *Frontiers in IMMUNOLOGY*, 3, 1–4.
80. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
81. Nuri, R., Shprung, T., & Shai, Y. (2015). Biochimica et Biophysica Acta Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to

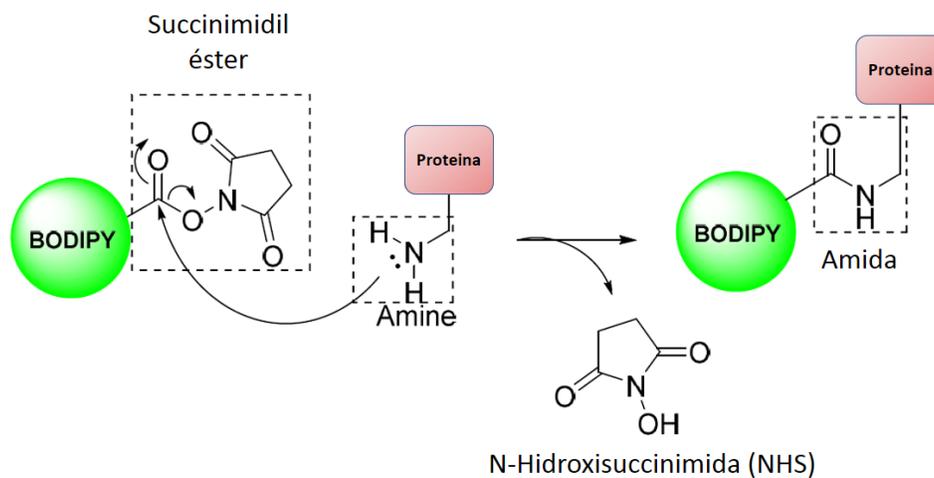
- antimicrobial peptides ☆. *BBA - Biomembranes*, 1848(11), 3089–3100. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.022>
82. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, and Shai Y (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341:501–513.
  83. Oren, Z., & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47, 451–463.
  84. Oubekka, S. D., Briandet, R., Fontaine-aupart, M., & Steenkeste, K. (2012). Correlative Time-Resolved Fluorescence Microscopy to Assess Antibiotic Diffusion-Reaction in Biofilms, 56(6), 3349–3358. <http://doi.org/10.1128/AAC.00216-12>
  85. Papazoglou, E. S., Zubkov, L., Mao, X., Neidrauer, M., Rannou, N., & Weingarten, M. S. (n.d.). Image analysis of chronic wounds for determining the surface area, 349–358. <http://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00594.x>
  86. Pastar, I., Nusbaum, A. G., Gil, J., Patel, S. B., Chen, J., Valdes, J., ... Davis, S. C. (2013). Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection, 8(2), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>
  87. Paul, W., & Sharma, C. P. (2015). The Anatomy and Functions of Skin. In *Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering* (1st ed., pp. 25–34). Shropshire, United Kingdom: SMITHERS RAPRA.
  88. Phoenix, D. A., Dennison, S. R. and Harris, F. (2013) Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity, in *Antimicrobial Peptides*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527652853.ch1
  89. Public Health Agency of Canada. (2004). In Best M., Graham M. L., Leitner R., Ouellette M. and Ugwu K. (Eds.), *Laboratory Biosafety Guidelines* (3rd ed.). Canada: Public Health Agency of Canada.
  90. Rangarajan, N., Bakschi, S. and Weisshaar, J.C. (2013) Localized permeabilization of *E. coli* membranes by the antimicrobial peptide Cecropin A. *Biochemistry* 52, 6584–6594.
  91. Rezende, L. C., & Emery, F. S. (2013). A review of the synthetic strategies for the development of BODIPY dyes for conjugation with proteins. *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry*, 5(1), 62-83.
  92. Rodríguez, A., Villegas, E., Montoya-rosales, A., Rivas-santiago, B., & Corzo, G. (2014). Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*, 9(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101742>
  93. Rotem, S., Radzishovsky, I., Bourdetsky, D., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y., & Mor, A. (2008). Analogous oligo-acyl lysines with distinct antibacterial mechanisms. *FASEB J*, 22(8), 2652–61.
  94. Rothstein J. D., Patel S., Regan M. R., Haenggeli C., Huang Y. H., Bergles D. E., et al. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433 73–77
  95. Ryu, S., Song, P. I., Seo, C. H., Cheong, H., & Park, Y. (2014). Colonization and Infection of the Skin by *S. aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides, 8753–8772. <http://doi.org/10.3390/ijms15058753>

96. Samy, R. P., Kandasamy, M., Gopalakrishnakone, P., Stiles, B. G., Rowan, E. G., Becker, D., ... Chow, V. T. K. (2014). Wound Healing Activity and Mechanisms of Action of an Antibacterial Protein from the Venom of the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*), 9(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080199>
97. Sánchez-Vásquez, L., Silva-Sánchez, J., Jiménez-Vargas, J. M., Rodríguez-Romero, A., Muñoz-Garay, C., Rodríguez, M. C. Possani, L. D. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin ☆. *BBA - General Subjects*, 1830(6), 3427–3436. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.028>.
98. Sani, M.-A., & Separovic, F. (2016). How membrane-active peptides get into lipid membranes. *ACCOUNTS of Chemical Research*, 49, 1130–1138.
99. Schröder, J. M., Harder, J., & Kiel, C. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins, 63, 469–486. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5364-0>.
100. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature, 4(March), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>.
101. Seo M., Won H., Kim J., Mishig-Ochir T. and Lee BJ. 2012. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*. 17. 12276-12286.
102. Shireen, T., Singh, M., Das, T., & Mukhopadhyay, K. (2013). Differential Adaptive Responses of *Staphylococcus aureus* to In Vitro Selection with Different Antimicrobial Peptides, 57(10), 5134–5137. <http://doi.org/10.1128/AAC.00780-13>.
103. Sperandio, B., Regnault, B., Guo, J., Zhang, Z., Jr, S. L. S., Sansonetti, P. J., & Thierry, P. (2008). Virulent *Shigella* fl exneri subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression, 205(5), 1121–1132. <http://doi.org/10.1084/jem.20071698>.
104. Stevens, D. L., Bisno, A. L., Chambers, H. F., Dellinger, E. P., Goldstein, E. J. C., Gorbach, S. L. G., ... Wade, J. C. (2014). Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft Tissue Infections: 2014 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 59(2), 10–52. <http://doi.org/10.1093/cid/ciu296>.
105. Sudheendra, U. S., Dhople, V., Datta, A., Kar, R. K., Shelburne, C. E., Bhunia, A., & Ramamoorthy, A. (2015). Membrane disruptive antimicrobial activities of human B-defensin-3 analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 91, 91–99.
106. Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, and Segrest JP (1995) Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* 34:4393–4401.
107. Unger T, Oren Z, and Shai Y (2001) The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function and model membrane interactions: implication to their mode of action. *Biochemistry* 40:6388–6397.
108. Utaida, S., Dunman, P. M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Singh, V. K., ... Wilkinson, B. J. (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology*, 149(10), 2719–2732. Retrieved from <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26426-0>.

109. Wang, G. (2015). Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Methods Mol Biol.*, 1268, 43–66.
110. Wu, S. C., Driver, V. R., Wrobel, J. S., & Armstrong, D. G. (2007). Foot ulcers in the diabetic patient, prevention and treatment, 3(1), 65–76.
111. Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boule, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., ... Lu, W. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. *PNAS*, 100(15), 8880–8885.
112. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., & Huang, H. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysics Journal*, 81, 1475–1485.
113. Yeaman, M., & Yount, N. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
114. Yim, G.; Wang, H. M. H.; Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc., B*, 362, 1195–1200.
115. York, M. K., Sharp, S. E., & Bowler, P. G. (2007). Wound and soft tissue cultures. In L. S. García & H. D. Isenberg (Eds.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (2nd ed.). Washington, D. C.: American Society of Microbiology.
116. Zheng, Z., & Stewart, P. (2002). Penetration of Rifampin through *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 46(3), 900–903.

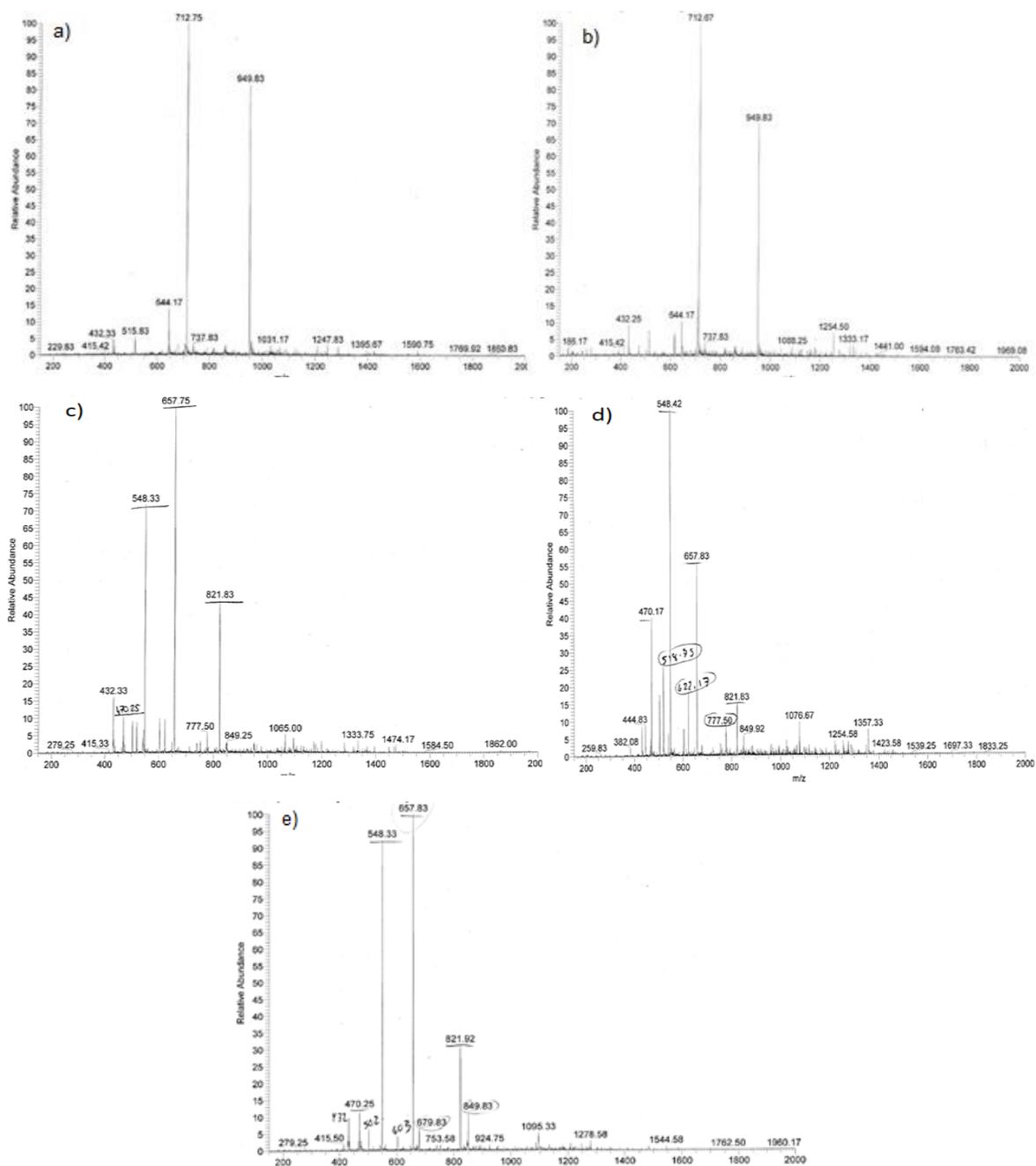
## Anexos

### A1. Reacción de conjugación de péptidos con BODIPY



Reacción del succinimidil éster con la amina  $\epsilon$  del residuo de lisina para formar una unión amida en la que se libera NHS (modificado de Rezende *et al.*, 2013).

## A2. Espectrometría de masas de Pin2[G] y FA1 marcados con BODIPY



**Espectrometría de masas de las fracciones de Pin2[G] y FA1 unidas a BODIPY recuperadas de HPLC.** a) F1- Pin2[G]+BODIPY, b) F2-Pin2[G]+ BODIPY, c) F1-FA1+ BODIPY, d) F2-FA1+ BODIPY y e) F3-FA1+ BODIPY. Pin2[G]+BODIPY=2,846.16 Da (2,572.0 Da de Pin2[G] + 389.16 Da de BODIPY). FA1+BODIPY = 3,282.76 Da (3,008.6 de FA1 + 389.16 de BODIPY)