



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto inhibitorio de péptidos de defensa innata derivados de LL-37 en biopelícula de *Staphylococcus spp.***

**Maryi Lorena Segura Alba**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia

2019



# **Efecto inhibitorio de péptidos de defensa innata derivados de LL-37 en biopelícula de *Staphylococcus spp.***

**Maryi Lorena Segura Alba**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Microbiología**

Directora:

Msc. Liliana Muñoz Molina

Codirectora:

Dr.Sc. Luz Mary Salazar Pulido

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología.

Bogotá, Colombia

2019



*"Siempre parece imposible hasta que se hace"*  
*Nelson Mandela.*

*Gracias Dios porque nunca me ha dejado sola.*  
*Gracias familia por su apoyo y amor.*  
*Gracias a la Vida que me enseñó a caerme y a*  
*levantarme.*

*El perdón libera el alma.*



## **Agradecimientos**

A Dios porque ha guiado todo el camino que he recorrido y me llena de fuerzas para continuar.

A mi familia por todo el apoyo y amor que me han demostrado durante toda mi vida.

A la profesora Liliana Muñoz Molina Pulido, directora de mi trabajo de tesis de Maestría, por su apoyo paciencia, consejos, amistad incondicional y guía durante este proceso.

A la Doctora Luz Mary Salazar, por sus consejos y motivación para culminar esta Maestría.

A Socorro Prieto Franco, por apoyo y amistad, Dios te pague.

A la Teresa Martínez, por sus conocimientos y apoyo para culminar esta Maestría.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el apoyo durante este proceso en especial al grupo de investigación REMA y a las docentes Gladys Pinilla y Jeannette Navarrette, quienes me mostraron su apoyo, me dieron consejos y palabras de ánimo en los momentos difíciles.

A mis amigos Jean Carlos Villamil, Sergio Alejandro Gutiérrez, Karen Ardila, Katerinne Betancour, Adriana Catherine Castillo Castañeda y todos y cada una de las personas que de una u otra forma me dieron ánimo, consejos y ayuda para terminar este hermoso proceso.

Muchas gracias a todos.



## Resumen

Los *Staphylococcus spp.* hacen parte de la microbiota humana, la patología depende de la capacidad de secretar toxinas, factores de virulencia y genes de resistencia.

Otro de los factores de resistencia es la formación de biopelícula controlado por el quorum sensing y proteínas de adhesión intracelular (PIA), mediante un proceso descrito en tres pasos: adhesión; proliferación/maduración y dispersión. En la adhesión las proteínas de unión (MSCRAMM) tienen la capacidad de unirse a elastina, colágeno, fibronectina y fibrinógeno, esto aumenta la capacidad de adherencia y prevalencia.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la presencia de algunas de estas enzimas y la actividad anti-biopelícula de cuatro péptidos con secuencias análogas a la catelicidina humana, en aislamientos clínicos de *S.aureus* y *S. epidermidis*, mediante métodos de rojo Congo, microplaca de 96 pozos, PCR y qPCR.

El ensayo en microplaca de 96 pozos mostró que los péptidos LL37-1 y DLL37-1, a una concentración de 5  $\mu$ M, inhiben la formación de biopelícula después de 24 horas de exposición, en un 50 y 55% respectivamente y en las curvas de crecimiento bacteriano presenta cambios con respecto al control entre 4 y 12 horas. Las enzimas de adhesión identificadas fueron ClfA, ClfB, FnbA en *S. aureus* y SdrE, SdrF en *S. epidermidis*. La expresión de estas proteínas en presencia de los péptidos fue diferente en cada aislamiento. Los hallazgos encontrados proporcionan evidencia que los péptidos con mayor capacidad de actividad antibiopelícula son los péptidos LL37-1 y DLL-37-1.

**Palabras Clave:** *S.aureus*, *S.epidermidis*, biopelícula, Péptido sintético LL-37.

## Abstract

The *Staphylococcus spp.* They are part of the human microbiota, the pathology depends on the ability to secrete toxins, virulence factors and resistance genes.

Another resistance factor is the formation of biofilm controlled by quorum sensing and intracellular adhesion proteins (PIA), by a process described in three steps: adhesion; proliferation / maturation and dispersion. In adhesion binding proteins (MSCRAMM) have the ability to bind elastin, collagen, fibronectin and fibrinogen, this increases the ability to adhere and prevail.

This work aims to determine the presence of some of these enzymes and the anti-biofilm activity of four peptides with sequences analogous to human cathelicidin, in clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis*, using methods of Congo red, microplate of 96 wells, PCR and qPCR.

The 96-well microplate assay showed that LL37-1 and DLL37-1 peptides, at a concentration of 5  $\mu$ M, inhibit biofilm formation after 24 hours of exposure, at 50 and 55% respectively and in the curves of Bacterial growth presents changes with respect to the control between 4 and 12 hours. The adhesion enzymes identified were ClfA, ClfB, FnbA in *S. aureus* and SdrE, SdrF in *S. epidermidis*. The expression of these proteins in the presence of the peptides was different in each isolation. The findings found provide evidence that the peptides with the highest capacity for anti-film activity are peptides LL37-1 and DLL-37-1.

**Keywords:** *S.aureus*, *S.epidermidis*, biofilm, LL-37 synthetic peptide.

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tabla</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Objetivos</b> .....	<b>21</b>
1.1 Objetivo general .....	21
1.2 Objetivos específicos .....	21
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>22</b>
2.1 Generalidades del género <i>Staphylococcus spp.</i> .....	22
2.1.1 <i>Staphylococcus coagulasa positiva (SCP)</i> .....	22
2.1.2 <i>Staphylococcus coagulasa negativa (CoNS)</i> .....	27
2.2 Biopelícula .....	29
2.2.1 Formación de la biopelícula .....	31
2.2.2 El <i>Staphylococcus spp.</i> y la biopelícula .....	34
2.2.3 Resistencia a los antibióticos .....	36
2.2.4 Resistencia en la biopelícula .....	38
2.3 Péptidos Antimicrobianos .....	40

2.3.1 Mecanismo de rotura de membrana inducida por péptidos .....	41
2.3.2 Defensinas .....	42
2.3.3 Catelicidinas .....	43
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>44</b>
3.1 Características de las muestras .....	44
3.2 Determinación fenotípica para la producción de biopelícula mediante el método de Agar Rojo Congo (ARC).....	45
3.3 Determinación de la formación de biopelícula por microplaca de 96 pozos.....	46
3.4 Diseño de primers para las proteínas de adhesión .....	46
3.5 Identificación de la presencia de genes.....	47
3.6 Diseño de los Péptidos.....	49
3.6.1 Síntesis de los Péptidos.....	50
3.6.2 Pureza de los de los Péptidos.....	51
3.6.3 Dicroísmo circular (DC).....	51
3.6.4 Actividad biológica de los Péptidos.....	52
3.6.4.1 Efecto Hemolítico de los péptidos sintetizados.....	52
3.6.4.2 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados.....	52
3.6.6 Efecto de los péptidos sobre la formación de la biopelícula .....	53
3.6.7 Efecto de los péptidos sobre el crecimiento bacteriano.....	54
3.6.8 Amplificación por PCR en tiempo real .....	54
3.6.9 Extracción de RNA.....	54
3.7 Análisis estadístico.....	56
<b>4. Resultados.....</b>	<b>56</b>
4.1.1 Determinación fenotípica para la producción de biopelícula mediante el método de Agar Rojo Congo (ARC) .....	57

4.1.2 Determinación de la biopelícula por microplaca de 95 pozos .....	58
4.2 Secuencia de los primers .....	60
4.2.1 Identificación de los genes .....	61
4.3 Secuencia de Péptidos .....	64
4.3.1 Pureza de los péptidos .....	65
4.3.2 Dicroísmo circular.....	70
4.3.3 Efecto hemolítico de los péptidos sintetizados LL37-1, ACLL37-1, ACLL-37-2 y DLL-37-1 .....	71
4.3.4 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 .....	72
4.3.5 Efecto de los péptidos sobre la formación de la biopelícula por microplaca de 96 pozos .....	73
4.3.6 Curvas de crecimiento Bacteriano y la acción de los péptidos LL37-1, ACLL37 - 1, ACLL-37-2 y DLL37-1.....	75
4.3.7 Determinación de proteínas de Adhesión ClfA, FnbA, SdrC, SdrG y SdrF por PCR en tiempo real con los péptidos LL37-1 y D LL-37 -1 a 5µM.....	80
<b>5. Discusión .....</b>	<b>85</b>
5.1 Conclusiones.....	93
5.2 Recomendaciones .....	93
<b>Bibliografía.....</b>	<b>94</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Fases del desarrollo de la biopelícula .....	34
<b>Figura 2:</b> Adherencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
<b>Figura 3:</b> Línea de tiempo de los antibióticos y su resistencia.....	37
<b>Figura 4:</b> Mecanismos de tolerancia de la biopelícula.....	39
<b>Figura 5:</b> Mecanismos de rotura los péptidos .....	42
<b>Figura 6:</b> Protocolo para PCR multiplex y PCR convencional .....	48
<b>Figura 7:</b> Protocolo para amplificación para síntesis de cDNA.....	55
<b>Figura 8:</b> Protocolo de amplificación para detección de genes por medio de PCR en tiempo real .....	55
<b>Figura 9:</b> Distribución de los resultados de la prueba de agar Rojo Congo..	58
<b>Figura 10:</b> Formación de la biopelícula según método Christensen para <i>Staphylococcus</i> spp .....	59
<b>Figura 11:</b> Formación de la biopelícula según método Christensen para <i>S.aures</i> y <i>S.epidermidis</i> .....	60
<b>Figura 12:</b> Proteínas de adhesión SdrG y SdrF para <i>S. epidermidis</i> .....	62
<b>Figura 13:</b> Proteínas de adhesión SdrC para <i>S. aureus</i> .....	62
<b>Figura 14:</b> Proteínas de adhesión FnbA, ClfA, ClfB para <i>S. aureus</i> .....	63
<b>Figura 15:</b> Muestras positivas para proteínas de adhesión .....	63
<b>Figura 16:</b> Cromatografía de los péptidos LL37-1, ACLL37-1 .....	66
<b>Figura 17:</b> Espectrometría de masas de los péptidos de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 .....	68
<b>Figura 18:</b> Dicroísmo circular de los péptidos. ....	70
<b>Figura 19:</b> Efecto hemolítico por horas.....	71
<b>Figura 20:</b> Efecto citotóxico por horas .....	72
<b>Figura 21:</b> Inhibición de los péptidos en el total de los aislamientos en estudio .....	73

<b>Figura 22:</b>	Inhibición en <i>S.epidermidis</i> .....	74
<b>Figura 23:</b>	Inhibición en <i>S.aureus</i> .....	74
<b>Figura 24:</b>	Inhibición en curvas en crecimiento en <i>S.epidermidis</i> .....	75
<b>Figura 25:</b>	Inhibición en curvas en crecimiento en <i>S.aures</i> .....	76
<b>Figura 26:</b>	Inhibición en curvas en crecimiento en <i>S.aures</i> y <i>S.epidermidis</i> ..	77
<b>Figura 27:</b>	Tratamiento del péptido LL37-1 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM .....	77
<b>Figura 28:</b>	Tratamiento del péptido ACLL37-1 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM.....	78
<b>Figura 29:</b>	Tratamiento del péptido ACLL37-2 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25 µM.....	79
<b>Figura 30:</b>	Tratamiento del péptido DLL37-2 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM.....	80
<b>Figura 31:</b>	Expresión de las proteínas de Adhesión ClfA, FnbA, SdrC para las cepas 21 y USA300.....	82
<b>Figura 32:</b>	Resultados de los niveles de las proteínas de adhesión SdrG y SdrF para <i>S.epidermidis</i> .....	84

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Funcionalidad del EPS .....	31
<b>Tabla 2:</b> Secuencias de péptidos diseñados con actividad anti-biopelícula ...	50
<b>Tabla 3:</b> Resistencia a los antibióticos en los aislamientos analizados (%)....	57
<b>Tabla 4:</b> Secuencias de los primers.....	61
<b>Tabla 5:</b> Secuencias de los Péptidos.....	65

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
Aap	Proteína asociada a la acumulación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Péptidos antimicrobianos (en inglés)
ARC	Agar Rojo Congo
BHI	Infusión cerebro corazón (en inglés)
cDNA	ADN complementario
CIP	Ciprofloxacina
Clf	Clumping
ClfA	Clumping A
ClfB	Clumping B
CLIN	Clindamicina
CLORAN	Cloranfenicol
CNA	Adhesina de unión al colágeno
CoNS	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo
CWA	Pared celular central
DC	Dicroismo circular
DLL	Acoplamiento, bloqueo y cierre
eADN	ADN extracelular
EcpA	Cistein proteasa
EI	Elastina
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
ERY	Eritromicina

**Abreviatura Término**

---

EsP	Serín proteasas
Fg	Fibrinógeno
Fn	Fibronectina
FnBPA	Fibrinógeno/fibronectina A
FnBPB	Fibrinógeno/fibronectina B
FVW	Von Willebrand
GEN	Gentamicina
LNZ	Linezolid
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
MSCRAMM	Proteínas de la matriz extracelular del huésped
NaCl	Cloruro de sodio
NK	Natural killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA	Oxacilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular
PSM	Modulinas solubles en fenol
PVL	Leucocidin Pantón Valentin
REMA	Relaciones epidemiológicas, microbiológicas e inmunológicas aplicadas al laboratorio clínico y molecular
RIFAM	Rifampicina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva
SdrC	Serina–aspartato C
SdrD	Serina–aspartato D
SdrE	Serina–aspartato E
SdrF	Serina–aspartato F
SdrG	Serina–aspartato G
SepA	Metaloproteasa
TETRA	Tetraciclina
TFE	Trifluoroetanol
TMP/SMZ	Trimethoprim – Sulfametoxazol
TNF	Factor de necrosis tumoral
VAN	Vancomicina

## Introducción

La biopelícula es un mecanismo de persistencia y resistencia de los microorganismos, conformada por una o varias especies de bacterias adheridas a una superficie y embebidas en una matriz extracelular, que la hacen significativamente menos susceptible a los agentes antimicrobianos (1). Las infecciones que se asocian a la biopelícula son aproximadamente del 65 a 80% y pueden llegar a ser recidivas (2), según datos presentados por el CDC (3) y en Instituto Nacional de Salud (4).

Asociadas a la formación de biopelícula, se encuentran involucradas las proteínas de adhesión denominadas por su siglas en inglés MSCRAMMs (**M**icrobial **S**urface **C**omponents **R**ecognizing **A**dhesive **M**atrix **M**olecules) (5), incluye Clumping A (ClfA) y Clumping B (ClfB), su actividad es la unión al fibrinógeno; proteínas repetitivas Serina–aspartato que comprenden SdrC, SdrD, SdrE, se unen al colágeno y proteínas de unión fibrinógeno/fibronectina FnBPA y FnBPB (6) y proteínas repetitivas Serina–aspartato SdrG y SdrF (7,8), las cuales pueden estar presentes en los *S. aureus* ó *S. epidermidis*, incrementado la capacidad de formación de biopelícula in vitro, como lo demostró Hamid Dakheel y Cols. en el año 2016 en estudio con 25 aislamientos de MRSA y donde se vio aumento del 88% (9) o en el trabajo de Ardon y Cols quienes identificaron que de 27 aislamientos de *S. epidermidis* analizados el 89% eran altamente formadores de biopelícula (10). *S. aureus* y los *S. epidermidis*, presentan una gran variedad de factores de virulencia como enterotoxinas, hemolisinas, leucotoxinas y enzimas como las lipasas, serín-proteasas, cisteína proteasas y su capacidad para formar biopelícula (5,11,12), son de gran importancia en salud pública ya que inciden directamente en la morbilidad y mortalidad de los pacientes.

Debido a que no todos los aislamientos clínicos de *S.aureus* y *S.epidermidis* pueden generar biopelícula, este trabajo inicia con la caracterización de aislamientos clínicos para determinar la formación de biopelícula, e identificar las proteínas de adhesión MSCRAMMs y la expresión de las proteínas ClfA, ClfB, SdrC, FnbA, SdrG, en presencia de péptidos catiónicos derivados de la catelicidina humana LL-37.

Este péptido poseen un alto porcentaje de selectividad y especificidad (13,14), debido a que su estructura es alfa helical con acción anfipática para favorecer la interacción con la membrana citoplasmática de los microorganismos (15–18), como *P. aeruginosas*; *S. aureus* y *S. epidermidis* (19–21). Por lo tanto, se postula como un candidato terapéutico para inhibir la formación de biopelícula, por esta razón se diseñaron y se evaluaron cuatro péptidos análogos al LL37 denominados: LL37-1, ACLL37–1, ACLL-37–2 y DLL-37-1, con posible capacidad de inhibir la expresión de las proteínas de adhesión MSCRAMM.

Por esta razón nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Son los péptidos análogos a LL-37 capaces de inhibir la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*?

# 1. Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Determinar la actividad inhibitoria de biopelículas en *Staphylococcus spp.* de péptidos análogos al LL-37.

## 1.2 Objetivos específicos

- Identificar aislamientos de *Staphylococcus spp* de origen clínico con la capacidad de formación de biopelícula.
- Determinar la presencia de las proteínas de Adhesion *ClfA*, *ClfB*, *SdrC*, *FnbA*, *SdrG*, *SdrF*, en los aislamientos del estudio.
- Analizar la capacidad de inhibición de la biopelícula de diferentes péptidos análogos al LL-37 en aislamientos de *Staphylococcus spp.*

## 2. Marco teórico

### 2.1 Generalidades del género *Staphylococcus spp.*

Los *Staphylococcus spp.*, hacen parte de la microbiota de los humanos, incluyen 45 especies y 24 subespecies (22); unas pocas han sido reportadas como patógenas, causando infecciones en piel, tejidos blandos, los huesos, el torrente sanguíneo y el tracto respiratorio, además de colonizar material implantado a través de la producción de biopelícula (12,23), mediante una respuesta coordinada y adaptativa a las condiciones ambientales en el huésped, especialmente a nivel de su metabolismo y fluctuación de nutrientes, de esta manera pueden proliferar, liberar toxinas y factores de virulencia involucrados en el proceso de evasión del sistema inmune del huésped (24,25).

El género de *Staphylococcus spp.* se clasifica en *Staphylococcus coagulasa positiva* (SCP) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN), debido a la capacidad que presentan estas bacterias de coagular o no el plasma(26).

#### 2.1.1 *Staphylococcus coagulasa positiva* (SCP)

Dentro de los SCP, se encuentra el *S. aureus*, el cual forma parte de la microbiota humana, coloniza la piel, pliegues inguinales, axilas y el tracto respiratorio alto, especialmente (27,28). Es un agente frecuente de infecciones sanguíneas, su incidencia se encuentra alrededor de 80-190 casos/100000 habitantes por año en ciudades desarrolladas, debido a su capacidad de colonizar superficies incluyendo catéteres médicos (29). En Colombia de acuerdo al reporte del Instituto Nacional de Salud (INS) del año 2017, la frecuencia de infecciones por este microorganismo está en el cuarto lugar en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y en el tercer lugar de las no UCI (30). Estos datos nos demuestran la importancia médica del *S. aureus*, debido a su habilidad de incrementar la resistencia a los antimicrobianos y generar mecanismos de virulencia a través del tiempo mediante el proceso de infección.

La principal causa de resistencia por *S. aureus* en el mundo es la presencia de clones resistentes a meticilina (MRSA), observados en muchos estudios (31) y definido así por su resistencia a los derivados de penicilina y otros agentes antimicrobianos que contiene el anillo beta-lactámico, se encuentran asociados con infecciones adquiridas en el hospital, sin embargo ha emergido una alta virulencia en MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA)(32).

Los aislamientos que poseen el MRSA transportan un elemento genético móvil conocido como Staphylococcal cassette cromosomal (SCCmec) tipos I, II o III, y los CA-MRSA transportan cassettes tipo IV o V que son susceptibles a muchos antibióticos no beta-lactámicos (33,34).

La patogenicidad de *S. aureus* además de la resistencia a los antimicrobianos depende de la capacidad de producir y secretar diferentes toxinas y factores de virulencia que contribuyen a la colonización, invasión y diseminación en el huésped; dentro de las toxinas encontramos:

- Leucocidina: inhibe la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo, produciendo daños en la membrana celular mediante la lisis de los leucocitos en el huésped, causando la pérdida de potasio, y de esta manera promueve la secreción de proteínas inflamatorias en los macrófagos, monocitos, neutrófilos, las células dendríticas, linfocitos T y natural killer (NK) (35).
- Superantígenos: conocidas como células T miogénicas dentro de ellas encontramos las proteínas SAg's anteriormente clasificadas como toxinas enterocócicas y se asocian con propiedades entéricas (36,37).

Otros elementos móviles son los profagos Sa2USA que codifican la toxina PVL (Panton- Valentine Leucocidina), actúan en un amplio rango de células incluyendo eritrocitos, células epiteliales, células endoteliales, células T, monocitos y macrófagos, se relacionan con septicemias severas, infecciones en la superficie de la piel y son dermo-necrotizantes, las cuales generan un amplio efecto tóxico ya

que generan la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que permiten la muerte de células nucleadas y lisis osmótica a los eritrocitos (38,39).

Otro elemento móvil es el Sa3USA a quien se le atribuye tener los genes que codifican las estafiloquinasas y las proteínas inhibitoras de quimiotaxis, las cuales generan un desplazamiento bacteriano a través de la fibrina disuelta en sangre y la inhibición del reclutamiento de neutrófilos respectivamente (39).

Otras proteínas también consideradas como factores de virulencia son las que se encuentran expuestas en la superficie celular, este tipo de proteínas favorecen la microcolonización, promueven la adherencia e invasión a la célula huésped y/o componentes del tejido, dentro de ellas se encuentran las proteínas asociadas a la pared celular (CWA), presentan una longitud variable, ricas en aminoácidos, como prolinas y lisinas, lo que permite una unión fuerte a la pared celular. La secuencia N-terminal se une de manera covalente al peptidoglicano, en el C-terminal se encuentra un motivo LPXTG, que es una secuencia señal conservada Leu-Pro-X-Thr-Gly (40,41).

Uno de los más importantes es el complejo de proteínas de Superficie Microbiana que Reconocen Moléculas De Matriz Adhesiva (**MSCRAMM**) por sus siglas en inglés), cuya principal función es mediar la adherencia de las bacterias a los componentes de la matriz extracelular del huésped, tales como colágeno, fibronectina (Fn), fibrinógeno (Fg), elastina, factor de Von Willebrand (FVW), vitronectina y la sialoproteína ósea (42).

Las proteínas MSCRAMM incluyen el factor clumping, constituido por dos componentes denominados A (ClfA) y B (ClfB); proteínas repetitivas Serina–aspartato que comprenden SdrC, SdrD, SdrE, proteínas bifuncionales constituidas por las proteínas de unión fibrinógeno/fibronectina (FnBPA y FnBPB) proteínas de unión al colágeno (CNA); para *S. aureus*, y para *S. epidermidis* SdrG/Fbe, spa (proteína Staphylococcica A), cna (adhesión al colágeno), ebps (proteínas de unión a la elastina de *S. aureus*), las cuales son covalentemente unidas a la pared celular por transpeptidasas. Cada una de ellas presenta una función diferente la cual se

explica a continuación.

**Proteínas de unión a fibrinógeno (clumping factor):** tienen como función promover la adhesión al fibrinógeno, contribuyen a la colonización, agregación de plaquetas, inactiva el complemento e inhiben la fagocitosis (43,44). En su estructura se encuentran dos proteínas ClfA y ClfB y presentan funciones diferentes.

ClfA, se expresa en todos los estados del crecimiento celular, tiene como funciones formar absceso, promover la agregación de plaquetas y la adherencia del *S. aureus* a la fibrina (45) favoreciendo su adhesión a los biomateriales recubiertos de proteínas plasmáticas permitiendo que las bacterias colonicen y formen así biopelícula (46).

ClfB se une a la citoqueratina tipo I, se expresa en la fase exponencial temprana del crecimiento bacteriano y se encuentra ausente en la fase estacionaria tardía (47), promueve la colonización nasal tanto en roedores como en humanos(48).

**Proteínas repetitivas Serina–aspartato (Sdr):** este grupo lo conforman las proteínas, SDrC, SdrD y SdrE, las cuales son codificadas en tándem por la proteína Sdr, no se encuentran estrechamente relacionadas, pero presentan en común una región R que en su estructura contiene entre 20-30 residuos de aminoácidos idénticos indicando que tiene diferentes roles en la patogenicidad del *S. aureus*(49) especialmente en la formación de abscesos, SdrC y SdrD promueve la adherencia de *S. aureus* mediante la descamación de las células epiteliales nasales (50), SdrE produce la agregación plaquetaria, además de presentar una variante alélica denominada Bbp la cual se asocia a la formación de biopelícula (51).

En *S. epidermidis* puede expresar tres proteínas diferentes asociadas a la superficie celular, denominadas SdrF, SdrG y SdrH (52), que contienen repeticiones de dipéptidos de serina-aspartato. Las proteínas SdrF y SdrG son similares en secuencia y organización estructural a las proteínas Sdr de *S. aureus* (52,53). El SdrF, está presente en la colonización mediante la unión al colágeno cubre la superficie de los dispositivos médicos y favorece de esta manera las infecciones. Además se une a la queratina, un componente principal de la capa externa de la piel humana (53). El SdrG se une al fibrinógeno y presenta un paso importante en la colonización del biomaterial implantando, generando cambios conformacionales

especialmente en la superficie de la célula (54).

**Proteínas de unión al colágeno (CNA).** Media la colonización sobre superficies, inhibe la activación del complemento el cual da como resultado la evasión del sistema inmune y se expresa en la fase de crecimiento exponencial (55,56).

**Proteínas de unión fibrinógeno/fibronectina FnBPA y FnBPB.** Estas proteínas presentes en *S. aureus*, favorecen la colonización e invasión de las células mediante la interacción con el fibrinógeno, elastina y fibronectina, promueven la acumulación bacteriana, sin la presencia de una matriz extracelular en la bacteria en contraste con el biopelícula dependiente de PIA, por lo tanto estas proteínas tienen un comportamiento multicelular y sugieren que la formación de biopelícula es estimulada en concentraciones bajas de citrato (0,2%) (57,58).

En *S. epidermidis* se encuentra es la proteína de unión SdrG de importancia clínica porque favorece la colonización y adhesión al fibrinógeno a las plaquetas mediante un complejo ligando-proteína y su expresión es del 91% (59–61).

**Proteína A.** inhibe la vía clásica del complemento impidiendo el reconocimiento y asociación del C1q, esta interacción favorece la supervivencia del microorganismo causando de esta manera la infección (62).

### **Proteína de unión al fibrinógeno**

Esta proteína ha sido ampliamente caracterizada en *S. epidermidis*, también es denominada SdrG, una proteína de 119 kDa, que alberga un dominio LPXTG necesario para el enlace covalente al peptidoglicano, se caracteriza por tener una proteína que alberga un dominio con secuencias repetitivas (SdrG) (63), se demostró que inhibe la coagulación del fibrinógeno, además puede reducir la afluencia de neutrófilos fagocíticos, ayudando así a la supervivencia de las bacterias en el huésped (64).

## 2.1.2 *Staphylococcus coagulasa negativa* (CoNS)

Los CoNS, hace parte de la microbiota de la piel y mucosas humana y puede causar infecciones oportunistas y diseminarse en el torrente sanguíneo causando bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos y con implantes o dispositivos médicos a través de la formación de biopelícula (65) siendo el *S. epidermidis* el más importante y comúnmente aislado en infecciones nosocomiales (66). Por otra parte, el tratamiento se dificulta debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, lo que representa importantes cargas médicas y económicas (45).

En la actualidad se han identificado nuevas cepas de *S. epidermidis* que poseen factores de virulencia que lo llevan a ser un patógeno agresivo (67). Los avances genéticos han permitido entender la función de sus factores de virulencia en función de la patogenicidad, involucra moléculas que favorecen la colonización e infección del huésped incluyendo proteasas, toxinas y adhesinas (68).

En *S. epidermidis* las proteasas microbianas extracelulares, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, así como a diferenciar los estados en la formación de biopelícula. Una de estas es la serin proteasas (EsP) que degrada las proteínas ricas en ácido glutámico, evade el sistema del complemento y altera la cascada de coagulación, la cistein proteasa (EcpA) inhibe a la IgA e IgM para favorecer la evasión al sistema inmune, genera modificaciones proteolíticas a la albumina fibrinógeno y fibronectina, promueve la eficiente adhesión a los catéteres médicos; las metaloproteasa (SepA) (69), participa en el desarrollo de la proteína dependientes del biopelícula como la proteína AaP que requiere proteólisis para su actividad en la acumulación intracelular (70).

Otras proteasas son las denominadas ClpP, requieren ATP para su función proteolítica y reguladora, y le permiten a la bacteria adaptarse a múltiples cambios generados por el estrés, convirtiéndose en un factor de virulencia importante. Está implicada en la formación de las biopelícula por medio de la acción proteasa Spx, una proteína conocida en bacterias Gram positivas por su función supresora en la formación de la biopelícula (71–74).

En los SCN se han identificado factores de virulencia con propiedades superantigénicas tales como la toxina síndrome del shock tóxico toxina-1 (TSST-1) enterotoxinas y toxinas exfoliativas (64,75,76). La toxina más importante para este género es la denominada  $\delta$ -toxina la cual se codifica por el gen *hld* ubicado en el regulador locus *agr*, esta toxina interactúa con la membrana de los eritrocitos, formando poros en la membrana citoplasmática y causando su lisis. *S. epidermidis* produce pocas toxinas y exoenzimas que dañan los tejidos (64,77).

Las proteínas de adhesión que favorecen la agregación celular son diversas, entre las que encontramos: Proteínas que se unen al peptidoglicano y degradan la pared celular de la bacteria entre ellas están:

**Proteína asociada a la acumulación (Aap):** se ensambla covalentemente a la capa de peptidoglicano de la pared celular bacteriana y promueve la unión primaria de la formación de biopelícula mediada por el dominio A que se encuentra en el amino terminal, mientras que el dominio B participa en la fase de acumulación de la formación de biopelícula (78,79).

**Proteína AtlE:** es una autolisina bifuncional con un dominio alanina amidasa N-terminal, un dominio de anclaje de la pared celular central (CWA) e induce cambios significativos en la parte hidrofóbica de la superficie celular y causa degradación en la pared celular durante la división bacteriana, también actúa como factor de virulencia al favorecer la unión al poliestireno especialmente en catéteres que están causando infección (80–84).

**La proteína de unión a la matriz extracelular (EmbP):** participa en la unión a la fibronectina, promueve la agregación celular, participa en la formación de biopelícula, e interactúa con los macrófagos para generar resistencia a la fagocitosis (82,85–88)

**Modulinas solubles en fenol (PSM):** son proteínas citolíticas destruyen la integridad de la membrana de las células, participan en la destrucción de neutrófilos, lisis de eritrocitos y otras células (89), se unen a las células del huésped por medio de receptores para inhibir el sistema inmune innato y así estimular la liberación de

citoquinas proinflamatorias, degranulación e inhibición de la apoptosis (90), además contribuyen a la formación del biopelícula y a su dispersión (88). Las PSM afectan el volumen de la biopelícula y permiten la formación de canales que ayudan a la diseminación de los diferentes organismos a los sitios más distantes (91,92).

**Proteína Bhp:** es una proteína de superficie asociada a la biopelícula producida por el *S. epidermidis* (71), cumple la función principal de adhesión a superficies de polietileno. Estudios sugieren que es uno de los factores de virulencia más importantes, debido a que las cepas que contienen los genes que codifican para esta proteína son altamente productores de biopelícula, incluso en ausencia del operón *icaADBC* (93,94). Esta proteína tiene una masa molecular de 258 kDa (94). Las investigaciones en biopelícula producidas en *Staphylococcus spp.*, están integrando tanto modelos in vitro como in vivo por lo que es importante conocer este mecanismo en su totalidad.

## 2.2 Biopelícula

El término biopelícula fue introducido en el año 1982 por Costerton después de haber observado una infección persistente causada por *S. aureus* en un catéter cardíaco (95), se definió como una forma de vida microbiana en la que una o múltiples especies de bacterias con crecimiento variable forman comunidades densamente pobladas, típicamente encerradas en una matriz de polímeros secretados (96), que presentan un fenotipo alterado con respecto al crecimiento, la expresión génica y la producción de proteínas(95). Estas comunidades pueden estar formadas por un solo microorganismo, pero con mayor frecuencia se agrupan en comunidades complejas y diversas de diferentes tipos de microorganismo, las cuales tienen la capacidad de cambiar las condiciones de su hábitat, al igual que su propio estilo de vida con el propósito de crear un entorno en donde se favorece la supervivencia (96).

La formación de esta estructura depende de diversos factores que pueden llegar afectar el comportamiento de la bacteria, los cuales llevan a determinar la estructura, la composición de la matriz que actúa como una barrera protectora,

protege a la comunidad de bacterias de la respuesta inmune del huésped y facilita la adhesión de bacterias sobre la superficie. La forma y dispersión de la biopelícula, depende de factores como pH, la temperatura, niveles de oxígeno, osmolaridad, factores hidrodinámicos, los cuales están involucrados en el transporte e intercambio de fluidos durante los estados iniciales de la colonización. Una vez que las bacterias formen la biopelícula muestran características diferentes en el crecimiento al de las células platónicas con respecto al metabolismo, la transcripción de genes y producción de proteínas (97,98), esta comunidad tiene la habilidad de cambiar las condiciones propias y del ambiente que las rodea para crear un nuevo entorno, donde se favorece su supervivencia (99).

Por lo anterior, además de las interacciones de físicas, químicas y biológicas del microambiente, llevan a generar una comunidad altamente heterogénea, en la cual se crea una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuesta principalmente de ADN extracelular (eADN), polisacáridos y proteínas que contribuyen a definir la estructura de la biopelícula, esto favorece la formación de canales internos, los cuales permiten el acceso de agua y oxígeno, que llegan incluso a lugares profundos, además facilita la concentración de nutrientes como carbono, nitrógeno y fosfato, los cuales ayudan a la supervivencia de los microorganismos (100,101). Estos canales generan condiciones ambientales diversas que potencializan la expresión fenotípica, genética y producción de diversas proteínas, favoreciendo la generación de subpoblaciones, lo que puede causar la expresión heterogénea de genes, por ejemplo microorganismos que crecen aeróbicamente, fermentativamente y aquellas que están metabólicamente inactivas (100,102,103).

La actividad metabólica de las comunidades, se ha alterado en comparación con las bacterias que se encuentran de forma planctónica, ya que se ha aumentado la producción de EPS y se activan o inhiben los genes que se necesiten para la supervivencia, además de disminuir la tasa de crecimiento (104), las EPS (Tabla1) contiene una amplia variedad de proteínas, glicoproteínas, glucolípidos y ADN extracelular (e-ADN) (105), esta matriz hace que las condiciones de perdurar y proliferar mejoren

cuando invaden el cuerpo humano, otorgándoles una gran resistencia y una sobre vida al estrés ambiental (106) además de proporcionar un escudo, que contribuye a la protección, supervivencia, a cambios de pH o a la acción de los desinfectantes y antibióticos, entre otros (107).

**Tabla 1:** Funcionalidad del EPS

<b>Efecto del componente EPS</b>	<b>Naturaleza del componente EPS</b>	<b>Papel en biofilm</b>
<b>Constructivo</b>	Polisacáridos neutros Amiloides	Componente estructural
<b>Adsorción</b>	Polisacáridos cargados o hidrófobos	Intercambio de iones, sorción
<b>Activo</b>	Enzimas extracelulares	Degradación de polímeros
<b>De superficie activa</b>	Anfifílico Vesículas de membrana	Interacciones de interfaz Exportación desde celda, sorción
<b>Informativo</b>	Lectinas Ácidos nucleicos	Especificidad, reconocimiento Información genética, estructura.
<b>Redox activo</b>	Polímeros refractarios bacterianos	¿Donante o aceptor de electrones?
<b>Nutritivo</b>	Varios polímeros	Fuente de Carbono, Nitrógeno y fosforo

### 2.2.1 Formación de la biopelícula

Una biopelícula bacteriana se forma principalmente en tres etapas (figura 1), la primera etapa es la adhesión a superficies bióticas y/o abióticas (108), que puede ser reversibles o no específica, por la presencia estructura que favorecen la adherencia como pili y flagelos o por fuerzas físicas como interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waal (102), posteriormente se origina una unión irreversible mediante la fijación de las células bacterianas a la superficie, generándose la acumulación de diversos tipos de microorganismos y dando origen a múltiples capas de una matriz viscosa (109). A partir de la generación de esta capa, los microorganismos pueden evadir el sistema inmune del huésped, inhibir el poder fagocítico de las células durante la infección y disminuir la eficiencia de los péptidos antimicrobianos y de los antibióticos. Las células bacterianas soportan

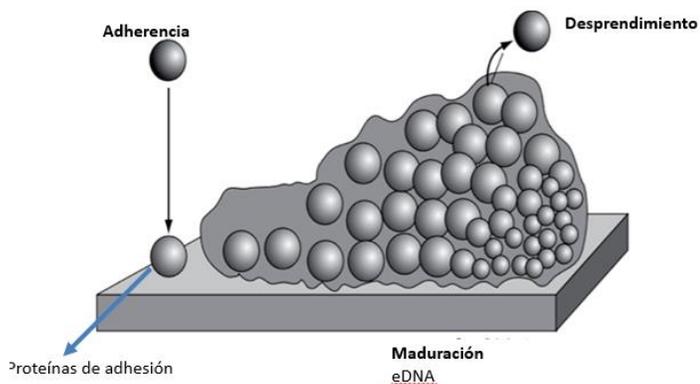
estas condiciones estresantes porque el EPS ayuda a su protección, otorgando un hábitat favorable, generando estabilidad y supervivencia (107).

Además de la adhesión, también se presentan procesos tales como la proliferación y procesos disruptivos que provocan la separación de los cúmulos celulares que controlan la expansión de la biopelícula, esto es de gran importancia ya que contribuye el proceso de infección (108,110); por otro lado se forman canales que estructuran la biopelícula (111), estos son necesarios para que los diferentes nutrientes lleguen a toda la superficie (108,110). Después de que se produce la unión de microorganismos sobre una superficie, esta se estabiliza, dando inicio a un proceso de multiplicación de células microbianas, así como un proceso de señalización química dentro del EPS, logrando un proceso de formación de micro colonias o comunidades microbianas (102), que potencializan la formación de la biopelícula (100) originando el retraso en la penetración de agentes antimicrobianos a través de la matriz, la alteración en la tasa de crecimiento, un cambio en el microambiente por la concentración de productos metabólicos y de desecho, lo que da lugar a zonas metabólicamente activas e inactivas (112,113).

La segunda etapa es la maduración, aquí es donde la biopelícula induce la secreción de exopolisacáridos, proteínas, eADN, entre otras, además las células microbianas se comunican entre sí a través de señales autoinductoras, esta comunicación entre célula a célula es importante, porque en ese momento alcanza la densidad requerida de células microbianas y facilitan la detección del quórum que es un mecanismo de regulación de la expresión en respuesta a la densidad de población celular (102). Todo esto ayuda a la estructuración, forma, tamaño y estabilidad de la biopelícula, además de facilitar el intercambio y distribución de los diversos nutrientes, la capa externa es la que crece más rápidamente y está expuesta a la mayor cantidad de oxígeno y nutrientes (98), el EPS es el material principal en la estructura tridimensional, originando los huecos intersticiales, canales que están saturados de agua, el cual es utilizado para eliminar los productos de desecho y distribuir todos los nutrientes (102). La densidad global y la complejidad aumenta a medida que los componentes extracelulares interactúan con moléculas

orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante, además de que organismos adheridos se replican, mientras que otros mueren (114). La parte más interna es la que presenta gran variabilidad metabólica y por tanto una mayor diversidad, al interior la limitación de nutrientes hace que el crecimiento sea más lento u casi estático; esto hace que la multiplicación bacteriana sea menos exponencial que lo normal, este cambio metabólico ayuda a que estas células que están inactivas logren una mayor capacidad de tolerancia a los antibióticos y son difíciles de detectar por parte del sistema inmune para que sean eliminadas (98). Otros factores que influyen en la maduración de la biopelícula son el pH interno, la osmolaridad, fuentes de carbono y la penetración de oxígeno (114).

La tercera etapa es el desprendimiento, aquí las células han alcanzado la madurez, por lo tanto se liberan para colonizar nuevas superficies y/o estructuras, cerrando así el ciclo de formación, pero generando también uno nuevo (98,115). Se ha documentado que el desprendimiento puede llevarse a cabo mediante fuerzas externas o por procesos activos inducidos. Aquí encontramos procesos como la erosión en donde se remueven pequeñas partes de la biopelícula, la separación en donde se mueven rápida y masivamente capas y finalmente ocurre la abrasión en la cual se presenta la liberación por colisión de partículas al líquido circundante. Cualquiera que sea la manera de desprendimiento, las bacterias migran a otras zonas densamente colonizadas a áreas que podrían favorecer mejor su desarrollo (111,114–116).

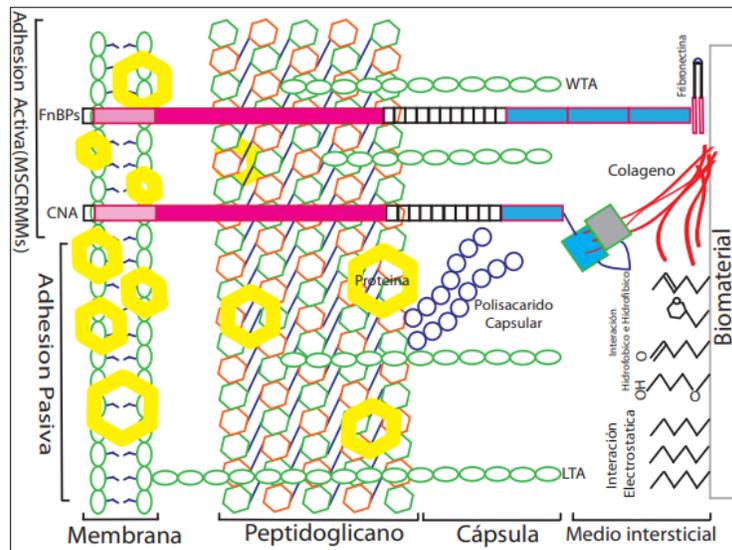


**Figura 1.** Fases del desarrollo de la biopelícula. **Adhesión:** unión inicial a una superficie, que puede ocurrir después de cubrir una superficie abiótica la cual se cubre con proteínas de la matriz del huésped o sobre un tejido. **Maduración:** la biopelícula crece y madura, donde predominan el exopolisacárido, PIA, los ácidos teicoicos y algunas proteínas. **Desprendimiento:** los grupos de células se desprenden adaptado de Otto (97).

### 2.2.2 El *Staphylococcus spp.* y la biopelícula

Los *Staphylococcus spp.* son considerados de gran virulencia y responsables de un amplio espectro de enfermedades (27) además de tener la capacidad de generar biopelícula. Las infecciones más severas suelen ser causadas por las especies de *S. aureus* y *S. epidermidis* especialmente en ambientes hospitalarios e implantes médicos (117). Uno de los factores de virulencia es la habilidad que tienen estos microorganismos a volverse resistentes a los antibióticos, especialmente el *S.aureus*, ya que a través de la transferencia horizontal de genes o la adquisición de elementos genéticos, como el cassette de cromosoma mec (SCCmes) que da como resultado una alta resistencia a la meticilina (MRSA)(118). Otro factor virulencia importante son las adhesinas, el genoma de *Staphylococcus aureus* codifica más de veinte adhesinas, llamadas componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva (MSCRAMM) (108,119) mientras que los *Staphylococcus* Coagulasa Negativos (CoNS) tienen significativamente menos adhesinas (103).

Durante la colonización el *Staphylococcus spp.* se somete a fuerzas como las del flujo de líquido y el contacto con la superficie celular, para resistir a esto promueve el uso de las proteínas de adhesión MSCRAMM (120), estas adhesinas brindar el mecanismo primario para generar la biopelícula, poseen un número de adhesinas asociadas a la superficie que median en la unión inicial de célula-célula y la adhesión intercelular durante la maduración de la biopelícula (119), figura 2.



**Figura 2.** Adherencia de *S. aureus* a la superficie de un biomaterial se es la combinación de mecanismos pasivos reversibles y mecanismos activos irreversibles mediado por componentes superficiales microbianos que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM), como CNA y FnBP, que pueden unirse al colágeno y la fibronectina, respectivamente. Adaptado de Arciola (119).

En la fase de maduración, el *Staphylococcus spp.* se caracteriza por la agregación intercelular, que se logra mediante la acción de exopolímeros de los polisacáridos presentes y las fuerzas de estructuración de la biopelícula que conducen al típico aspecto tridimensional maduro que rodea canales llenos de fluido. La agregación y adhesión en estafilococos está dada por la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA)(97), también se conoce como N -acetil-glucosamina polimérica (PNAG) (75). Se ha descrito que PIA es la molécula de adhesión más importante (97,108,109), está compuesta de residuos de N-acetilglucosamina con enlaces  $\beta$  -1,6 (80-85%) y

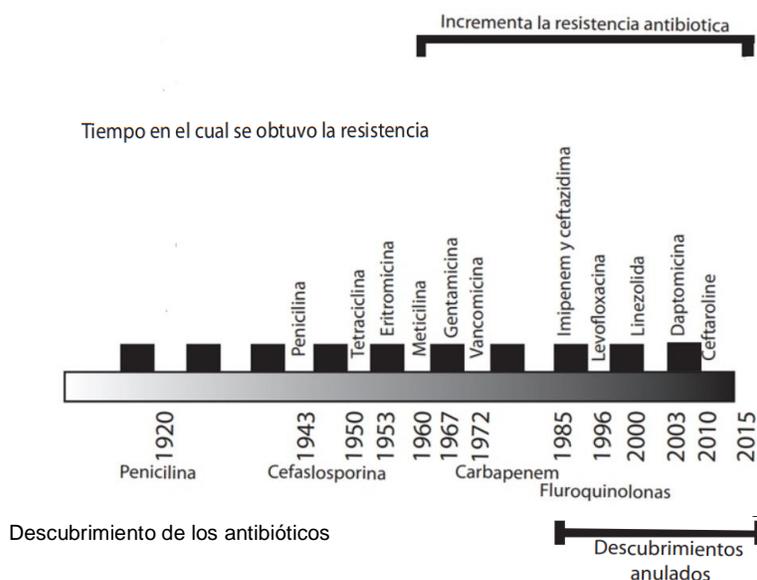
una fracción aniónica con un contenido menor de residuos de D-glucosaminilo no-N-acetilados que contiene fosfato y succinato ligado a ésteres (15- 20%)(100), con una carga neta positiva que promueve la agregación intercelular y la unión de *S. aureus* a superficies inertes (121). Sin embargo, la formación de biopelícula puede ser dependiente o de manera independiente de PIA.

La formación dependiente está asociada al operón *icaADBC* (75,100) el cual se compone de cinco genes que codifican sus respectivas proteínas: IcaA, IcaB, IcaC e IcaD encargadas de acoplarse con el exopolisacárido, IcaA es el gen que codifica para la enzima catalítica de la proteína IcaD, actúan como enzimas que traspasan la membrana o trasmembranales, específicamente como N-acetilglucosamiltransferasa, que utiliza UDP-glucosamina(UDP-GlcNAc) que dan origen a N-acetilglucosamina (GlcNAc); IcaB es el gen que codifica para la proteína de superficie celular que contribuye a la agregación y formación de la biopelícula. IcaC es un gen un exportador que está involucrada en la exportación a la superficie celular de los residuos que son sintetizados y IcaR un gen regulador (97). La desacetilación es importante, ya que es en este proceso donde se proporciona cargas positivas que son cruciales para que el polímero PIA se adhiera a la superficie bacteriana (108,109,111); por el contrario la formación de biopelícula independiente de PIA se puede dar por delección del gen *ica*, estudios han demostrado que el sistema de dos componentes *arIRS* reprime su acción y cuando se elimina, mejora la unión e involucra la expresión de diversas proteínas de adhesión denominadas MSCRAMM ( 94,116).

### **2.2.3 Resistencia a los antibióticos**

Uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes de la historia de la medicina son los antibióticos. A principio del siglo XX la expectativa de vida en Estados Unidos era de tan solo 47.3 años, pero hacia finales de siglo, gracias a que las infecciones se podían controlar con los antibióticos y a la disponibilidad del agua potable, había aumentado a 75 años (123). Desde su aparición diversos antibióticos se han utilizado con fines terapéuticos, en la industria, la agricultura y la ganadería (123). La época dorada para el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos es el período comprendido entre los años 1950 y 1970 (124). Pero posteriormente dio

lugar a la aparición de la resistencia (figura 3) la cual ha ido aumentando a un ritmo alarmante. Enfermedades como la neumonía, tuberculosis y gonorrea, se están volviendo más difíciles de curar ya que los antibióticos son cada vez menos efectivos (123). Cuando un fármaco pierde su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de forma efectiva se produce la resistencia a los antibióticos (124). En 1961, la meticilina fue la primera de las penicilinas semisintética resistente a la penicilinas dirigidas contra cepas de *Staphylococcus aureus* y posteriormente se reportó la resistencia a la vancomicina (VRSA) en el año 2002, después de 44 años de introducción al mercado (124,125).



**Figura 3.** Línea del tiempo que indica el descubrimiento de los antibióticos y su resistencia. Historial de descubrimiento de antibióticos, las barras indican el año del descubrimiento y el nombre de antibiótico, las línea superior muestra el inicio de la resistencia a los antibióticos y la línea inferior indica el vacío de descubrimiento de nuevas formulaciones (124).

Por lo tanto, las bacterias presentan un proceso natural que fomenta su resistencia, lo cual se puede producir a través de mutaciones genéticas, presión selectiva o transferencia horizontal de genes. Por ejemplo las bacterias poseen la cualidad de transferir directamente el material genético resistente entre sí mediante la transferencia por medio de plásmidos (124,126).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha advertido que una era post-antibiótica dará lugar a infecciones frecuentes y más agresivas que pueden provocar la muerte de los pacientes si no se actúa contra la resistencia a los antibióticos, (127) con la aparición de bacterias multirresistentes se causaran muertes en todo el mundo. Más de 63,000 pacientes de los Estados Unidos de América (EE. UU.) mueren cada año por infecciones bacterianas adquiridas en el hospital (128), aproximadamente 25,000 pacientes mueren debido a infecciones bacterianas por resistencia múltiple a medicamentos (MDR) en Europa (129). Un microorganismo se considera resistente si existe una alta probabilidad de fracaso terapéutico (130), los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los antibióticos más ampliamente utilizados y la principal causa de resistencia es la presencia de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que inactivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos hidrolizando el enlace  $\beta$ -lactámico en esos fármacos (131). Esto se agrava con la aparición del fenómeno de la multirresistencia, el cual se registró por primera vez en las enterobacterias durante la década de 1950. La situación se ve agravada ya que diversos microorganismos, son resistentes a la mayoría de los agentes antibacterianos actualmente disponibles, se conocen popularmente como superbacterias, lo que representa un desafío terapéutico severo (125).

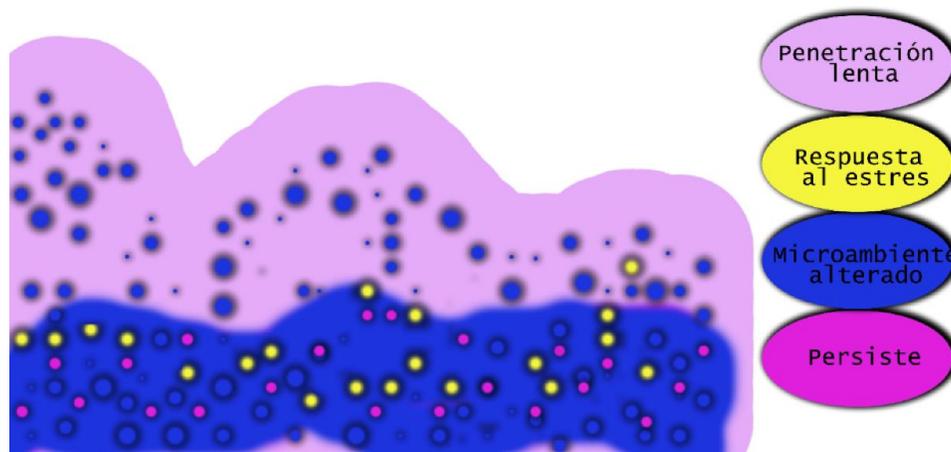
En las últimas décadas, se ha observado un rápido aumento en el número de aislados clínicos resistentes a los antibióticos, esto podría resultar en el aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas con enfermedades infecciosas que podrían alcanzar niveles similares a los vistos antes de la era de los antibióticos (125).

#### **2.2.4 Resistencia en la Biopelícula**

La biopelícula se considera como un mecanismo de virulencia para el huésped, pero a la vez de supervivencia para las bacterias, la matriz generada por este nicho ecológico permite la sobrevivencia de las bacterias que la conforman y la protección al estrés microambiental, por lo tanto genera evolución, diseminación y resurgimiento de las bacterias que la conforman y como resultado la prolongación de las infecciones (132). Las bacterias que viven en una comunidad bacteriana pueden

mostrar más tolerancia a un ambiente adverso que las células que viven de manera individual, se puede incrementar la resistencia a los antibióticos hasta en 1000 veces en las células bacterianas que conforman una biopelícula (106), muchas explicaciones se han dado, por ejemplo una adaptación natural, dada por procesos de transferencia horizontal de genes de resistencia (133).

Chambless et al (132), crearon un modelo informático que muestran algunos mecanismos hipotéticos que se generan en la biopelícula, por ejemplo una pobre penetración de los antibióticos, un despliegue de respuestas de estrés adaptativo, una gran heterogeneidad fisiológica por la diversidad de poblaciones que integran a las biopelículas y la presencia de variantes fenotípicas o células persistentes (figura 4) (132).



**Figura 4.** Mecanismo de tolerancia de la biopelícula. La fase acuosa que contiene el antibiótico (lila). En las zonas donde hay agotamiento de nutrientes (azul), la acción antibiótica puede ser antagonizada. Algunas bacterias pueden activar respuestas de estrés (azul), mientras que otras pueden diferenciarse en su fenotipo (amarillo). Adaptado de Stewart (134).

En la biopelícula, se genera una limitación de los nutrientes, el microambiente crea una difícil penetración de los antibióticos, un crecimiento lento y la persistencia de las bacterias que la conforman, lo que favorece la adaptación y perduración (99,102,134).

## 2.3 Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son propios de la defensa del huésped y pueden ser encontrados en diversos tipos de células, están constituidas entre 15 y más de 50 aminoácidos, poseen propiedades inmunomodulatorias que incluyen la reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas en respuesta a las moléculas de señalización microbiana, modulación en la expresión de quimioquinas, estimulación de angiogénesis, activación leucocitaria y diferenciación de macrófagos y leucocitos lo que favorece su habilidad para tratar infecciones bacterianas (135).

La lisozima fue el primer péptido descrito con actividad antimicrobiana por Alexander Fleming a finales de 1920 (136) luego en 1939, fue descrito otro péptido la gramicidina (137), sintetizado por *Bacillus brevis*. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son moléculas relativamente pequeñas con estructuras que pueden ser helicoidales, cíclicas, lineales o desordenadas (estas últimas denominadas estructuras random), sea cual sea la estructura preferencia adoptada por el péptido esta se asocia o puede estar relacionada con la actividad de estos sobre la membrana citoplasmática (14,137–142).

La actividad biológica de los PAM está dada por su capacidad de alterar la función inmune celular y la actividad antimicrobiana que bajo condiciones fisiológicas se van a unir a la pared y membrana de la bacteria sin requerir receptores específicos, necesita que haya una concentración adecuada del péptido, con una fuerza iónica que oscila entre +1 y +9 (137,138) lo cual aumenta la actividad antibacteriana contra los patógenos Gram negativos y Gram positivos, así como de la distribución hidrofóbica e hidrofílica que le confiere la anfipaticidad en la estructura alfa helical lo cual va a intensificar su actividad y selectividad (4).

El modo de acción de los PAM varía de acuerdo a las características de la envoltura celular que favorecen la interacción péptido-lípido, en bacterias Gram positivas, se encuentran los ácidos lipoteicóicos presentes en el peptidoglicano y en las bacterias Gram negativas en la membrana citoplasmática externa que está conformada por ácidos grasos y lipolisacáridos que contribuyen a la diversidad y

van a interactuar con los AMPS alterando la funcionalidad de la célula, mediante la ruptura de la membrana, dando como resultado la formación de poros y/o impidiendo la biosíntesis de la pared celular (143,144)

### **2.3.1 Mecanismos de acción sobre la membrana, inducida por péptidos**

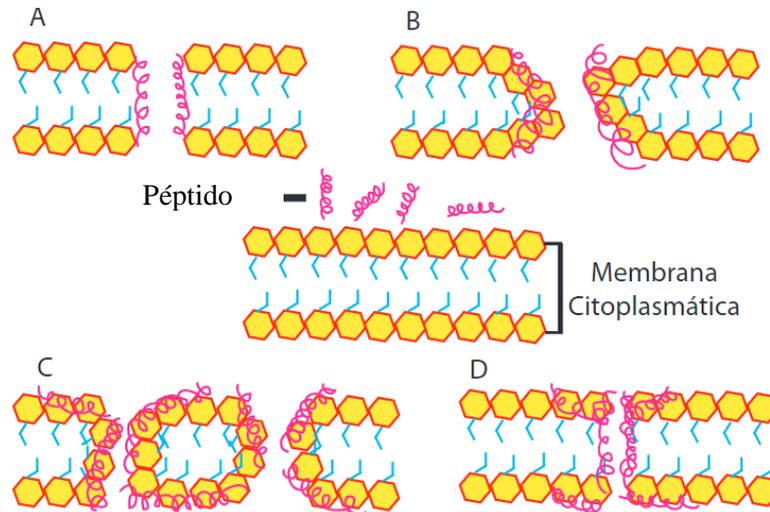
Debido a su naturaleza catiónica, los PAM son atraídos por las cargas negativas en la membrana microbiana externa, lo que apoya una interacción altamente selectiva. Las superficies bacterianas se caracterizan por presentar un entorno negativo causado por la presencia del ácido lipoteicoico y los lipopolisacáridos (145).

Los modos de acción por los cuales los PAM pueden desestabilizar y/o destruir la membrana de las bacterias incluyen la interferencia con el metabolismo y la alteración de los componentes citoplasmáticos (137) (figura 5). La acción del Modelo barril se da cuando el PAM se adhiere a la superficie de la membrana lipídica con su eje paralelo a ella, lo que lleva a la formación de poros permanentes transmembranales (140).

El poro actúa como un canal de conductancia que altera el potencial transmembrana y los gradientes de iones, lo que conduce a una fuga de componentes celulares y a la muerte celular (146,147). El modelo de alfombra (detergente) realiza una actividad de daño en la membrana, los AMP se diseminan por toda la membrana lipídica formando una alineación paralela con la que se inicia la desorientación y degeneración de las moléculas de lípidos (140). Los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa como una alfombra la membrana se impregna y desintegra de manera similar a un detergente sin la formación de canales discretos, lo que produce fugas y muerte celular (146,147) El modelo toroidal está asociado con la formación de poros, los PAM alteran la curvatura local de la bicapa, que guía la flexión interna de las moléculas de lípidos y esto conduce a la formación de un poro (137,140,146) y el modelo de poro toroidal desordenado donde las moléculas peptídicas son menos rígidas (140). Estos agregados interactúan con la bicapa de fosfolípidos y pueden permitir la fuga de los componentes celulares mediante la

formación de canales acuosos y transitorios. Este modelo se puede aplicar a péptidos de todas las longitudes (147).

Independientemente de la estructura precisa del canal, una vez que se forme un poro transitorio a través de la membrana, los gradientes osmóticos inducirán la inflamación celular, por lo tanto, facilitarán el adelgazamiento de la bicapa lipídica (146).



**Figura 5.** Mecanismo de rotura de los péptidos. (A) Modelo de barril. (B) Modelo de poro toroidal. (C) Modelo de alfombra. (D) Modelo poro toroidal desordenado. Adaptado de Sun (147).

Los PAMs se pueden clasificar en defensinas y las catelicidinas (5).

### 2.3.2 Defensinas

Las defensinas son péptidos catiónicos producidas principalmente por leucocitos y células epiteliales, de aproximadamente 30 amino ácidos (148) actúan en la inmunidad innata y adaptativa, contra las infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, se clasifican en dos subfamilias las  $\alpha$  defensinas que en presencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos actúan a través de actividades inmuno-modulativas incluyendo quimiotaxis, fagocitosis y citoquinas,

pero no presentan actividad inflamatoria, causan daños a tejidos que van a generar enfermedades progresivas (148–152).

Las  $\beta$ -defensinas, contienen 38 a 50 aminoácidos, son expresadas por células epiteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas, con actividad antimicrobiana de amplio espectro (148,153) contienen cisteína y se unen por puentes disulfuro (152,154).

### 2.3.3 Catelicidinas

Las catelicidinas pertenecen a la familia anfipática catiónica, son un grupo de péptidos que tienen propiedades contra bacterias, virus y hongos, además desempeñan múltiples funciones en el cuerpo humano, como acción anti-antimicrobiana (amplio espectro), la cicatrización de heridas, regulación del cáncer y algunas funciones proinflamatorias, además de actuar en los sistemas inmunológico, respiratorio, gastrointestinal y en la piel, es capaz de inducir cicatrización de heridas, angiogénesis y modular la apoptosis (150,155).

Se sintetizan en un dominio N-terminal que se compone de 29-30 aminoácidos altamente conservados y dominio antimicrobiano C-terminal. La catelicidina más importante es LL-37, producida por varias células epiteliales, leucocitos, células B, queratinocitos, melanocitos, neutrófilos, células de la médula ósea, mastocitos, glándulas salivales, entre otras. LL-37 se codifica en un gen que se encuentra en el cromosoma número 3, denominado hCAP18 (proteína precursora del péptido 18 antimicrobiano catiónico humano)(156). Este péptido se llamó LL-37, ya que comienza con dos leucinas y tiene una secuencia de 37 aminoácidos (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES). Es un péptido catiónico anfipático con una carga neta de +6 a pH neutro en soluciones acuosas, adopta una estructura  $\alpha$ -helicoidal, gracias a las concentraciones de sal fisiológica y el pH.

Tiene gran capacidad de eliminar bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, realizando una ruptura de la membrana bacteriana por la creación de poros toroidales en la superficie, lo que causa el flujo de salida de diversas moléculas de la célula (157), los péptidos de catelicidina podrían servir como una plantilla para el

desarrollo de nuevos antibióticos, especialmente a la luz de los descubrimientos recientes de que cada vez más bacterias se están volviendo resistentes a los antibióticos actuales.

La sustitución de los L-aminoácidos en la secuencia de los D-aminoácidos no produjo una pérdida del efecto antibacteriano. La actividad antibacteriana de LL-37 se deriva de su estructura secundaria. (155).

Hacer uso de modificaciones para el diseño de nuevos péptidos es una alternativa valiosa para controlar o eliminar la producción de biopelícula, por ejemplo, el diseño del enantiómero es una estrategia maravillosa que apunta a la resistencia de la proteasa, por que mejora la actividad biológica, incluida el antibiopelícula (158). Además, para mejorar la actividad antimicrobiana y la estabilidad fisiológica, varios estudios se han centrado en la modificación química de secuencias naturales, como el uso de aminoácidos en forma D (159). Estas características de diseño incluyen el uso de solo 9 de los 20 aminoácidos naturales (V, R, L, I, A, W, F, K, Q), 4 residuos cargados (más comúnmente R,K), 7 u 8 residuos hidrofóbicos, y no más de 1 glutamina (Q) (159). El uso de D-aminoácidos hace que estos péptidos sean resistentes a la proteasa, superando así una de las principales limitaciones de los péptidos catiónicos en forma de L, que son susceptibles de degradación por las proteasas del huésped enantioméricos D podrían usarse para tratar biopelículas, también se pueden usar otras modificaciones con D-aminoácidos como los D-tirosina, D-metionina, D-triptófano o D-leucina, que también inhiben la formación de biopelículas en *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (160,161).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Características de las muestras**

Se estudiaron una totalidad de 62 aislamientos clínicos provenientes de diferentes Hospitales de la ciudad de Bogotá, Colombia.

La identificación género y especie de los aislamientos clínicos, fueron realizados por cada una de las instituciones participantes y se confirmaron en este estudio por

PCR, identificando el ADN ribosomal 16s para *S. epidermidis* (31 aislamientos) y el gen *nuc* para *S. aureus* (31 aislamientos). Además, para verificar que los aislamientos presentaran una sola especie (pureza del aislamiento), se usó agar cromogénico BBL CHROMagar™, el cual indica que las colonias de color malva corresponden a *S. aureus* y de color transparente para *S. epidermidis*.

Para determinar la formación de biopelícula, los aislamientos y los controles se colocaron a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL que correspondía a 0.5 escala de McFarland.

En un estudio previo realizado por el grupo de investigación REMA, se determinó la presencia del operón *icaADBC* y la concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a los antibióticos OX: Oxacilina, GM: Gentamicina, VA: Vancomicina, C: Cloranfenicol, CIP: Ciprofloxacina, EM: Eritromicina, R: Rinfampicilina, SXT: Trimethoprim – Sulfametoxazol, TE: Tetraciclina, DA: Clindamicina, LZD: Linezolid, siguiendo las recomendaciones y el criterio de interpretación establecida por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico –CLSI.

Las cepas controles utilizadas fueron la *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. aureus* USA 300 como control positivo formadoras de biopelícula y *S. epidermidis* ATCC 12228 cepa no productora de biopelícula como control negativo.

Teniendo en cuenta esta observación se procedió a dar cumplimiento a cada uno de los objetivos propuestos de este trabajo.

### **Objetivo 1: Identificar aislamientos de *Staphylococcus spp.* de origen clínico con la capacidad de formación de biopelícula**

### **3.2 Determinación fenotípica para la producción de biopelícula mediante el método de Agar Rojo Congo (ARC)**

La formación de biopelícula se analizó mediante el método de Agar Rojo Congo (ARC), tal como lo describió Freeman et al (162). El cual permite que el reactivo rojo Congo identifique la matriz de exopolisacáridos formando un complejo con los carbohidratos no hidrolizados, generando zonas de oscurecimiento en las colonias

que tienen la capacidad de formar biopelícula (162). Las muestras y los controles se inocularon por triplicado y se incubaron por 24 y 48 horas a 37°C, posteriormente se realizó la lectura.

Las unidades formadoras de colonias de los aislamientos que tienen la capacidad de formar biopelícula se observan de color negro brillante de consistencia seca, las débilmente positivas tiene centro negro con bordes rosados y aquellas que no tienen la capacidad de formar biopelícula son de color rosado o rojas.

### **3.3 Determinación de la Formación de biopelícula por microplaca de 96 pozos**

Para verificar la producción de biopelícula, se utilizó la técnica descrita por Christensen y colaboradores en 1985 (163), agregando en placas de poliestireno por triplicado, 198µL de caldo infusión cerebro corazón (BHI), caldo BHI con Glucosa 1% y caldo BHI con NaCl 2% y 2 µL del inóculo a 0.5 escala de McFarland en cada una de las tres condiciones, posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C, este ensayo se repitió tres veces en las mismas condiciones.

Las placas fueron leídas en un lector de MicroElisa (TECAN INFINITE 200 PRO) por absorbancia, a una longitud de onda de 492nm y 570nm. Como control positivo formadoras de biopelícula *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. aureus* USA 300; como control negativo no formadora de biopelícula *S. epidermidis* ATCC 12228.

### **Objetivo 2: Determinar la presencia de las proteínas de Adhesión ClfA, ClfB, SdrC, FnbA, SdrG,SdrF, en los aislamientos a estudio**

### **3.4 Diseño de los primers para las proteínas de adhesión**

Se tomaron las siguientes secuencias reportadas en la base de datos del NCBI que reportaban en el genoma bacteriano las proteínas de adhesión ClfA, ClfB, SdrC, FnbA, SdrG,SdrF.

- Para *S. aureus*:
  - Mu50: *S. aureus* subsp. *aureus*. Mu50 NCBI: NC\_002758.2
  - USA300 *S. aureus* USA300\_FPR3757, NCBI: CP000255.1
  - MRSA252 *S. aureus* subsp. *aureus*. MRSA252 NCBI : BX571856.1
  - Mu3 *S. aureus* subsp. *aureus*. Mu3 DNA NCBI: NC\_009782.1
  - N315 *S. aureus* subsp. *aureus*. N315 DNA NCBI: BA000018.3
  
- Para *S. epidermidis*:
  - ATCC12228, *S. epidermidis*. GenBank: CP022247.1.
  - Cepa 1457 *S. epidermidis*. GenBank: CP020463.1
  - DAR1907 *S. epidermidis*. GenBank: CP013943.1

Posteriormente se utilizó el programa Multalin para obtener la secuencia consenso, a partir de esta, se realizó el diseño de los primers en el programa PRIMER3, que con características específicas para ser usados en PCR convencional y PCR en tiempo real:

- Porcentaje de Guanina, Citosina 45 – 55 %.
- Producto de amplificación no mayor a 220 pb.
- Primer con una longitud de no más de 23 pb.
- Tm de mínimo 59°C.

Para evaluar, la posible interacción de los primers se utilizó el programa PRIMER 3.0 y oligoAnalyzer 3.1.

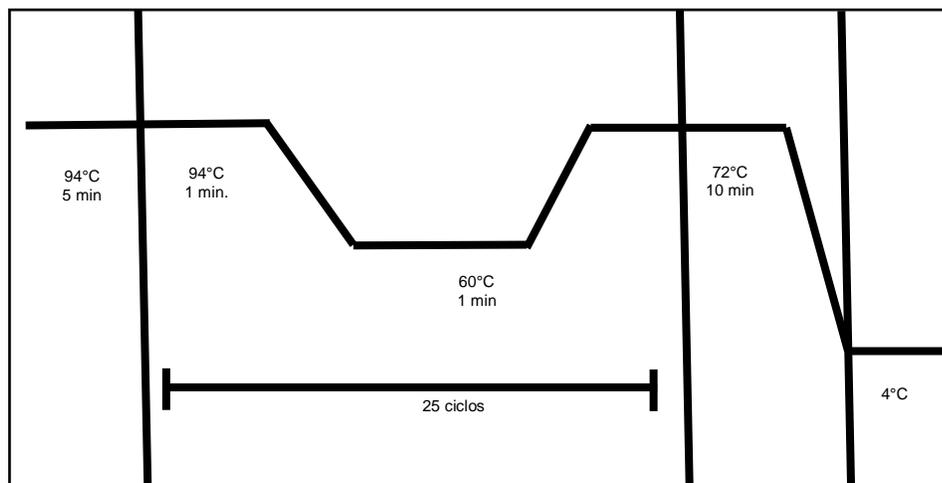
### 3.5 Identificación de la presencia de los genes

- I. **Extracción de ADN de los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis*:**

Para la extracción de ADN, las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* se incubaron por 24 horas a 37 °C en caldo BHI, luego se continuó siguiendo las instrucciones del fabricante mediante el kit (promega Wizard® Genomic ADN Purification Kit Technical Manual) y posteriormente se

cuantificó el ADN obtenido en NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers para verificar su concentración y pureza.

- II. **Amplificación de los genes en estudio: Se determino la presencia de los genes SdrC (148pb), SdrG (188pb) y SdrF (137pb) y los genes ClfA (155pb), ClfB (96pb) y FnbA (180pb) por PCR multiplex.** Para la amplificación la MasterMix fue: Buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 3Mm, dNTP's 0,2Mm, primers R/F 0,5Um/L, Taq polimerasa 0,25 U/μL. Con el siguiente protocolo figura 6.



**Figura 6.** Protocolo para PCR multiplex y PCR convencional. Muestras las condiciones en el termociclador empleadas para realizar en ensayo.

- III. **Visualización de los productos de amplificación:** se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con buffer de corrido al 1X (0.9 M Tris-Borato, 0.002 M EDTA pH 8.0). Se sembraron 5μL de cada amplicón y 3 μL del patrón de peso molecular HyperLadder IV 100bp en el gel y se corrió a un voltaje de 80V por 50 minutos. La tinción se hizo con GelRed Nucleic Acid Stain 10000X, la presencia de los genes se observó en el transiluminador BIORAD Universal Hood II.

### **Objetivo 3: Determinar la inhibición de la biopelícula con los diferentes péptidos análogos al LL-37 en aislamientos de *Staphylococcus spp*.**

#### **3.6 Diseño de Péptidos**

A partir de un trabajo de investigación anterior realizado por nuestro grupo de investigación REMA (de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y de la Universidad Nacional de Colombia en Colombia) en convenio con la Universidad University British Columbia de Canadá se seleccionó uno de cuatro péptidos análogos del LL-37 péptido de la catelicidina humana (secuencia original) diseñados en ese trabajo, se seleccionó el denominado LL37-1 ya que reportaba actividad antibiopelícula moderada (artículo enviado a publicación Revista Peptides), este péptido fue sintetizado con el grupo amino libre y el grupo carboxilo en forma de amida. Por esta razón y para tratar de potenciar esta actividad biológica, se decidió generar tres modificaciones a partir de esta secuencia (Tabla 2). Para este trabajo se usó el denominado LL37-1 para generar las nuevas secuencias de péptidos, se generó el primer péptido análogo a LL37-1, denominado ACLL37-1, se eliminó G (Glicina) y se acetiló el grupo N-terminal, ambos péptidos se sintetizaron con amidación en C-terminal, el segundo se denominó ACLL37-2 por su cambio al acetilar el grupo amino terminal de la secuencia completa del LL37-1, finalmente, para el tercer análogo se utilizó nuevamente la secuencia del péptido LL37-1, pero este se acetiló el grupo amino y se cambió la fenilalanina (F) de L a D.

**Tabla 2:** Secuencias de péptidos diseñados con actividad anti-biopelícula.

Nombre	Secuencia
LL37 original	<u>LLGDFFRKSK</u> <u>KEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPR</u> <u>TES</u>
LL37-1	<b>G</b> <u>RKSAK</u> <u>KIGKR</u> <b>A</b> <u>KRIVQRIKDFLR</u> Amino libre                      Amidación (C-terminal)
ACLL37-1	<b>-RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR</b> <b>Acetilación (N-terminal)</b> Amidación (C-terminal)
ACLL37-2	<b>G</b> <u>RKSAK</u> <u>KIGKR</u> <b>A</b> <u>KRIVQRIKDFLR</u> <b>Acetilación (N-terminal)</b> Amidación (C-terminal)
DLL37-1	(d-PHE) <b>G</b> <u>RKSAK</u> <u>KIGKR</u> <b>A</b> <u>KRIVQRIKD</u> (d-F)LR <b>Acetilación (N-terminal)</b> Amidación (C-terminal)

Subrayado se encuentran las secuencias del LL37 nativas que se conservaron y en negrilla en rojo los aminoácidos que se cambiaron.

### 3.6.1 Síntesis de péptidos

Una de las estrategias para la Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS siglas en inglés), consiste en la elongación de la cadena peptídica, sobre una matriz sólida a la cual se le va adicionando sucesivamente aminoácido por aminoácido hasta la formación de una cadena peptídica (164), el método denominado Fmoc/tBu utiliza protección en el grupo amino de los aminoácidos con el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) y el tert-butil (tBu) en las cadenas laterales (165). Se utiliza una resina rink-amida 4-MBHA como soporte para unir el primer aminoácido por el grupo carboxilo, se desbloquea el aminoácido del grupo Fmoc por tratamiento con 20% de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF) para continuar pegando más aminoácidos hasta completar la secuencia del péptido a sintetizar. Las reacciones de acople de los aminoácidos se realizaron con exceso molar de hexafluorofosfato de 2- (1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y oxyma® en DMF. El reactivo N,N- diisopropiletilamina (DIPEA) se utilizó como neutralizador *in situ*. Los pasos de desprotección y acoplamiento se controlaron mediante prueba de ninhidrina. Al final de la síntesis se retiran los grupos protectores de las cadenas laterales y se libera el péptido de la resina (164).

### 3.6.2 Pureza de los péptidos

La pureza de los péptidos análogos al LL37 (LL37-1, ACLL37-1, ACLL-37-2 y DLL37 -1), se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando una columna y por espectrometría de masas. Los péptidos se purificaron mediante columnas C-18 PSE (phase solid extraction) usando columnas pequeñas con aproximadamente 500mg para purificar cantidades aproximadas de 5 mg de péptido con diferentes porcentajes de acetonitrilo (10 a 40% ACN), posteriormente se analizaron en una columna C-18 analítica en un gradiente utilizando como solventes: (A) H<sub>2</sub>O con ácido trifluoroacético (TFA) 0.065% (v/v) y (B) acetonitrilo (ACN) que contenía 0,05% TFA (v/v), el gradiente utilizado fue de 15-70% durante 15 minutos a un flujo de 1 mL /min, la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 220 nm se utilizó para detección del enlace peptídico. El peso molecular de los péptidos purificados se determinó por espectrometría de masas a la fracción de pico principal del cromatograma usando un espectrómetro de masas interfase MS-ESI, las condiciones de toma de espectro fueron: flujo de gas de nebulización 1.5L/min, temperatura CDL 250°C, Temperatura de bloque 200°C y sesgo de interfase (interfase Bias) de +4.5kV, flujo de gas de secado 5L/min, flujo T 0,2mL/min y concentración de B 50% de agua/50% de MeOH.

### 3.6.3 Dicroísmo circular (DC)

La estructura secundaria preferencial de los péptidos se determinó por dicroísmo circular en un espectropolarímetro JALISCO-J-810, a una concentración de 200  $\mu$ M, en Trifluoroetanol (TFE) al 30%, el equipo se calibró con ácido d-10-camforsulfónico, el cual tenía un termostato conectado a un baño refrigerante a 22 °C con celdas de cuarzo cilíndricas de 0,01 cm de paso de luz, con una velocidad de 0.7 nm/segundo, ancho de banda 1 nm, rango de 190-260 nm y un barrido de 20 nm/min. Para obtener el espectro se corrige la línea base eliminando el espectro del solvente por substracción, el valor de absorción experimental se expresa en milésimas de grado y se transforman en valores de elipticidad molar mediante la

ecuación:  $[\Theta] MR = 3.298\Theta / C \cdot l$  donde  $\Theta$  es elipticidad, C es la concentración (gr/mL), y l es la longitud del paso de luz en la celda en cm (202).

### 3.6.4 Actividad biológica de los péptidos

Para determinar la capacidad que tienen los péptidos de lisar la célula se llevaron a cabo ensayos de actividad hemolítica y citotóxica.

#### 3.6.4.1 Efecto Hemolítico de los péptidos sintetizados

La actividad hemolítica de los péptidos sintetizados se evaluó sobre glóbulos rojos humanos del grupo sanguíneo O positivos al 3% en solución salina al 0.9% (Baxter, Colombia). Se analizaron 5 diluciones de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 a una concentración final de 10, 7.5, 5, 2.5 y 1.25  $\mu\text{M}$  en tres replicas independientes, a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por pozo, se empleó, como control negativo glóbulos rojos sin péptido (no expuestos) que corresponden al 0% de hemólisis y como control positivo eritrocitos lisados con Tritón al 20% (realiza rompimiento de membrana en los glóbulos rojos). Se incubaron en placas (Greiner Bio-one fondo U, USA) durante 24, 48 y 72 horas a 37°C (202).

Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos, posteriormente se tomó 70  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes y se midió a una absorbancia de referencia de lectura a 540 nm, en un lector de placas de EISA Thermo Scientific IEMS / MULTISKAN EX, para calcular posteriormente, el porcentaje de hemólisis, empleando la siguiente formula:

$$\% \text{ Hemolisis: } \frac{\text{células expuestas} - \text{Control negativo}}{\text{Control positivo} - \text{control negativo}} * 100$$

#### 3.6.4.2 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados

El efecto citotóxico de los péptidos se evaluó sobre fibroblastos L929, los fibroblastos son característicos del tejido conectivo, esta línea celular fue cultivada

en medio DMEN (Invitrogen) en un frasco para cultivo celular a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia entre el 80-90%. Las células adheridas se desprendieron con un rastrillo y se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, posteriormente se realizó conteo celular en cámara de Neubauer. En placas de 96 pozos se sembraron 21.000 células/pozo contenidas en 100 µL de medio DMEN (Invitrogen), se dejaron por 24 horas a 37°C para permitir su adherencia, luego se retiró el medio de cultivo DMEN y se adicionó cada uno de los péptidos LL37-1, AC LL37-1, AC LL-37-2 y D LL-37-1 a una concentración de 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µM en un volumen final de 100 µL por pozo, se incubaron durante 24, 48 y 72 horas a 37°C, posterior a esto se le agregó 50 µL de reactivo XTT, la placa se incubó a 37°C durante 2 a 4 horas, luego se agitó durante 15 segundos y se leyó en un Lector ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) utilizando 450nm como filtro primario y 620nm como filtro diferencial.

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{Células no tratadas} - \text{células tratadas}}{\text{Células tratadas}} * 100$$

### 3.6.6 Efecto de los péptidos sobre la formación de la biopelícula

Siguiendo el protocolo mencionado anteriormente para formación de biopelícula por microplaca de 96 pozos, se analizaron por conveniencia y por triplicado, 17 aislamientos de *S. epidermidis* de los cuales 15 eran formadoras de biopelícula, dos no formadoras de biopelícula y una cepa sensible a todos los antibióticos y 19 aislamientos de *S. aureus* formadoras de biopelícula, todas las cepas presentaban al menos resistencia a un antibiótico. Los aislamientos y los controles (control positivo formadoras de biopelícula *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. aureus* USA 300; como control negativo no formadora de biopelícula *S. epidermidis* ATCC 12228).

Se cultivaron en caldo BHI con glucosa al 1% con tiempos de incubación de 2, 4, 6, 12 y 24 horas a 37°C en presencia de los péptidos, LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 a una concentración final de 5µM. Las placas fueron leídas en un lector

de MicroElisa (TECAN INFINITE 200 PRO) por absorbancia, a una longitud de onda de 492nm y 570nm.

### **3.6.7 Efecto de los péptidos sobre el crecimiento bacteriano**

Los mismos aislamientos y controles (control positivo formadoras de biopelícula ATCC 35984 y USA 300; como control negativo no formadora de biopelícula ATCC 12228).

fueron analizados por triplicado en caldo LB en presencia de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 a concentración final de 5, 2.5, 1.25 y 0.62  $\mu$ M, en escala 0,5 de McFarlan; realizando una medición espectrofotométrica cada hora a 620 nm durante 24 horas en el equipo Bioscreen C, el cual realizó mediciones de la densidad óptica cada hora, en agitación constante a 37°C.

### **3.6.8 Amplificación por PCR en tiempo real**

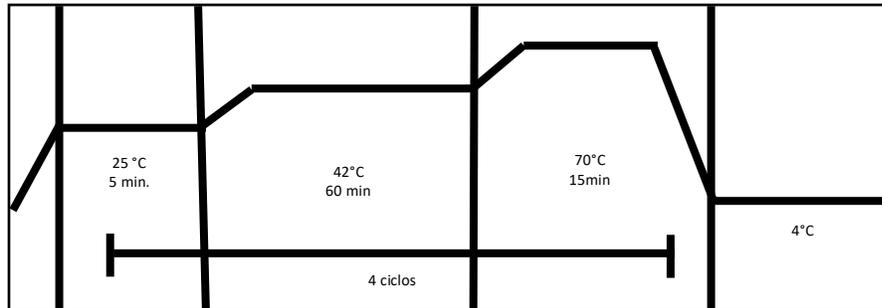
Para el ensayo de PCR en tiempo real se usaron los péptidos LL37-1 y DLL37-1 a una concentración de 5 $\mu$ M de los genes ClfA, FnbA, SdrC, SdrG y SdrF que conforman las proteínas de adhesión MSCRAMM. se tomó un aislamientos de *S. epidermidis* (aislamiento 1) y un aislamientos de *S. aureus* (aislamiento 21).

### **3.6.9 Extracción de RNA**

Se tomó 1.5 mL del cultivo bacteriano que se encontraba en caldo LB con cada uno de los péptidos a estudio LL37-1, ACLL37-1; ACLL37-2 y DLL37-1, a una concentración de 5  $\mu$ M, con un periodo de incubación de 8, 10 y 12 horas a 37 °C, luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano se suspendió con 60  $\mu$ L de Lisozima/Lisostafina a una concentración de 25mg/ml de Lisozima y 2mg/ml de Lisostafina, 40  $\mu$ L de Buffer lisis y 50  $\mu$ L de Proteínasa K a una concentración de 25 U/ml, e incubado a 37°C por 4 horas.

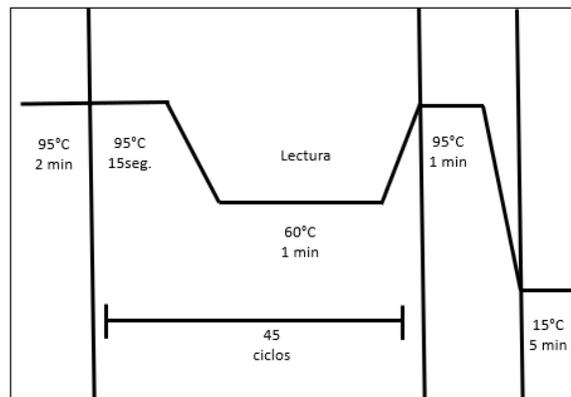
Después se dio inició al protocolo de extracción de RNA por el método de Trizol® Max™ y el método de Chomczynski (166).

**Síntesis de cDNA (RT-PCR):**, se cuantificó en el equipo Nanodrop Tecno científico 2000 y se tomó 2µL que equivale al  $10^2 - 10^{10}$  copias de la plantilla de ARN y se siguió el protocolo del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System de PROMEGA que se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Protocolo de amplificación para Síntesis de cDNA.

**Expresión de los genes:** la PCR en tiempo real para el análisis de expresión de las proteínas de adhesión ClfA, FnbA, SdrC, SdrG y SdrF, se llevó a cabo en el equipo BioRad CFX96 Touch™ Real Time PCR System en el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud Distrital de Bogotá, utilizando el kit GoTaq Qpcr Master Mix de Promega de acuerdo a las indicaciones del fabricante y aplicando el protocolo de amplificación que se muestra en la figura 8, con los péptidos LL37-1 y D LL-37 -1 a una concentración final de 5µM, usando como controles la USA300, ATCC12228, ATCC 35984 y como Genes Housekeeping *gyrB* y 16S.



**Figura 8.** Protocolo de amplificación para detección de genes por medio de PCR en tiempo real

### 3.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 19,0. La determinación de concordancia de rojo Congo: el índice Kappa. La clasificación de la producción de biopelícula según método Christensen: coeficiente de correlación de Tau-b-Kendal. La relación entre la resistencia a los antibióticos y la formación de biopelícula: Ji al cuadrado y prueba de Fisher.

Diferencia de medias de crecimiento global entre las cepas con y sin tratamiento microplaca de 96 pozos y Diferencia de medias entre cada péptido y uso de no péptido en el crecimiento bacteriano: Bonferroni con un intervalo de confianza de IC 95% y para la qPCR se utilizó el modelo matemático por Pfaffl y colaboradores en el año 2001(167).

## 4. Resultados

Para este estudio se analizaron 62 aislamientos provenientes de hemocultivos con 28 muestras (45.1%), de secreciones 27 muestras (43.5%) y finalmente 7 muestras sin dato (11,4%), de diferentes Hospitales de la ciudad de Bogotá, Colombia.

Para conocer la resistencia que presentaba cada uno de los aislamientos, se realizó la concentración mínima inhibitoria para once antibióticos, lo cual demostró que cuatro (6.5%) aislamientos no presentaron resistencia a ningún antibiótico, 58 (93.5%) aislamientos fueron resistentes al menos a un antibiótico, para el *S. aureus* la resistencia a la oxacilina fue del el 100% de y en *S. epidermidis* del 64.5%.  
Tabla3.

**Tabla 3:** Resistencia a los antibióticos en los aislamientos analizados (%)

Resistencia de las cepas expresada en porcentaje (%) n:62		
Antibiótico	<i>S. epidermidis</i> n:31	<i>S. aureus</i> n:31
Oxacilina	64	100
Gentamicina	87	23
Vancomicina	3	0
Cloranfenicol	0	3
Ciprofloxacina	50	39
Eritromicina	77,4	45
Rifampicina	17	7
Trimetropin Sulfa	27	0
Tetraciclina	61	26
Clindamicina	84,20	100
Linezolid	0	0

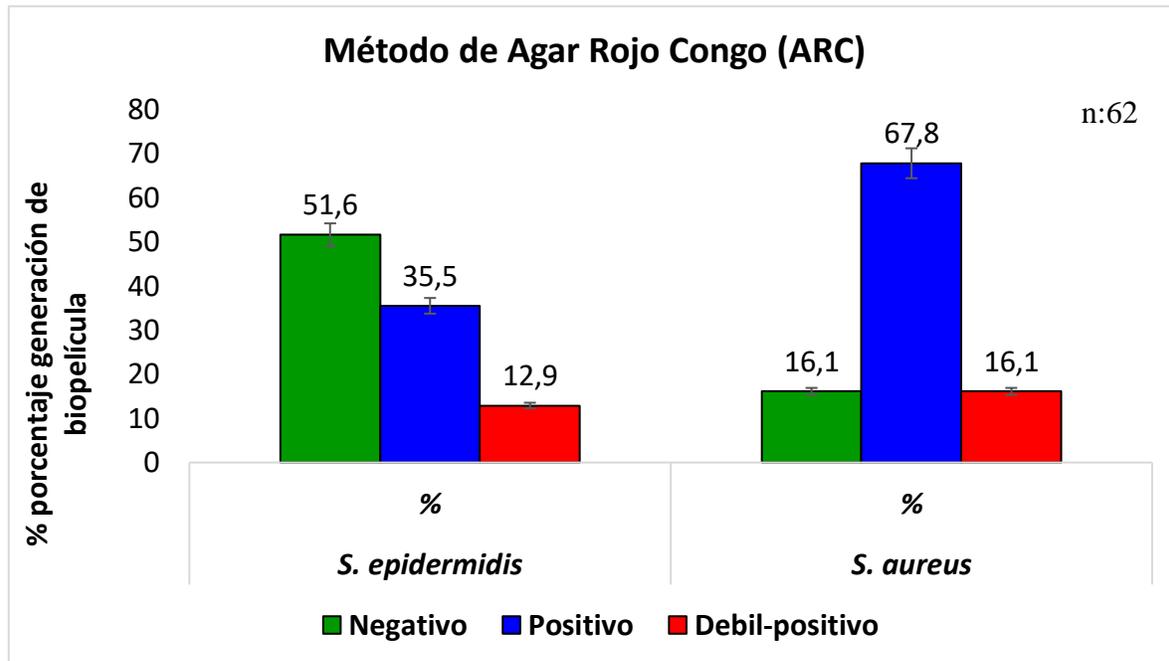
### **Objetivo 1: Identificar aislamientos de *Staphylococcus spp.* de origen clínico con la capacidad de formación de Biopelícula**

Para establecer la capacidad de formación de biopelícula en cada uno de los aislamientos se realizó como método cualitativo el agar de Rojo Congo y como método cuantitativo se usó la microplaca de 96 pozos.

#### **4.1.1 Determinación fenotípica para la producción de biopelícula mediante el método de Agar Rojo Congo (ARC)**

Se tomaron los aislamientos a estudio y los controles por triplicado, la distribución de resultados para la prueba de Rojo Congo fue positiva para los *S. aureus* en el 67.8% en comparación con los *S. epidermidis* que fue del 35.5% ( $p=0,011$ ) figura

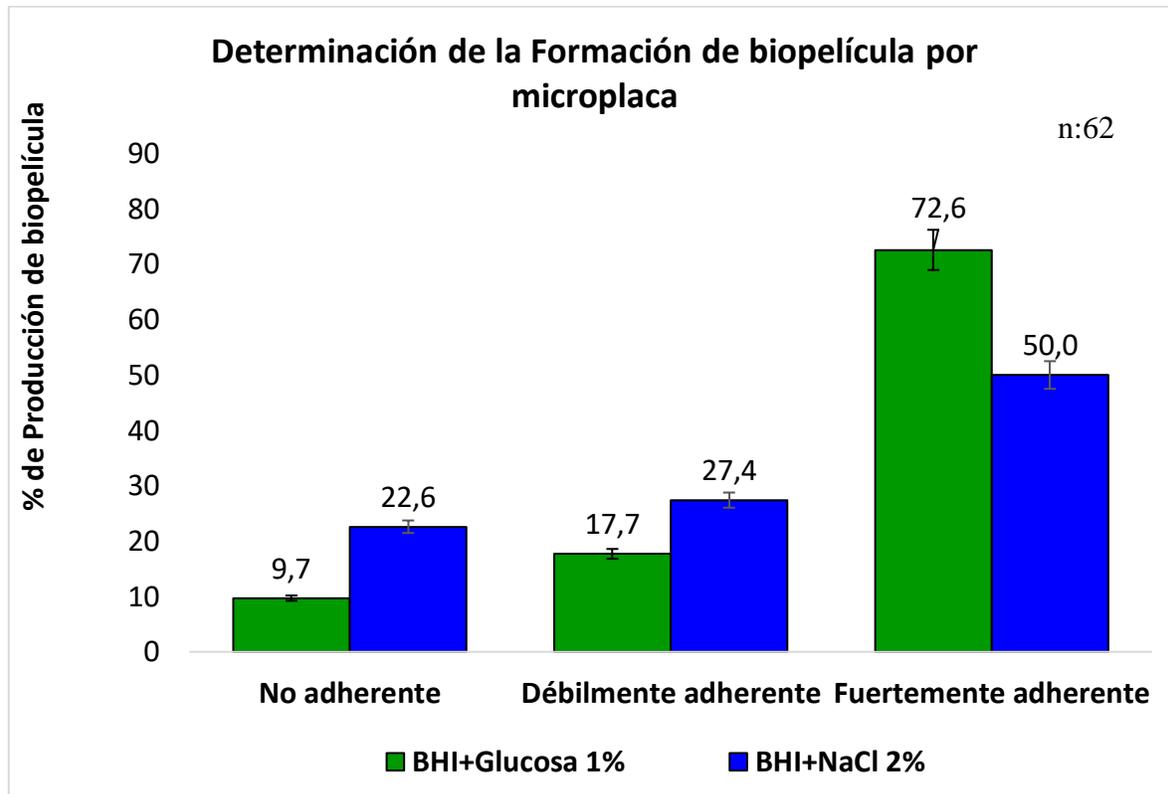
9.



**Figura 9.** Distribución de los resultados de la prueba de Agar Rojo Congo, los resultados muestran que los aislamientos clínicos de *S.aureus* (67.8%) presentan mayor capacidad de generar de biopelícula en comparación con el *S.epiermidis* (35.5 %).

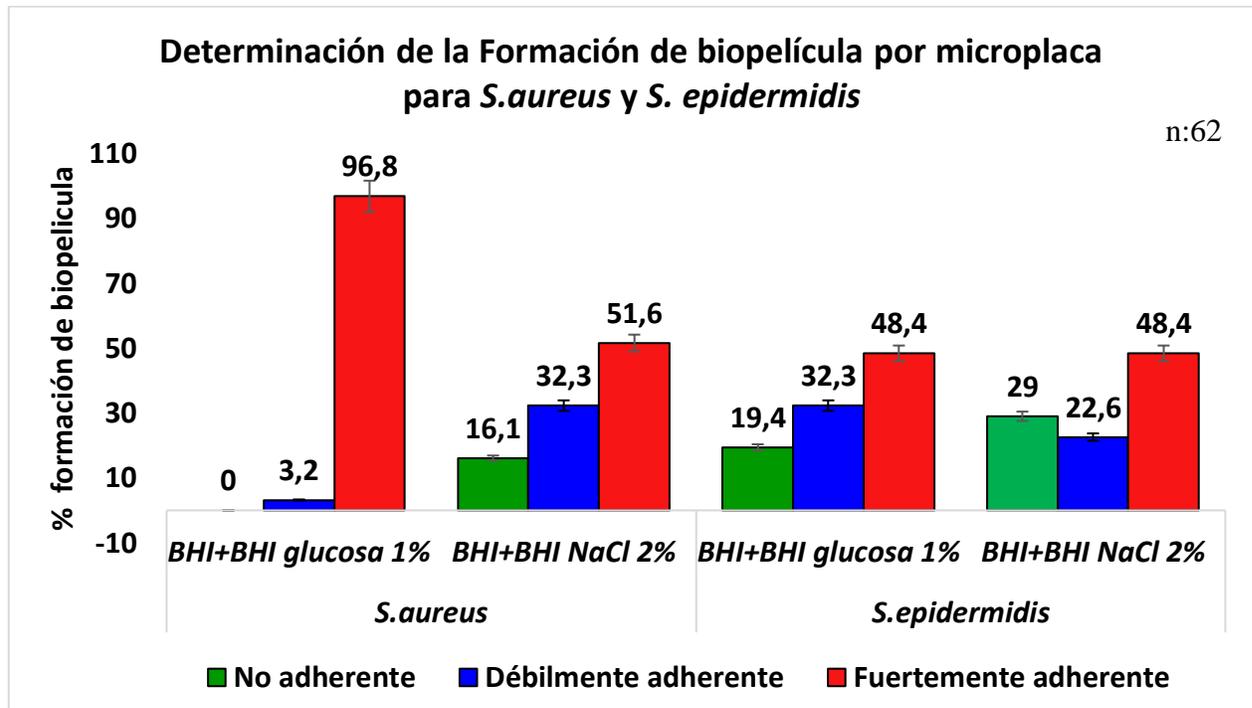
#### 4.1.2 Determinación de la Formación de biopelícula por microplaca de 96 pozos

Los aislamientos se incubaron por 24 horas a 37°C en microplaca de 96 pozos, se obtuvo como resultado el coeficiente de correlación que determina la formación de biopelícula en los *Staphylococcus* según el método de Christense, quien mediante el uso de la densidad óptica mide la biopelícula que se genera en la microplaca la cual es teñida con el reactivo cristal violeta, lo que permitió clasificar la asociación entre la presencia de BHI con glucosa al 1% y NaCl al 2%, se obtuvo un valor  $p \leq 0.001$  figura 10.



**Figura 10.** Formación de la biopelícula según método Christensen para cepas de *Staphylococcus spp.* donde la generación de la biopelícula se incrementa cuando el medio es suplementado con glucosa 1% (72.6%).

En los *S.aureus* el 96.8% fueron fuertemente formadoras de biopelícula en presencia BHI+glucosa al 1%, el valor p no se pudo establecer por la ausencia de cepas no formadoras de biopelícula. En *S. epidermidis* no hubo diferencia en la clasificación de fuertemente adherente en la presencia de BHI+glucosa al 1%, y NaCl 2%, figura 11.



**Figura 11.** Formación de la biopelícula según método Christensen para cepas de *S.aures* y *S.epidermidis*. Donde los aislamientos clínicos de *S.aures* presenta un 96.8% de generación fuerte de biopelícula cuando se suplemento con glucosa 1%, para aislamientos clínicos de *S.epidermidis* presento 48.4% en las mismas condiciones.

**Objetivo 2:** Determinar la presencia de los genes *ClfA*, *ClfB*, *SdrC*, *FnbA*, *SdrG*, *SdrF*, que forman parte de las proteínas de adhesión MSCRAMM

## 4.2 Secuencias de los Primers

Se obtuvieron las secuencias de los primers para las proteínas de adhesión *ClfA*, *ClfB*, *FnbA*, *SdrG*, *SdrC*, *SdrF*, después de realizar los análisis bioinformáticos tabla 4. Se evaluaron 17 aislamientos clínicos de *S.epidermidis* y 19 de *S.aureus*, (n:36).

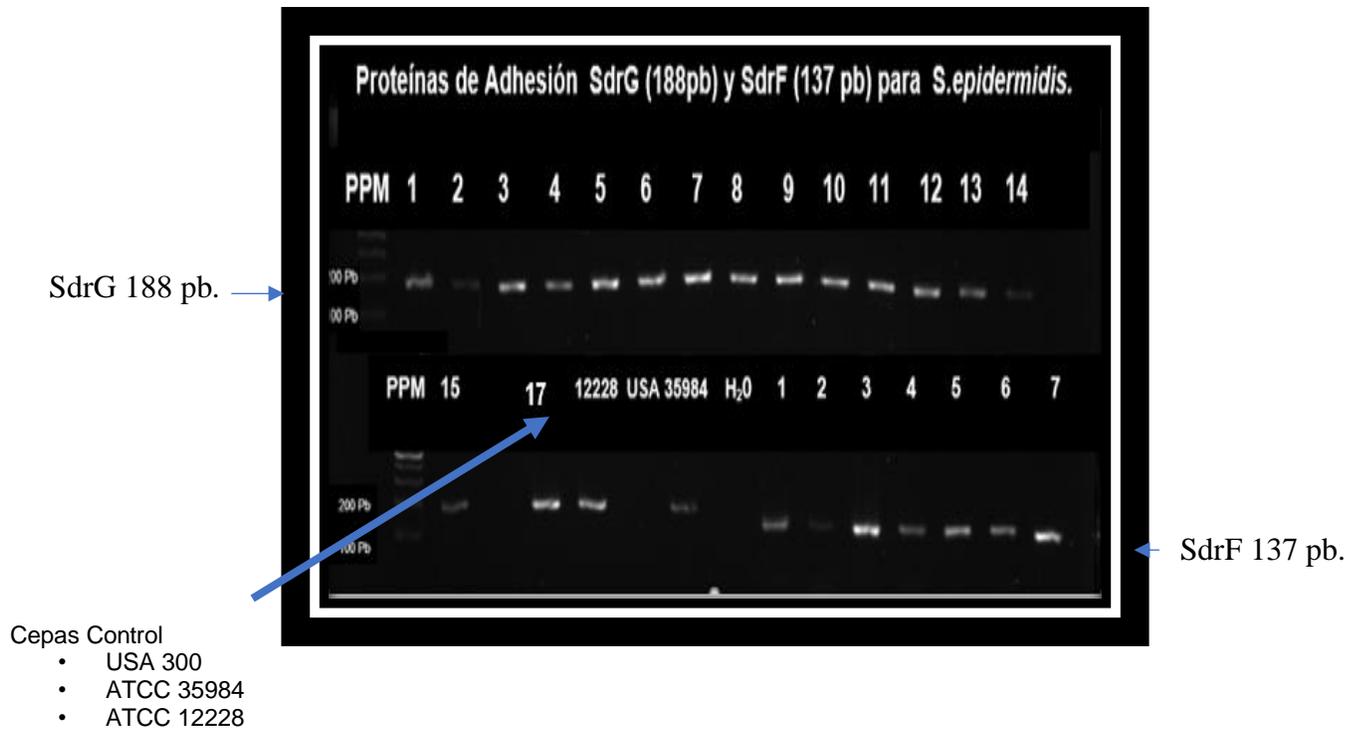
**Tabla 4:** Secuencias de Primers

Nombre	Secuencia	Long	Tm	%GC	Tamaño pb	Gen
<b>clfA-F</b>	TGCTGCACCTAAAACAGACG	20	60.05	50.00	155	<b>clfA</b>
<b>clfA-R</b>	CAGTTACCGGCGTTTCTTCC	20	61.89	55.00		
<b>clfB-F</b>	AGCATTACTACCGGTTTCAGCA	22	60.03	45.45	96	<b>clfB</b>
<b>clfB-R</b>	CCACAAACGATTTCCAATGCGC	22	61.79	50.00		
<b>SdrC-F</b>	CCGTTTCTACTGGCAATGCT	20	60.27	50.00	148	<b>SdrC</b>
<b>SdrC-R</b>	GTTACATTGCCAACGCCTTT	20	60.00	45.00		
<b>FnbA-F</b>	TACCGCTATTTTGGCCACCT	20	61.71	50.00	180	<b>FnbA</b>
<b>FnbA-R</b>	AGCATGGTCAAGCACAAGGA	20	61.71	50.00		
<b>SdrG -F</b>	TCGCCATCAACTAACGCTCAA	21	60.34	47.62	188 pb	<b>SdrG-fibrinógeno</b>
<b>SdrG -R</b>	CCCTGTTTCAGCAAGTTCGTC	20	59.13	55.00		
<b>SdrF- F</b>	GGACGATTACACGACGATACAGC	23	62.97	52.17	137 pb	<b>S. epidermidis SdrF</b>
<b>SdrF- R</b>	GCAAGTCACCTTGTCTTGACCT	23	64.01	52.17		

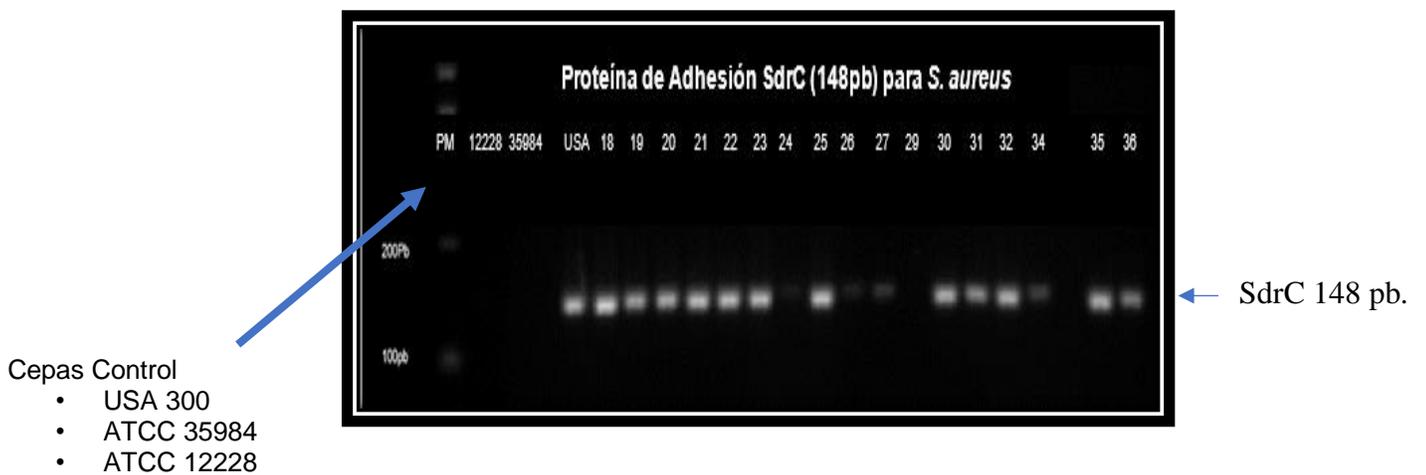
**Tabla 4:** Para las secuencias de primers obtenidas para las proteínas de adhesión *ClfA*, *ClfB*, *FnbA*, *SdrG*, *SdrC*, *SdrF*. Los cuales presentaban secuencias entre 96 y 188 pb, con una relación Guanina-citosina superior al 45% y una temperatura de fusión (Tm) entre 45 y 55 °C.

### 4.3 Identificación de genes

Se realizó la extracción de ADN, posteriormente la PCR y los productos que resultaron de la amplificación de los genes, *SdrG*, *SdrF* y *SdrC*, y las proteínas de adhesión *FnbA*, *ClfA* y *ClfB*, (realizados mediante una PCR múltiple) se muestran en las figura12-14.



**Figura 12.** Proteínas de adhesión SdrG los cuales muestran una banda de 188pb y SdrF los cuales muestran un tamaño de 137pb en aislamientos clínicos de *S. epidermidis*.

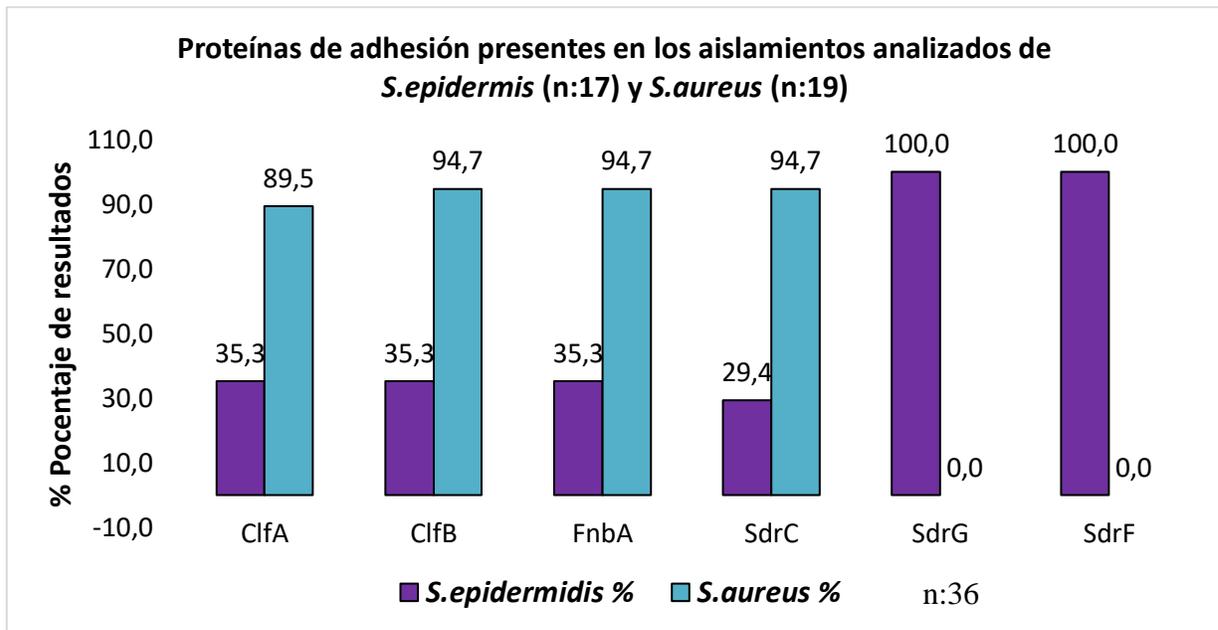


**Figura 13.** Proteínas de adhesión SdrC con un tamaño de 148 pb para *S. aureus*.



**Figura 14.** Proteínas de adhesión FnbA con un tamaño de 180pb, ClfA con 155 pb y ClfB de 96 pb para *S. aureus*.

El porcentaje de cada uno de los genes presentes en las cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* después de analizar todos los productos de amplificación, figura 15.



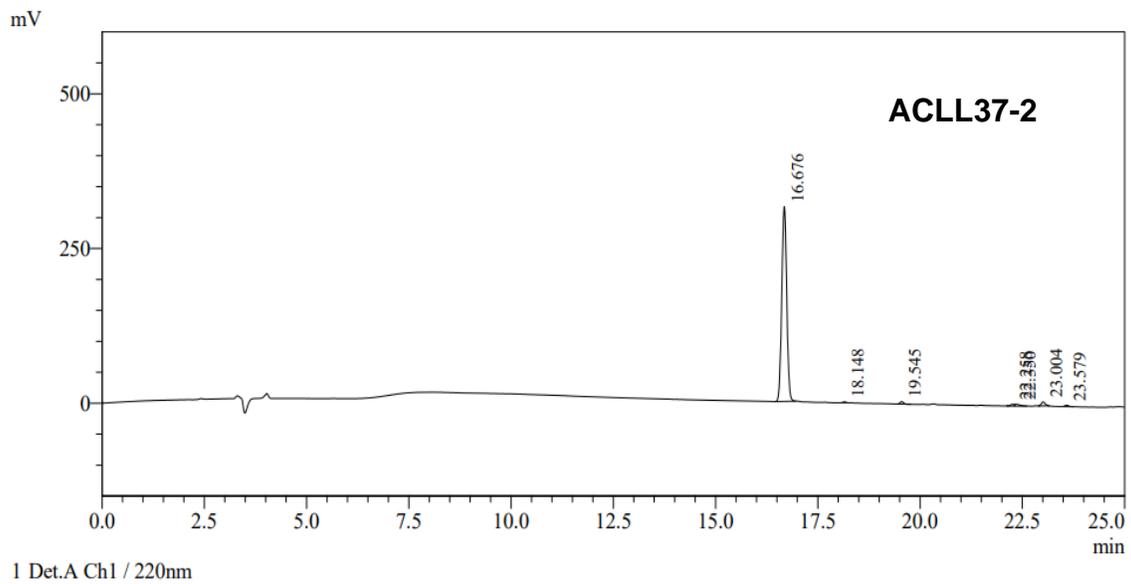
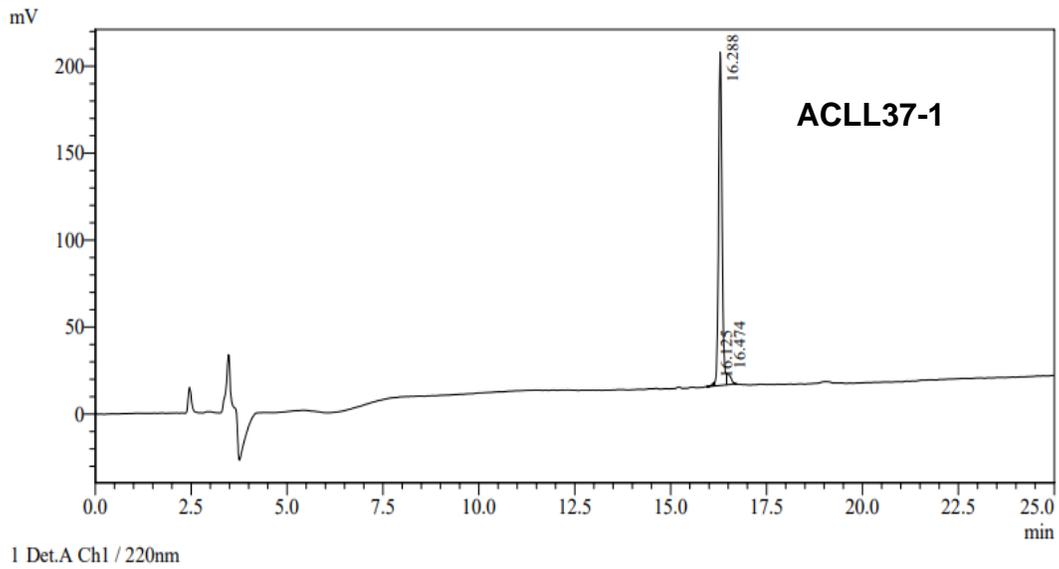
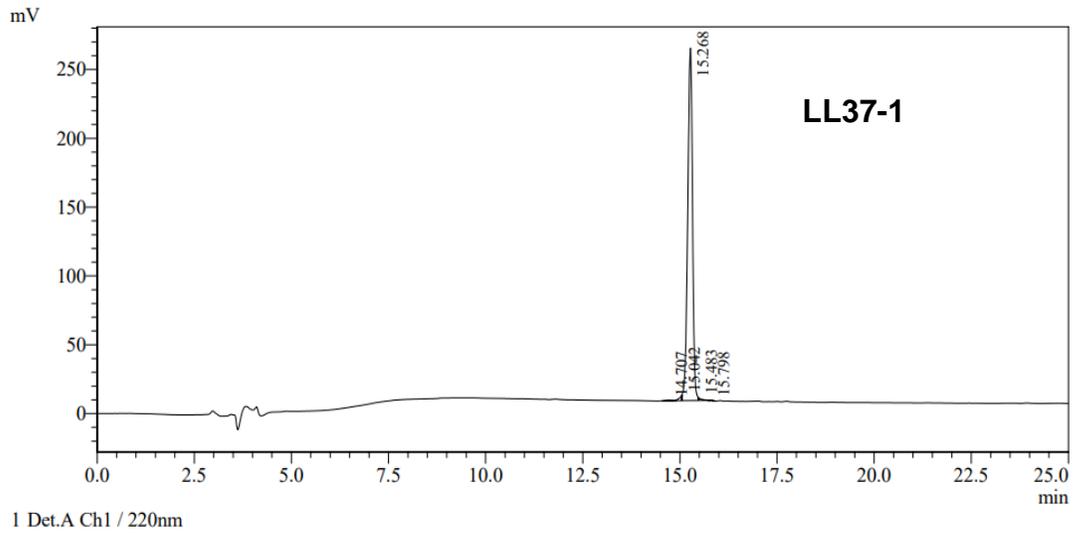
**Figura 15.** Aislamientos clínicos positivos para proteínas de adhesión, donde se muestra las proteínas de adhesión presentes en los aislamientos analizados de *S.epidermidis* y *S.aureus*.

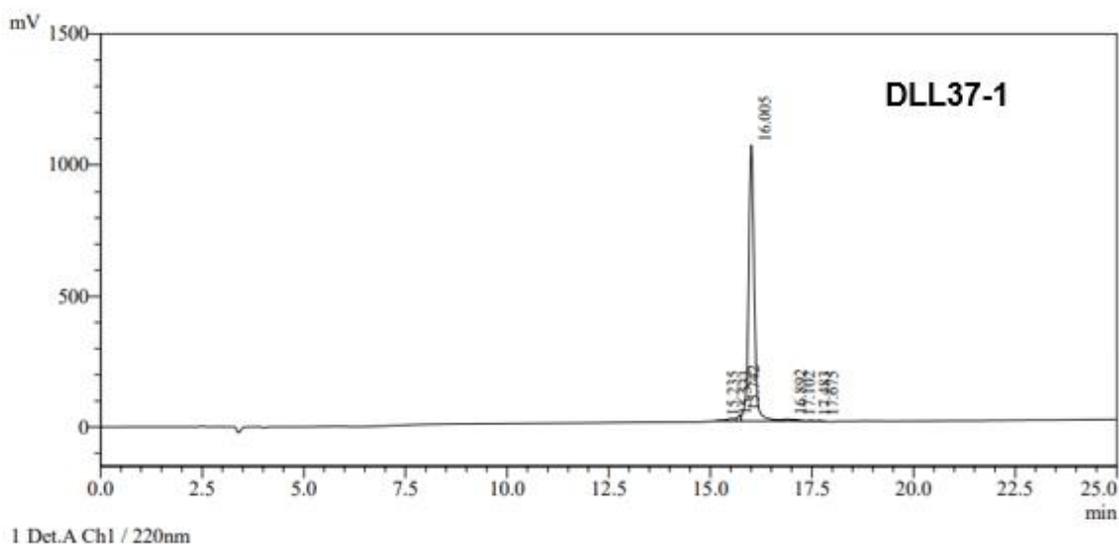
### **Objetivo 3: Analizar la capacidad de inhibición de la biopelícula de diferentes péptidos análogos al LL-37 en aislamientos de *Staphylococcus spp*.**

#### **4.3.1 Secuencias de Péptidos**

La secuencia nativa del péptido que se usó como plantilla de la catelicidina humana denominada péptido LL-37 por su inicio con dos lisinas y su longitud en aminoácidos LLGDFFRKSKEK**IGKEFKRIVQRIKDFLR**NLVPRTES, dio origen en un estudio previo (por publicar) al diseño de varios péptidos con actividad antibiopelícula; a partir de uno (1) de estos análogos: el péptido llamado en este trabajo péptido LL37-1 (GRK**SAK**IGK**RA**KRIVQRIKDFLR) donde se resalta en negro la región del péptido nativo de la catelicidina y los cambios en los análogos ya estudiados. En este trabajo se quiso potenciar esta actividad haciendo algunos cambios en la secuencia y determinando nuevamente sus características estructurales, su actividad antibiopelícula, toxicidad y efectos citotóxicos a tres (3) nuevos análogos. En la tabla 5 se resumen la secuencia y cambios generados (color rojo). Los cambios a los tres análogos de este estudio se detallaron en la metodología sección 3.6. En el primer péptido generado tiene menos carga positiva para dejarlo en el rango de carga 3-9 de la mayoría de los péptidos antimicrobianos reportados en la literatura y ver su efecto de carga en la actividad lo cual se vio que fue un cambio adecuado como veremos más adelante en las pruebas biológicas de este análogo. El segundo se eliminó una glicina en el grupo amino del péptido que generalmente está asociado a una característica que comparten los péptidos antimicrobianos para ver si esto favorece la actividad antibiopelícula y el cambio en la presentación en derivado acetilado en el aminoácido 1 puede favorecer también la interacción del péptido con la membrana de la bacteria lo cual no se pudo comprobar por los resultados biológicos de esta molécula esto también se vio en el diseño del péptido 3, por el contrario los cambios en el péptido 4 sí que se mostraron favorables a la actividad antibiopelícula al generar acetilación en el amino y la







**Figura 16.** Cromatografía de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1.

La determinación de los pesos moleculares de los péptidos se realizó mediante espectrometría de masas por ionización por electroespray (MS-ESI). Las condiciones para toma de espectros de masas fueron especificadas en metodología 3.6.2, figura 17. Todos los pesos moleculares corresponden a la especie esperada y confirman la pureza del producto. Se analizan los espectros de masas de los tres péptidos diseñados en este trabajo.

El espectro número 2 **ACLL37-1** indica que el peso molecular teórico es  $M=2944,54$  entonces:

- Pico 1473,20 corresponde al ión  $[M]+2/2$
- Pico 982,40 corresponde al ión  $[M]+3/3$
- Pico 737,10 corresponde al ión  $[M]+4/4$
- Pico 589,95 corresponde al ión  $[M]+5/5$
- Pico 491,75 corresponde al ión  $[M]+6/6$
- Pico 421,65 corresponde al ión  $[M]+7/7$

Con estos datos se comprueba que el PM del péptido es 2944,54 que correspondería al PM esperado.

El espectro 3 indica que el peso molecular teórico es  $M=2894,53$  entonces:

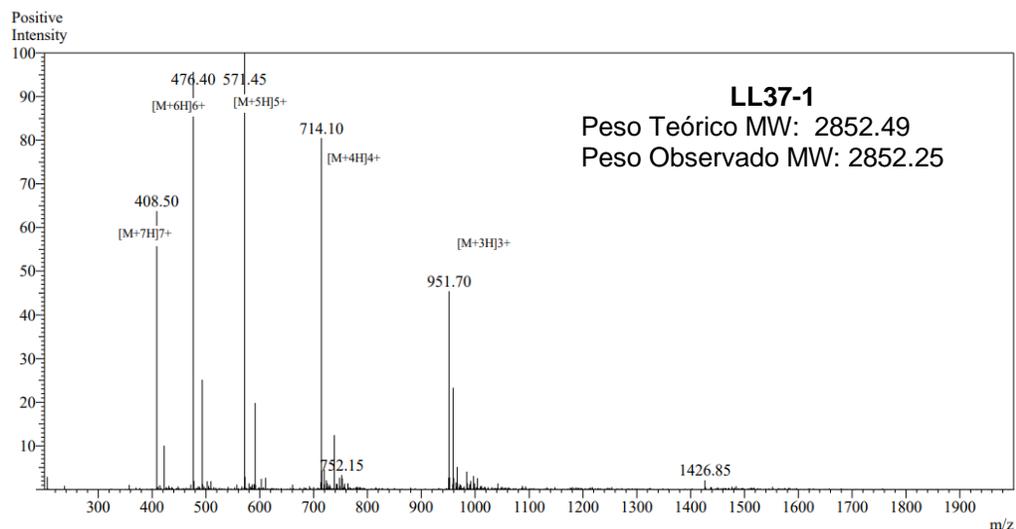
- Pico 1448,05 corresponde al ión  $[M]^{+2/2}$
- Pico 965,70 corresponde al ión  $[M]^{+3/3}$
- Pico 724.50 corresponde al ión  $[M]^{+4/4}$
- Pico 579,85 corresponde al ión  $[M]^{+5/5}$
- Pico 483,35 corresponde al ión  $[M]^{+6/6}$
- Pico 414,45 corresponde al ión  $[M]^{+7/7}$
- Pico 362,85 corresponde al ión  $[M]^{+8/8}$

Con estos datos se comprueba que el PM del péptido es 2894,53 corresponde al PM esperado para este péptido.

El espectro 4 indica que el peso molecular teórico es  $M=3041,71$  entonces:

- Pico 1521,50 corresponde al ión  $[M]^{+2/2}$
- Pico 1014,65 corresponde al ión  $[M]^{+3/3}$
- Pico 761.30 corresponde al ión  $[M]^{+4/4}$
- Pico 609,25 corresponde al ión  $[M]^{+5/5}$
- Pico 507,95 corresponde al ión  $[M]^{+6/6}$
- Pico 435,50 corresponde al ión  $[M]^{+7/7}$
- Pico 381,15 corresponde al ión  $[M]^{+8/8}$

Con estos datos se comprueba que el PM del péptido es 3041,71 que correspondería al PM esperado.



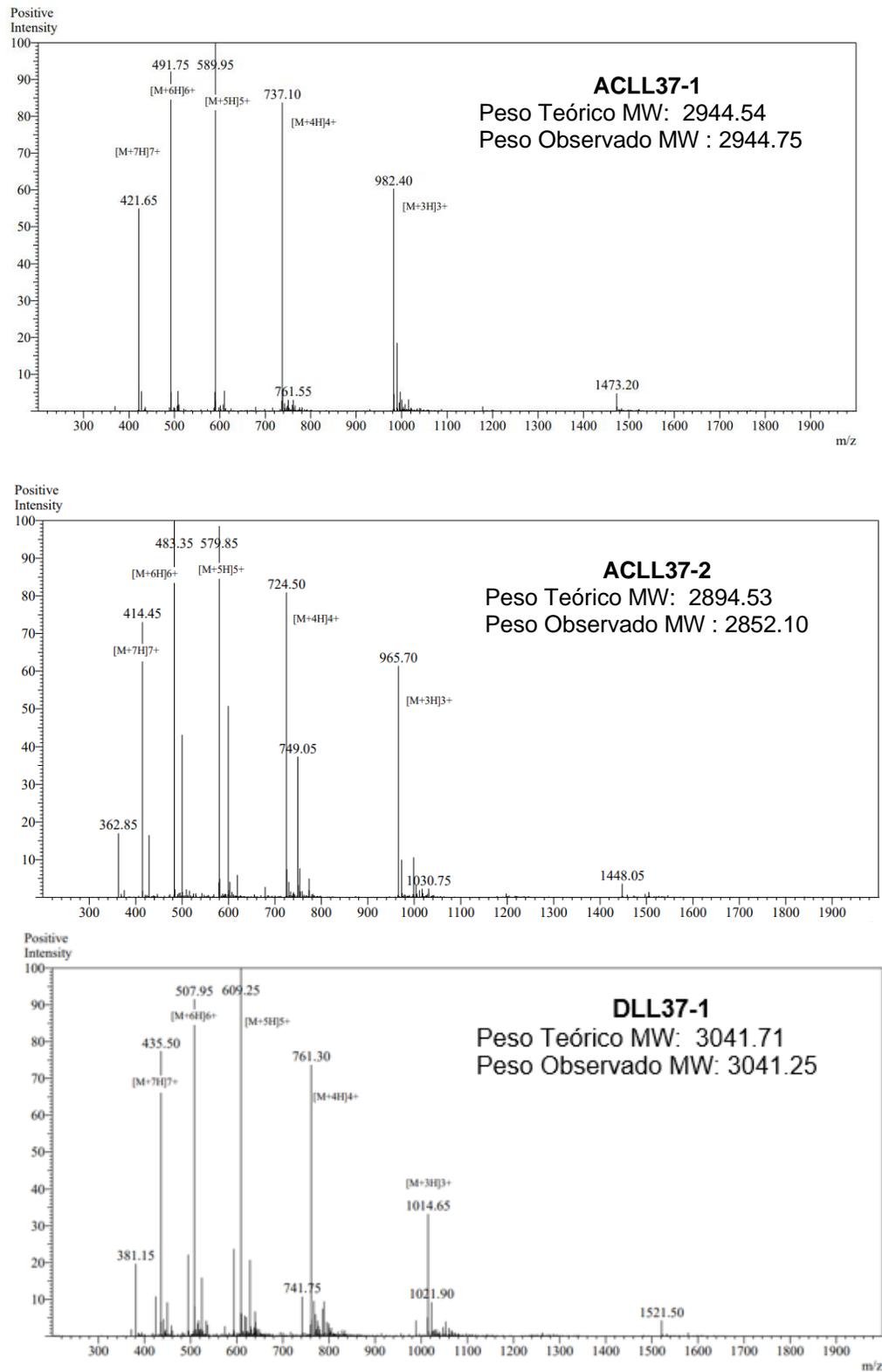
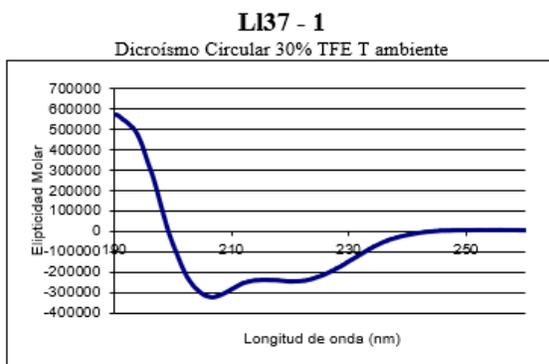


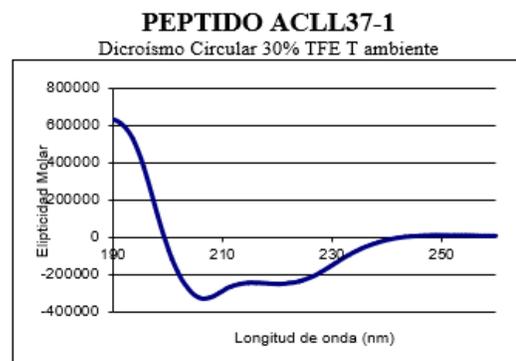
Figura 17: Espectrometría de masas de los péptidos de los péptidos LL37-1, ACLL37 – 1, ACLL37 – 2 y DLL37-1.

### 4.3.2 Dicroísmo circular (DC)

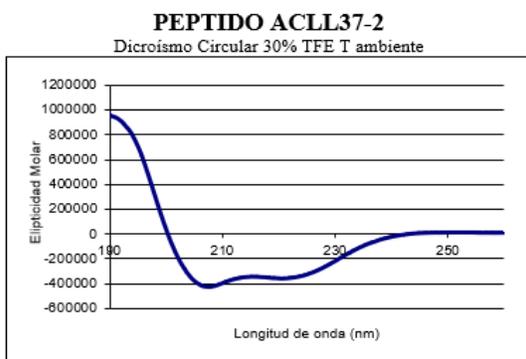
El DC aplicado a los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1, se usó para evaluar la estructura secundaria preferencial que adopta cada uno de ellos en solución. Los espectros de DC reflejan el contenido estructural de un péptido. En el espectro de DC de los 4 péptidos se aprecia el máximo de 193 nm (transición  $\pi-\pi^*$  positiva, con  $\Theta$  entre 60.000-80.000) y los mínimos de 208 nm (transición  $\pi-\pi^*$  negativa) y 222 nm (transición  $n-\pi^*$  con  $\Theta$  -36.000) de una estructura helicoidal (168). En un estudio anterior, realizado por el grupo de investigación REMA, se hizo la predicción, a partir de valores antimicrobianos realizados bioinformáticamente por el software PSSpred en la cual se determinó que esta es una estructura adecuada para presentar actividad antimicrobiana y en este caso una estructura antibiopelícula, figura 18.



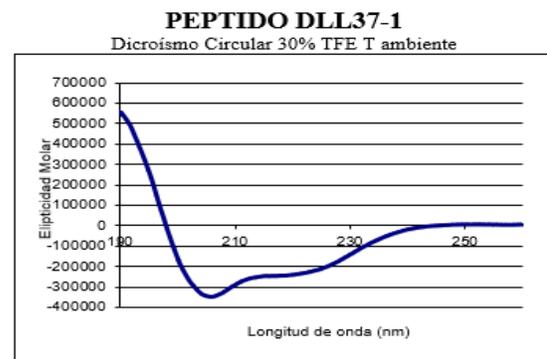
DECONVOLUCIÓN



DECONVOLUCIÓN



NO DECONVOLUCIÓN



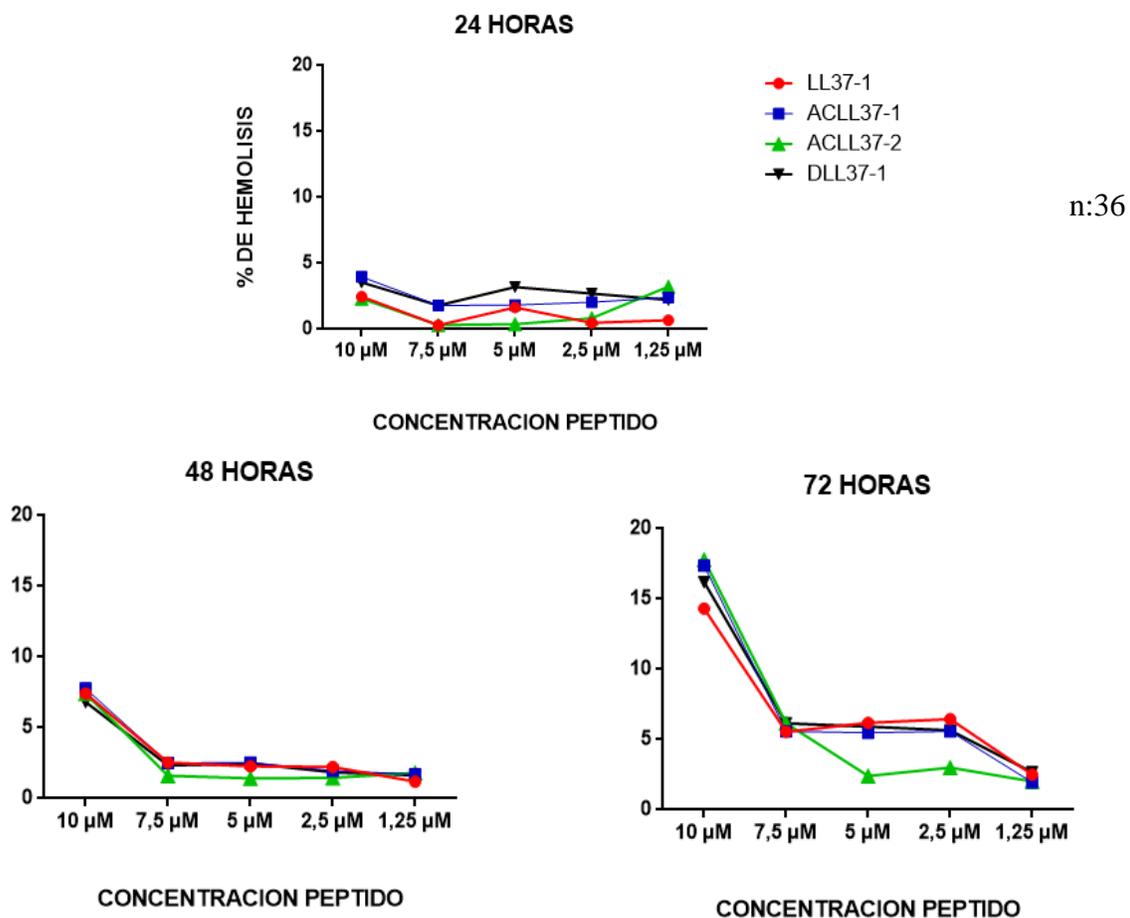
NO DECONVOLUCIÓN

**Figura 18.** Dicroísmo circular de los péptidos. El cual indica la estructura preferencial tomada por cada uno de los péptidos alfa hélice.

- **Actividad biológica de los péptidos**

### 4.3.3 Efecto Hemolítico de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1

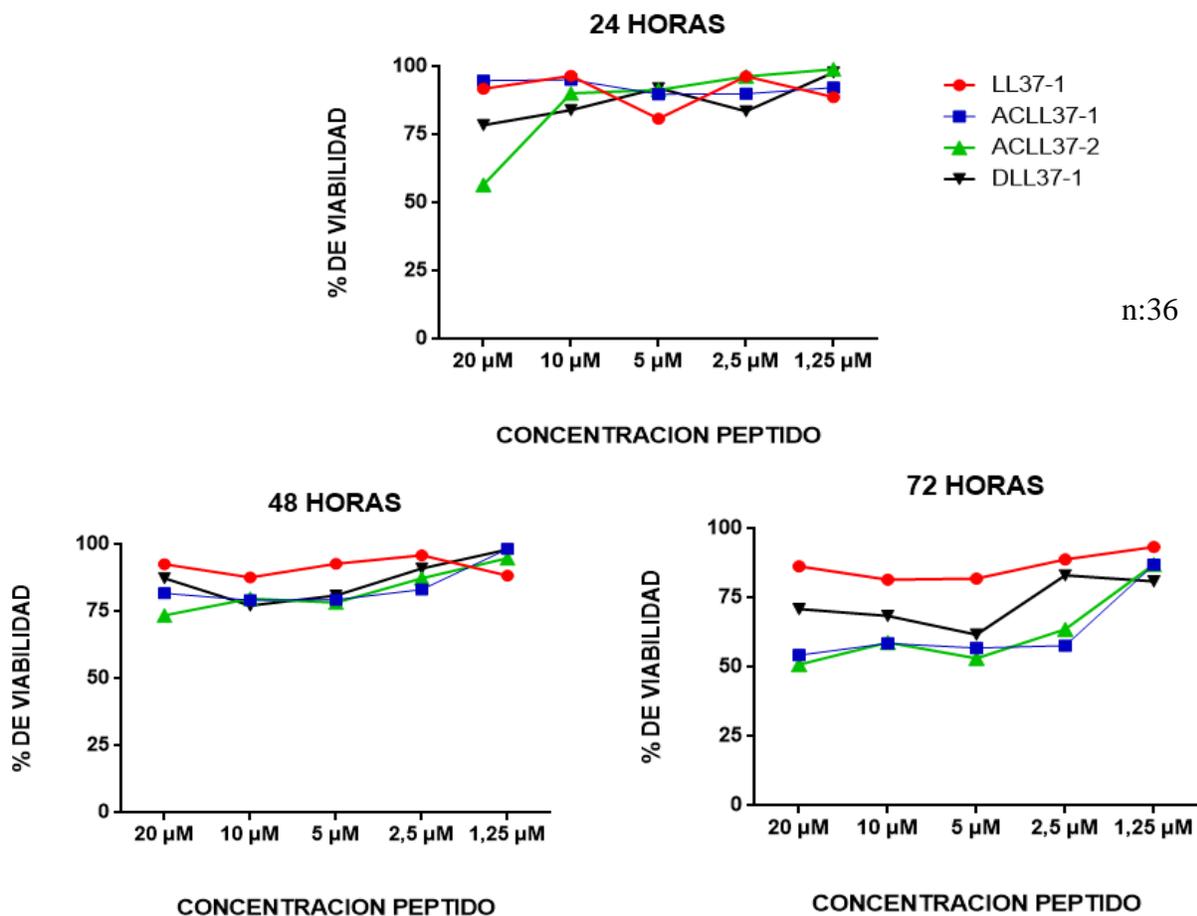
El efecto hemolítico fue evaluado sobre glóbulos rojos O positivos con la metodología descrita anteriormente. Los resultados indican que los péptidos a concentraciones de 1,5 hasta 10  $\mu\text{M}$ ; presentan una hemolisis menor al 4% a las 24 horas de incubación; a las 48 horas de incubación la hemolisis es menor al 8% y a las 72 horas de incubación fue inferior al 18%, figura 19.



**Figura 19.** Efecto hemolítico por horas, donde se evidencia que los péptidos no presentan la capacidad de dañar o lisar la membrana de los glóbulos rojos, para las 24 horas no supera el 5% de hemolisis en ninguna concentración evaluada.

### 4.3.4 Actividad citotóxica de los péptidos sintetizados LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1

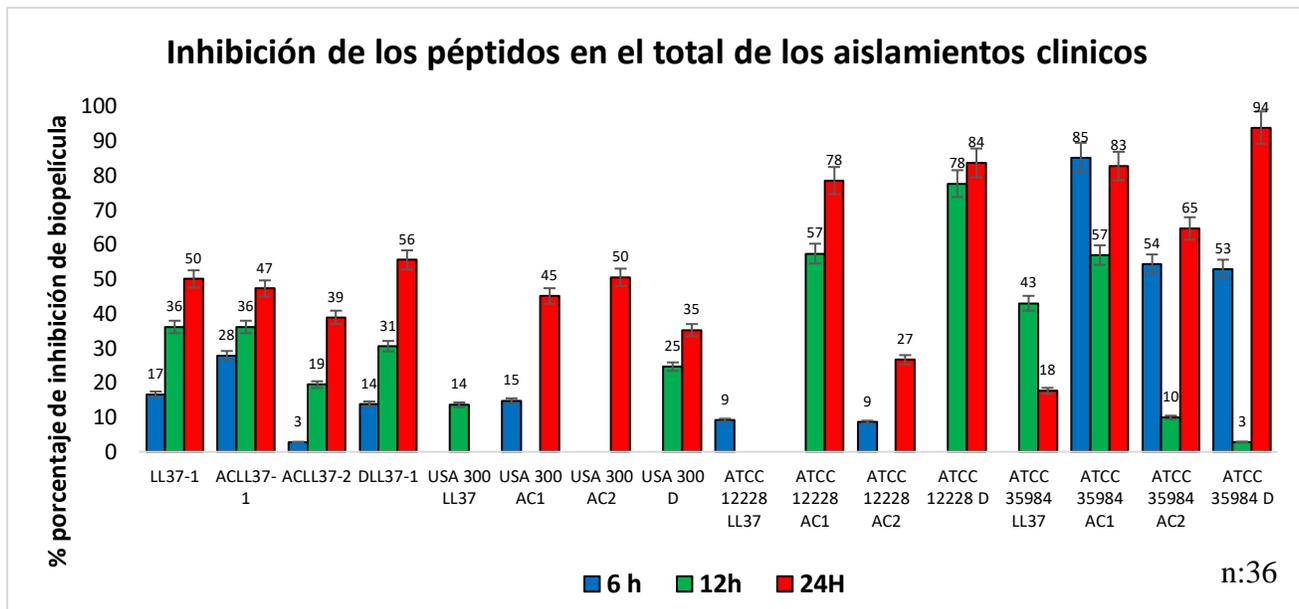
Para verificar la citotoxicidad sobre la línea celular de fibroblastos L929 de los de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1, se usó el reactivo XTT y la metodología descrita anteriormente, se evaluaron a concentraciones de 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  y 1.25  $\mu\text{M}$  por 24, 48 y 72 horas, como control positivo se usó Tritón 2%, los resultados mostraron que a las 24 horas el porcentaje de células viables supero el 80% a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ , a las 48 horas es superior al 75% y a las 72 horas superan el 50% las células metabólicamente activas en todos los péptido y en todas las concentraciones, figura 20.



**Figura 20.** Porcentaje de viabilidad celular, a las 24 horas se obtuvo una viabilidad celular superior al 80% en la concentración de 5  $\mu\text{M}$ .

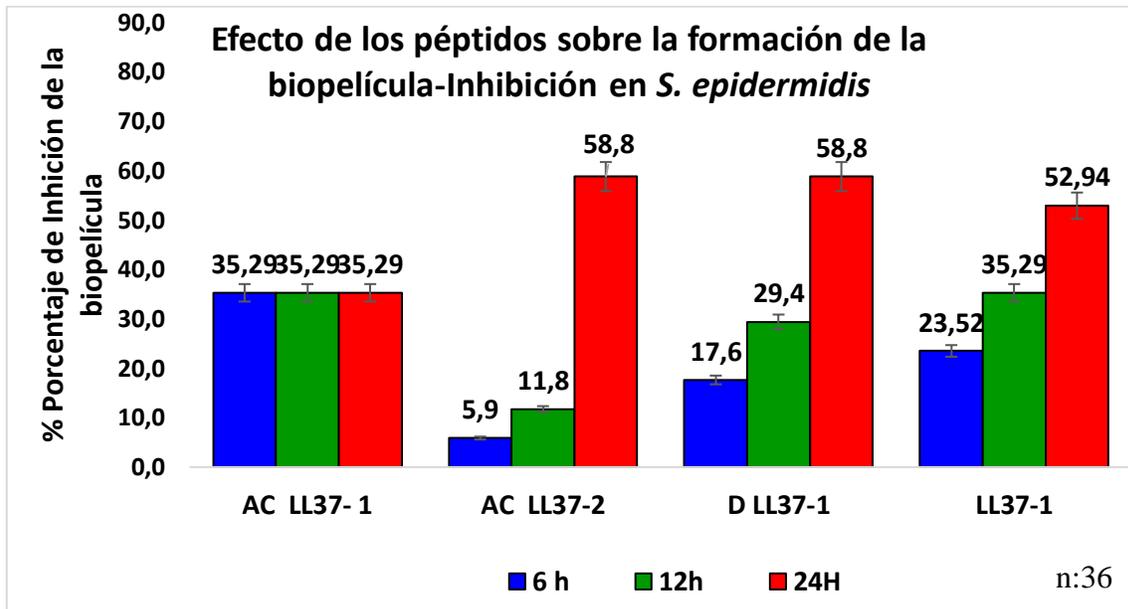
### 4.3.5 Efecto de los péptidos sobre la formación de la biopelícula por microplaca de 96 pozos

La comparación de los aislamientos clínicos en estudio, teniendo en cuenta la inhibición del crecimiento bacteriano, permitió determinar que a las 2 y 4 horas no encontró significancia estadística, pero a las 6, 12 y 24 horas se observó un cambio significativo con un valor  $p \leq 0.001$  con un IC 95% según Bonferroni, figura 21-23.

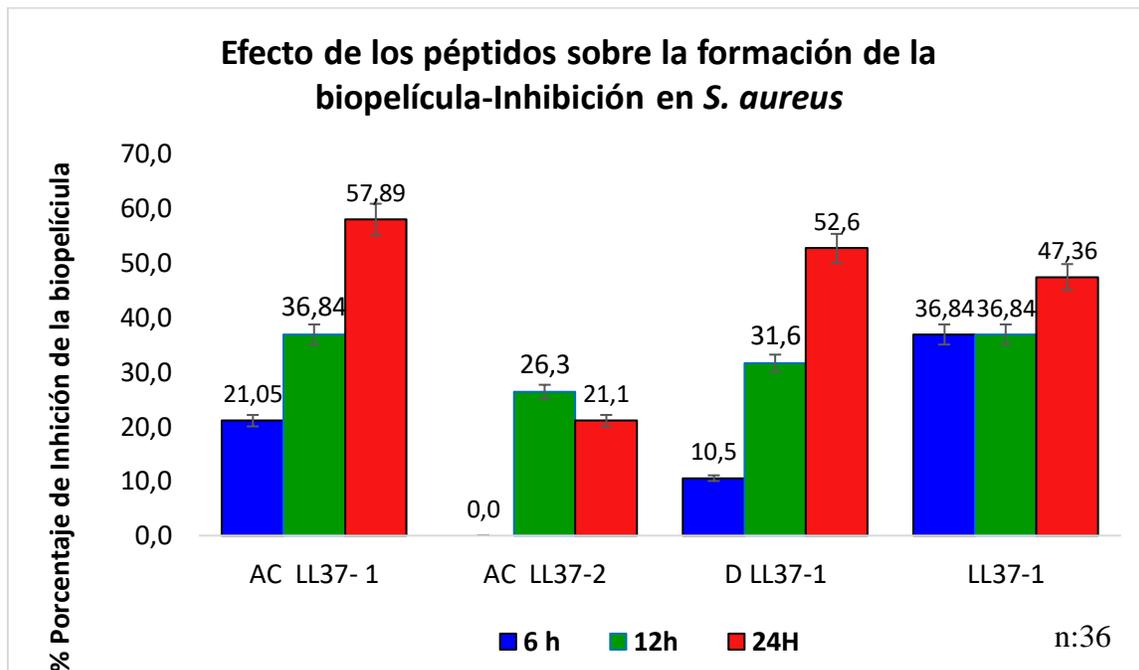


**Figura 21.** Inhibición de los péptidos evaluados en el total de los aislamientos en estudio.

Para determinar la actividad que presentaron los péptidos en la adherencia a la microplaca tanto en *S. epidermidis* y *S. aureus* se realizó una nueva estimación de los resultados, a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas, es importante anotar que sólo se muestra en las figuras 21-22 las horas que presentaron significancia estadística.



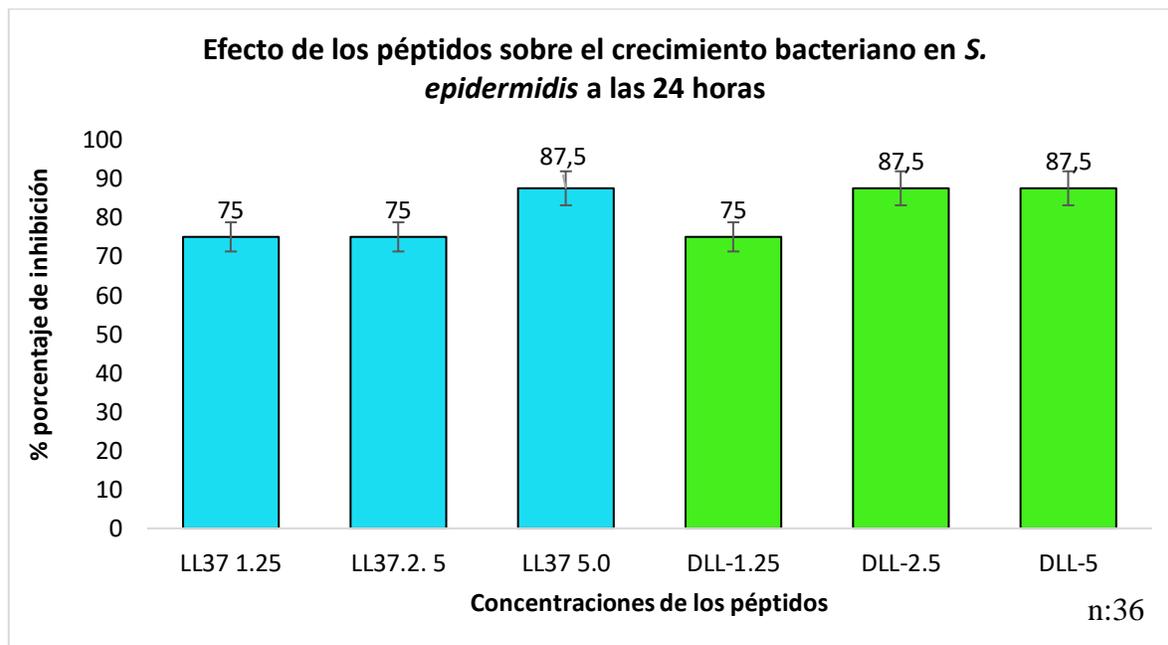
**Figura 22.** Inhibición de la biopelícula en aislamientos clínicos de *S. epidermidis* en presencia de los péptidos. Los resultados nos indican que los péptidos ACLL37-2 y DLL37-1 muestran mayor inhibición con 58.8%.



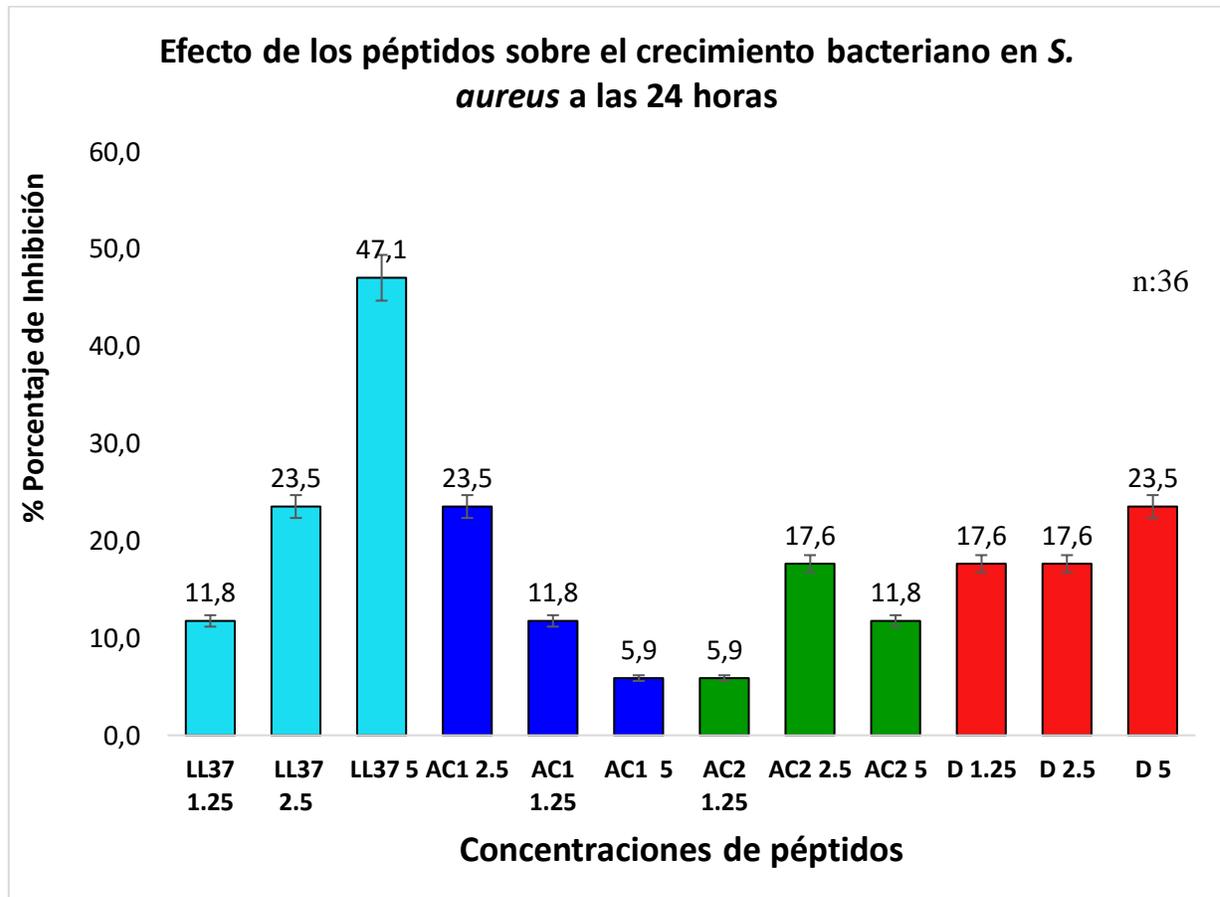
**Figura 23.** Inhibición de la biopelícula en aislamientos clínicos en *S. aureus* en presencia de los péptidos a estudio. Los resultados nos indican que péptido ACLL37-1 logra una inhibición de 57.8% y DLL37-1 de un 52.6%.

### 4.3.6 Curvas de crecimiento Bacteriano y la acción de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL-37-2 y DLL-37-1

Para identificar si los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL-37-2 y DLL-37 -1, inhiben el crecimiento bacteriano en 24 horas, se realizó tomando la diferencia cada hora de las lecturas de las absorbancias de la bacteria sin tratamiento y con tratamiento, se determinó que eran estadísticamente significativas las que daban un valor  $p \leq 0.001$  con IC 95% Bonferroni, los resultados muestran los péptidos que dieron significancia estadística tanto para *S. aureus* y *S. epidermidis* se muestran en las figuras 24 y 25.



**Figura 24.** Inhibición estadísticamente significativa en cepas de *S. epiermidis* en las curvas de crecimiento bacteriano en concentraciones 1.25  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  en los péptidos LL37-1 y DLL37-1.



**Figura 25.** Inhibición estadísticamente significativa en cepas de *S. aureus* por horas en las curvas de crecimiento bacteriano con concentraciones 1.25 µM, 2.5 µM y 5 µM en los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1.

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos tanto par *S. aureus* y *S. epidermidis* a las diferentes concentraciones de los péptidos que se observa en la figura 26.

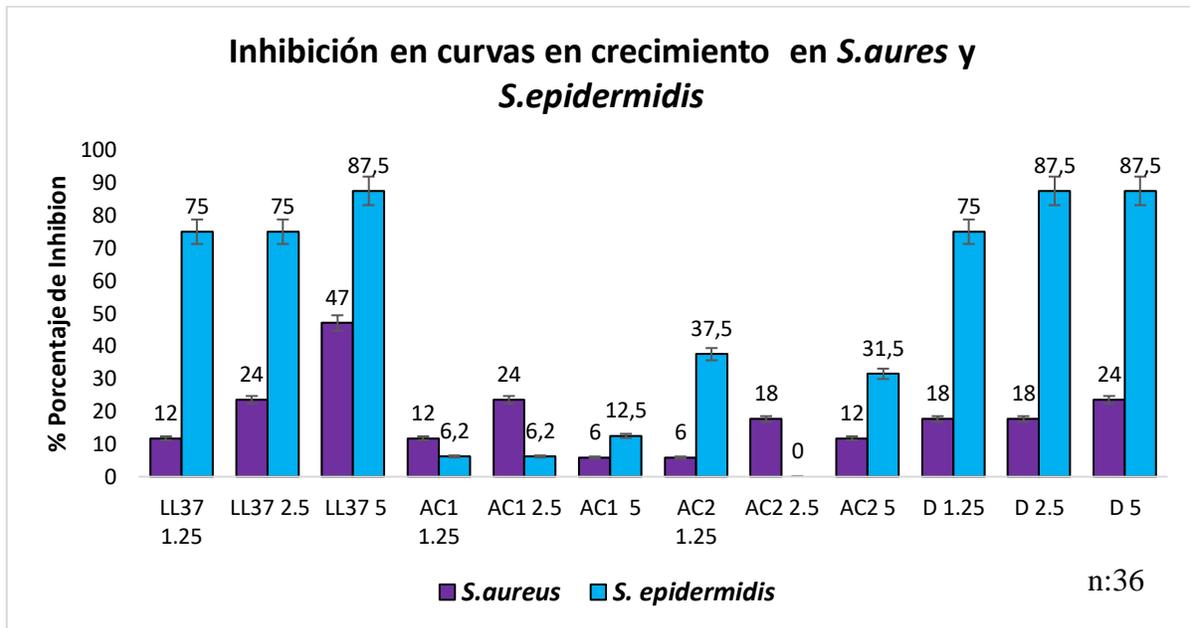
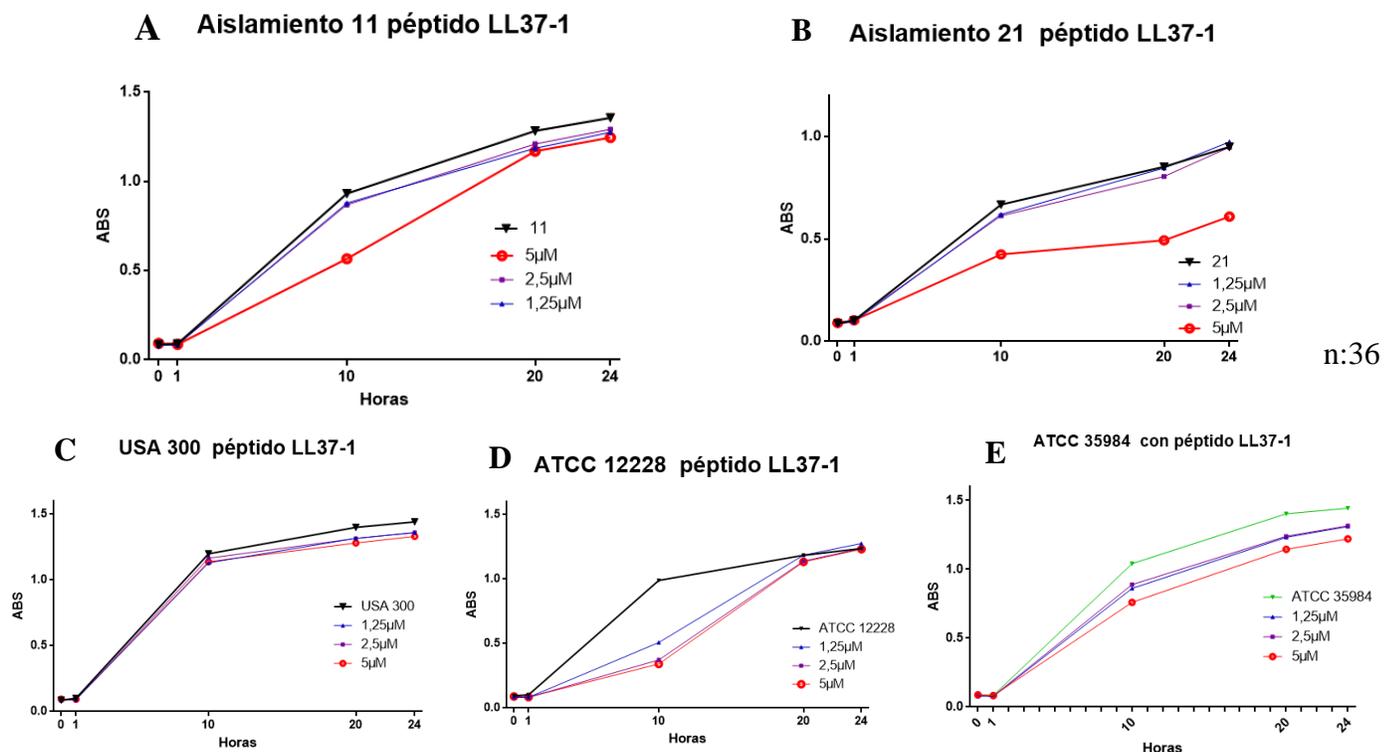


Figura 26. Inhibición en curvas en crecimiento en *S.aures* y *S.epidermidis*

• Péptido LL37-1

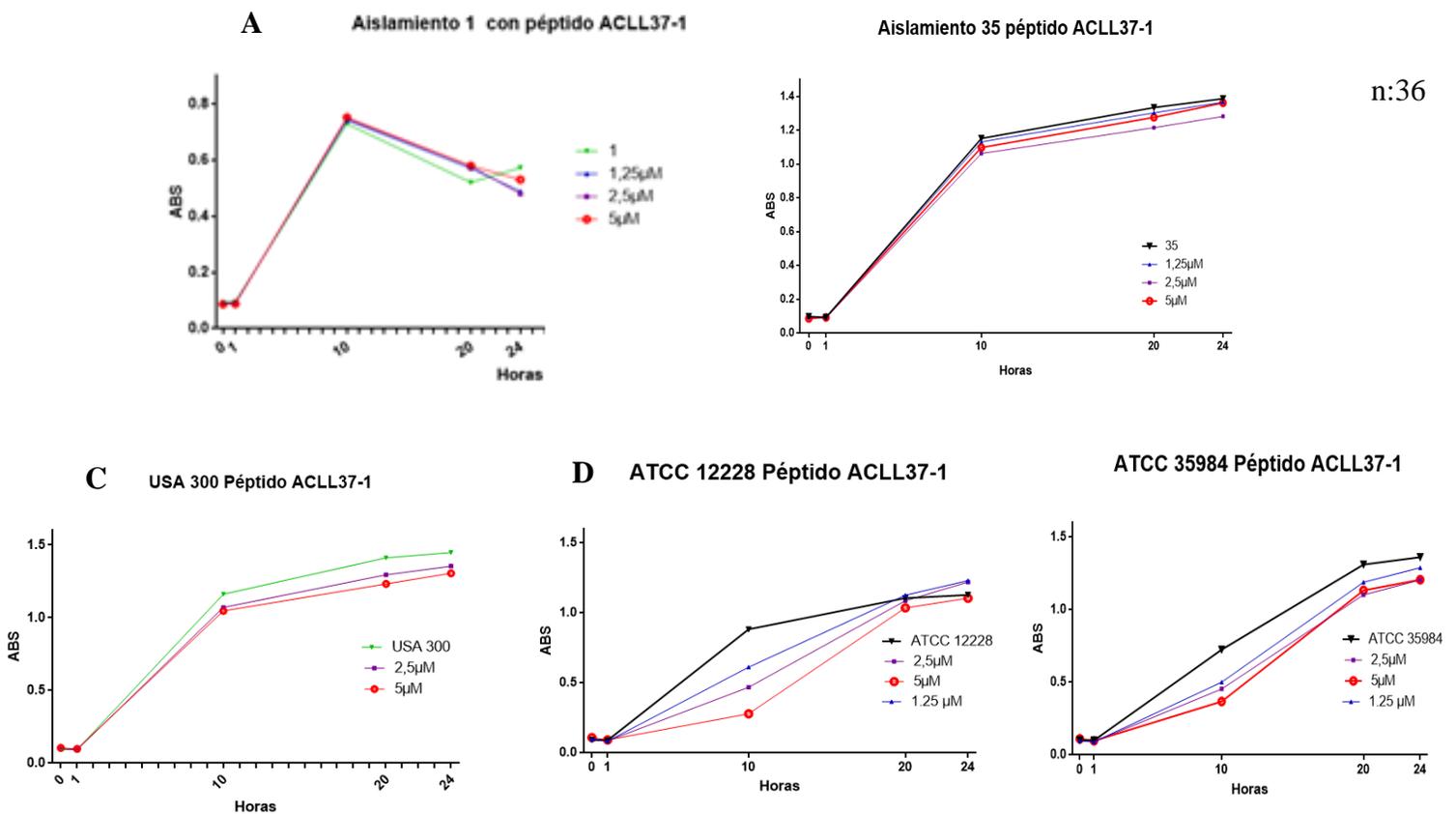
Los resultados muestran que las curvas de crecimiento bacteriano para los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* con el péptido LL37-1 presentan cambios estadísticamente significativos, en las concentraciones 1.25  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, figura 27.



**Figura 27.** Tratamiento del péptido LL37-1 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM. Aislamientos Clínicos: A) Aislamientos 11 de *S.epidermidis*. B) Aislamiento 21 de *S.aureus* donde se evidencia que el péptido LL37-1 a la concentración 5µM produce una inhibición del crecimiento bacteriano con respecto a la control sin péptido; Controles: C) USA 300. D) ATCC 12228. E) ATCC35984

• **Péptido ACLL37-1**

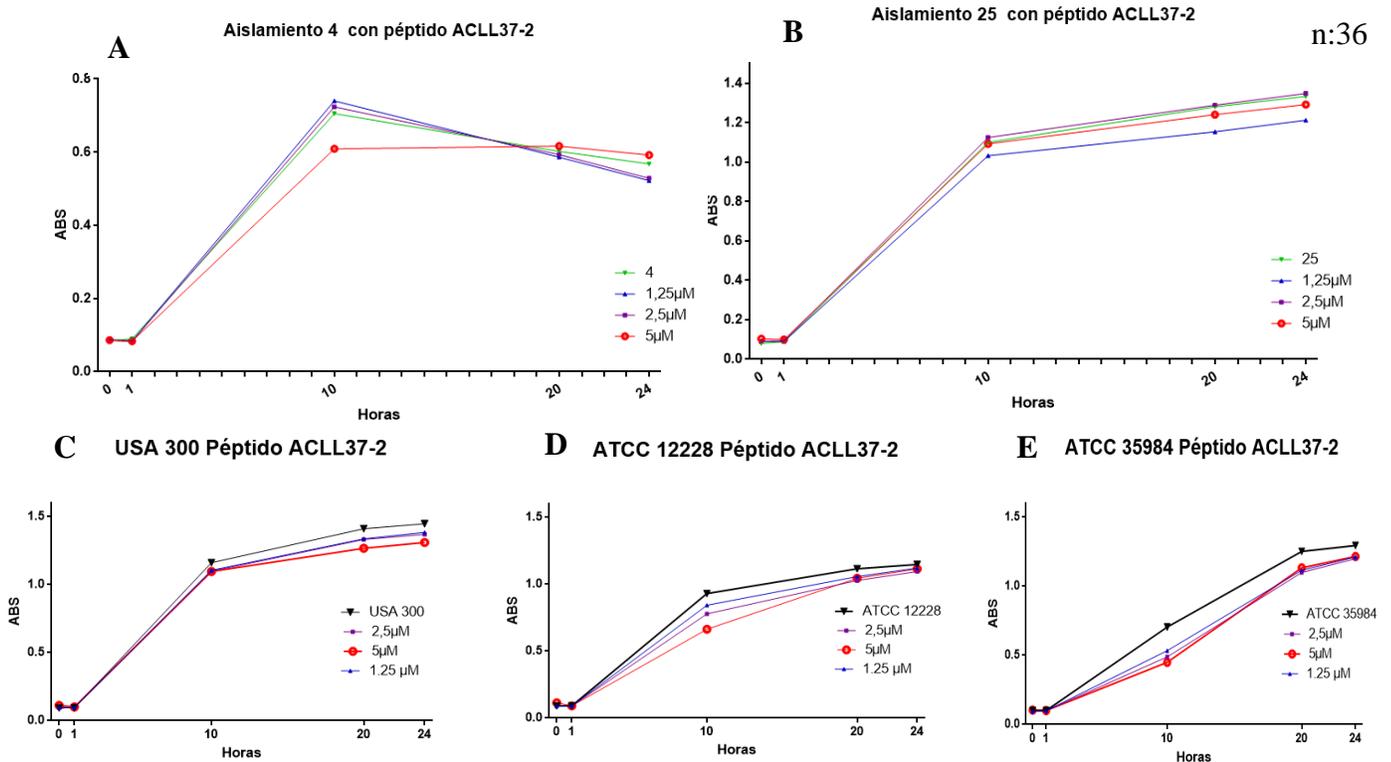
Los resultados muestran que las curvas de crecimiento bacteriano para los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* con el péptido ACLL37-1 presentan cambios significativos en comparación con las concentraciones 5µM , 2.5 µM y 1.25 µM, figura 28.



**Figura 28.** Tratamiento del péptido ACLL37-1 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM. Aislamientos Clínicos: A) Aislamientos 1 de *S.epidermidis*. B) Aislamiento 35 de *S.aureus*; Controles:C) USA 300. D) ATCC 12228. E) ATCC35984.

• **Péptido ACLL-37-2**

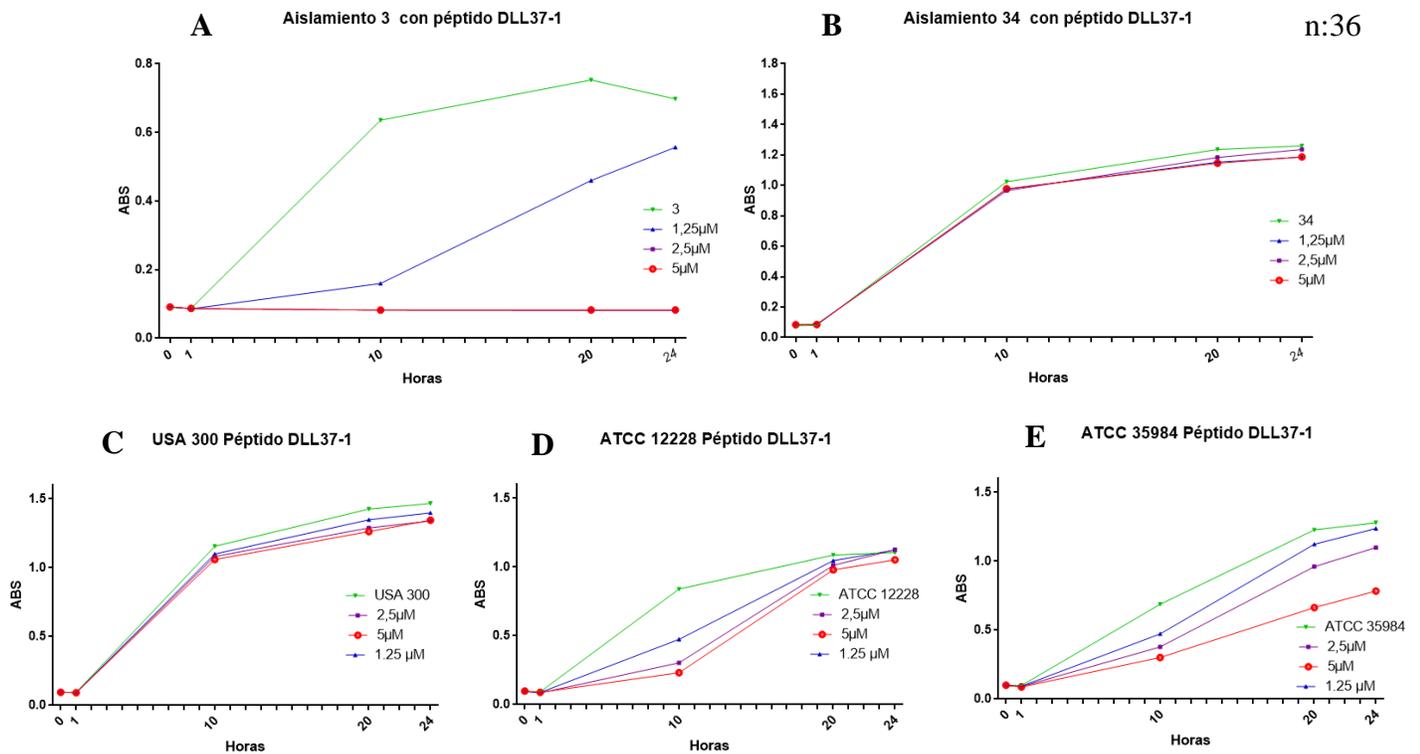
Los resultados muestran que las curvas de crecimiento bacteriano para los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* con el péptido ACLL37-2 presentan cambios significativos en las concentraciones 5µM , 2.5 µM y 1.25 µM, figura 29.



**Figura 29.** Tratamiento del péptido ACLL37-2 en concentraciones de 5µM, 2.5µM y 1.25µM. Aislamientos Clínicos: A) Aislamientos 4 de *S. epidermidis*. B) Aislamiento 25 de *S. aureus*; Controles: C) USA 300. D) ATCC 12228. E) ATCC35984.

• **Péptido DLL-37 -1**

Los resultados muestran que las curvas de crecimiento bacteriano para los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* con el péptido DLL37-2 presentan cambios significativos en las concentraciones del péptido ensayadas 5µM , 2.5 µM y 1.25 µM, figura 30.



**Figura 30.** Tratamiento del péptido DLL37-2 en concentraciones de 5μM, 2.5μM y 1.25μM. Aislamientos Clínicos: A) Aislamientos 3 de *S.epidermidis*. B) Aislamiento 34 de *S.aureus*; Controles: C) USA 300. D) ATCC 12228. E) ATCC35984 donde se evidencia que el péptido DLL37-1 en la concentración 5μM produce una inhibición del crecimiento bacteriano con respecto al control sin péptido.

#### 4.3.7 Determinación de proteínas de Adhesión ClfA, FnbA, SdrC, SdrG y SdrF por PCR en tiempo real con los péptidos LL37-1 y D LL-37 -1 a 5μM

Se realizó el análisis de los niveles de expresión de las proteínas de Adhesión ClfA, FnbA, SdrC para un aislamiento de *S. aureus* y uno de *S. epidermidis* donde se las proteínas de SdrG, SdrF como controles las USA 300, ATCC 12228 y ATCC 35984, Genes Housekeeping *gyrB* y *16S*, con los péptidos LL37-1 y D LL37-1.

En la figura 31 se observan los resultados obtenidos para *S. aureus*, cepa USA 300 y 21. Para la proteína ClfA USA 300 se observó una disminución estadísticamente significativa a 10 horas de tratamiento con el péptido LL37 ( $p:0.0193$ ) y a 12 horas de tratamiento con el péptido LL37 y el péptido D respecto al control.

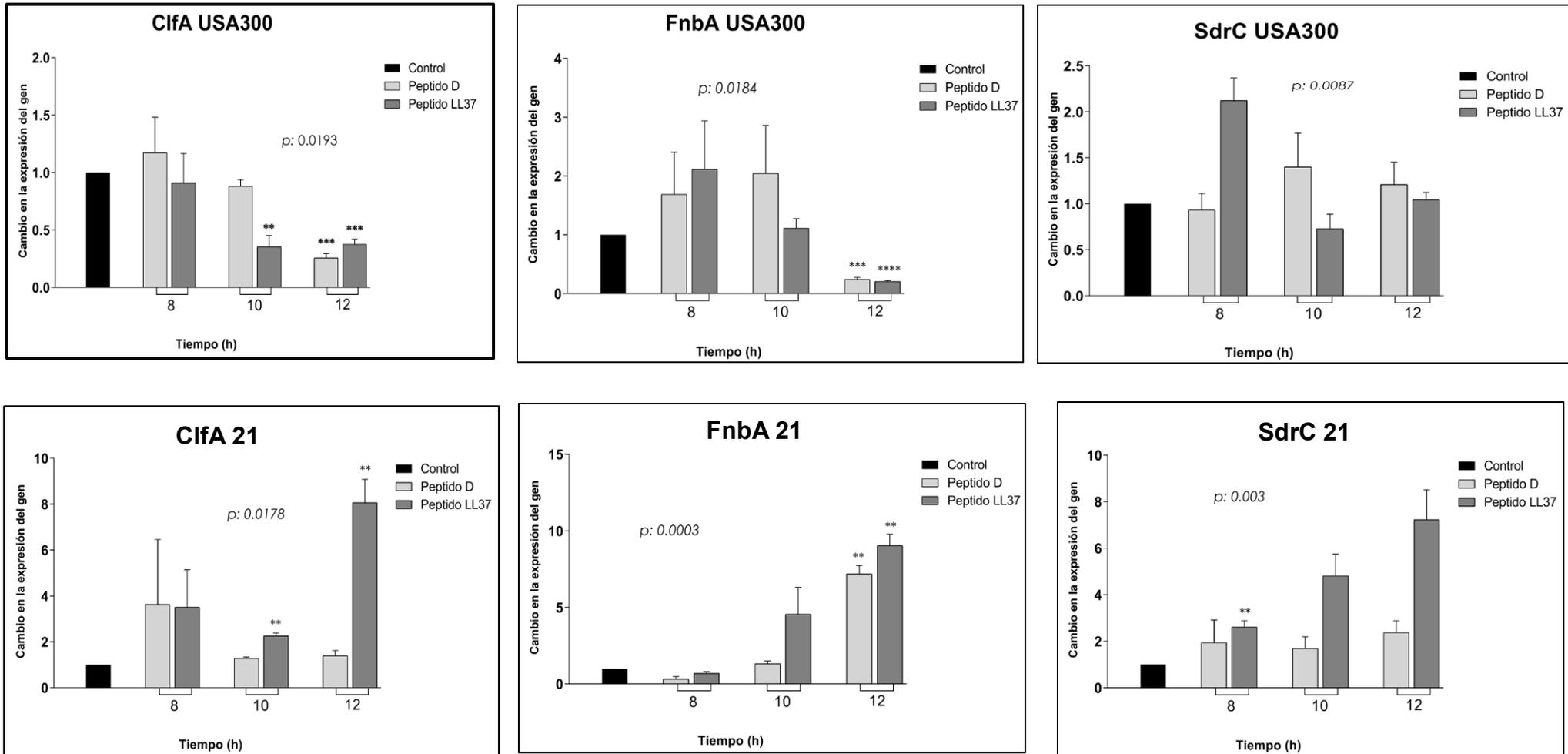
Por su parte la proteína FnbA USA 300 mostró una disminución estadísticamente significativa ( $p:0.0784$ ) a 12 horas de tratamiento con el péptido LL37 y péptido D respecto al control. En el caso de la proteína SdrC USA 300 no se observaron diferencias estadísticamente significativas a ninguna hora del tratamiento con los péptido LL37 y el péptido D respecto al control; sin embargo se observó un marcado aumento del nivel de expresión a 8 horas de tratamiento con el péptido LL37, y una tendencia al aumento a 10 y 12 horas de tratamiento con el péptido D ( $p:0.0087$ ).

En la proteína ClfA 21, se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p:0.0178$ ) respecto al grupo control a 10 y 12 horas de tratamiento con el péptido LL37. Los niveles de proteína después del tratamiento con el péptido D a 10 y 12 horas presentaron una tendencia a la disminución sin llegar a ser estadísticamente significativa respecto a los niveles de expresión del grupo control.

En la proteína FnbA 21, se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p:0.0003$ ) respecto al grupo control a 10 y 12 horas de tratamiento con el péptido LL37.

Finalmente, respecto a la proteína SdrC 21 se observó un aumento en los niveles de expresión estadísticamente significativo ( $p:0.003$ ) a las 8 horas de tratamiento con el péptido LL37 respecto al grupo control. De igual manera se observó una tendencia al aumento en los niveles de expresión de la proteína a las 10 y 12 horas de tratamiento con el péptido LL37 sin llegar a ser los resultados estadísticamente significativos.

**Figura 31.** Expresión de las proteínas de Adhesión CifA, FnbA, SdrC para la cepa 21 y el control USA 300



La figura 32 muestra los resultados de los niveles de las proteínas de adhesión SdrG y SdrF para *S. epidermidis* las cepas ATCC12228, ATCC 35984 y aislamiento 1.

En la proteína SdrG ATCC12228 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión respecto al grupo control. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los niveles de expresión a las 8, 10 y 12 horas con el tratamiento con el péptido LL37 y a las 12 horas con el péptido D.

En la proteína SdrG ATCC 35984 se observó un marcado aumento del nivel de expresión a 8 horas de tratamiento con el péptido LL37, sin embargo, se observa unas diferencias estadísticamente significativas con el péptido D respecto al control a las 12 horas ( $p:0.0201$ ).

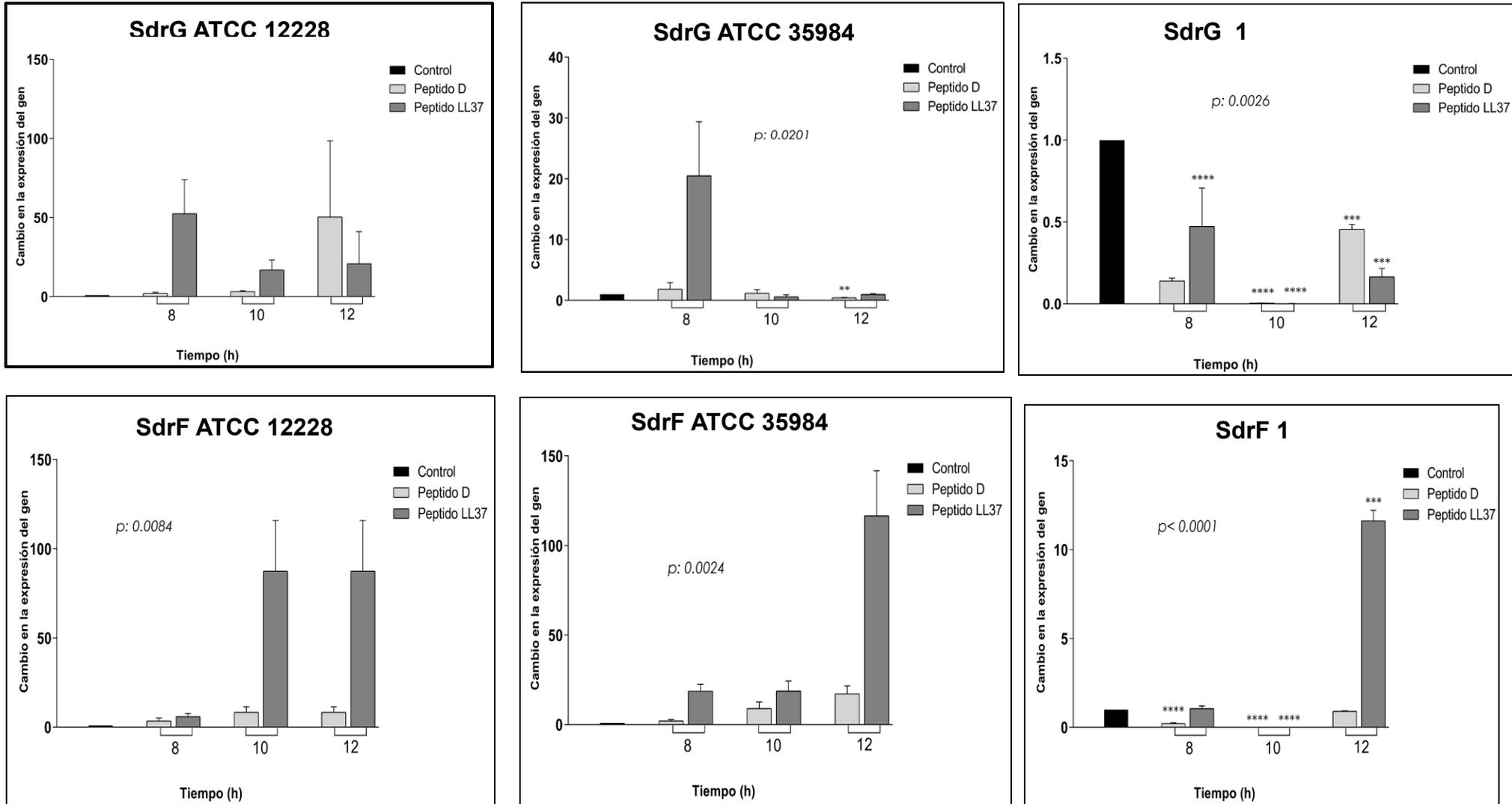
En la proteína SdrG 1 mostró una disminución estadísticamente significativa ( $p:0.0026$ ) a las 8,10 y 12 horas con el péptido LL37 y a las 10 y 12 horas de tratamiento con el péptido D respecto al control.

En la proteína SdrF ATCC12228 se observó una tendencia estadísticamente significativa al aumento en los niveles de expresión a las 10 y 12 horas con el tratamiento con el péptido LL37 con respecto al control ( $p:0.0084$ ).

En la proteína SdrF ATCC35984 se observó una tendencia estadísticamente significativa al aumento en los niveles de expresión a las 8,10 y 12 horas con el tratamiento con el péptido LL37 con respecto al control ( $p:0.0024$ ).

En la proteína SdrF 1 mostró una disminución estadísticamente significativa ( $p<0.0001$ ) a las 8 y10 horas con el péptido D respecto al control, sin embargo, se mostró un aumento de la expresión estadísticamente significativo a las 12 horas con el péptido a las 12 horas con respeto al control.

**Figura 32.** Resultados de los niveles de las proteínas de adhesión SdrG y SdrF para *S.epidermidis* para el aislamiento clínico y los controles ATCC 12228 y ATCC 35984.



## 5. Discusion

Las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes son un problema de salud pública en el mundo, en el caso de las bacterias Gram positivas, implican un reto en cuanto a su tratamiento por su frecuencia, severidad y alto costo particularmente en el medio hospitalario, donde en Colombia *S. aureus* y *S. epidermidis* se encuentran entre los 10 primeros microorganismos asociadas infecciones en las UCI y la resistencia a oxacilina es del 31.6% (30), en este estudio los aislamientos de origen clínico presentaron una resistencia del 64.5% y en Latinoamérica la resistencia corresponde al 80% (169).

A pesar de que existen diferentes porcentajes de resistencia, estos microorganismos son importantes patógenos, que en los últimos años ha pasado de ser causantes de infección nosocomial, a aumentar de modo importante su prevalencia.

Según los datos presentados por el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) con corte a la semana epidemiológica 16 del año 2019, reportan infecciones asociadas al sitio quirúrgico con 640 casos y las infecciones asociadas a dispositivos médicos 1256 casos en todo el país, estos datos son de gran importancia pues los *S. aureus* y *S. epidermidis* en su gran mayoría tiene la capacidad de formar biopelícula en superficies bióticas y abióticas (170), incrementando los factores de virulencia en estos microorganismos.

Para detectar la producción fenotípica de la biopelícula se usó el método de ARC empleado por Freeman y col. en 1989, en el cual permite que el reactivo Rojo Congo interactúe con la matriz de exopolisacáridos y los carbohidratos, originando así el oscurecimiento de aquellas colonias que tienen la capacidad de formar biopelícula, lo contrario éstas permanecerán incoloras, esta reacción permite la lectura de cada uno de los aislamientos, se encontró que el 35.5% de los *S. epidermidis* y el 51.6% y los *S. aureus* fueron formadores de biopelícula, estos resultados son similares a los estudios encontrados por El-Khier y col. (171), autores como Haddad O et al. reportaron que el 76.7% de las cepas analizadas eran formadores de biopelícula (172), pero autores como Mathur y col. (173) no recomiendan el método de ARC

para la identificación de aislamientos que producen biopelícula por que varios factores, como la composición de los reactivos usados en el medio de cultivo, el tiempo de incubación (173–180), el número de bacterias que crecen sobre el medio de cultivo y la experticia que se tenga al momento de la interpretación del color de las colonias (181), pueden afectar la lectura e influir en los resultados. Por lo tanto, el método de agar de Rojo Congo es útil en la medida en que los resultados obtenidos se puedan respaldar con otro método para la formación de la biopelícula. Por lo tanto, se evaluaron los aislamientos con el método en microplaca de 96 pozos, en medio BHI con glucosa al 1% y NaCl al 2% (173).

Nuestros resultados indican que el 72.6% de aislamientos que fueron cultivados en caldo BHI con glucosa al 1% y el 50% con caldo BHI con NaCl 2%, fueron fuertemente adherentes para la formación de la biopelícula, esto concuerda con lo encontrado en un estudio adelantado por Agarwal y col (182), donde se demostró que el uso de glucosa o NaCl mejoran la capacidad que tienen los *Staphylococcus spp.*, de producir de biopelícula, ya que estas condiciones favorecen la disminución del pH en el medio y proporciona un ambiente propicio que incrementa la formación de biopelícula (182–187) y la fuente de carbono preferida por los microorganismos es la glucosa, que la pueden metabolizar de un manera eficiente, logrando así una adaptación al medio donde se encuentran y consiguiendo aumentar su virulencia (188–190). Este método es más sensible, preciso y reproducible, tiene la ventaja de ser un modelo cuantitativo lo que ayuda a clasificar de manera más exacta los resultados y así determinar el grado de la adherencia de los aislamientos (173).

Dentro de los factores de virulencia que pueden expresar los *Staphylococcus spp.* se encuentran las proteínas de adhesión MSCRAMM, en los aislamientos clínicos estudiados de *S. aureus* se observó la presencia de los genes ClfA en el 89.47% y ClfB, FnBPA y SdrC en el 94.73%; estos resultados son similares a los encontrados en el 2019 por Wang y col. (191), donde las proteínas ClfA y ClfB estaban presentes >92% de los aislamientos analizados. Para los *S. epidermidis* se determinó que los genes ClfA, ClfB, FnbA estaban en el 35.29%; SdrC en el 29.41%, y SdrG y SdrF en el 100% de las cepas estudiadas.

El factor ClfA en *S. aureus* y el factor SdrG en *S. epidermidis* tiene como función generar una fuerte unión en la cadena  $\beta$  del péptido del fibrinógeno y producir cambios conformacionales mediante la interacción de fuerzas iónicas o enlaces de captura con significancia biológica, y las bacterias pueden estar atadas a las superficies en presencia de fluidos en movimiento como el torrente sanguíneo (192,193).

Las proteínas FnBPs y SdrC, promueven la agregación, acumulación celular y la formación de la biopelícula mediante múltiples interacciones célula-célula; en los resultados se observa que la presencia del gen SdrC se encontró en un porcentaje bajo en los *S. epidermidis*, resultado que se asocia con lo obtenido en la prueba de microplaca donde sólo el 48.4% fueron fuertemente adherentes según la clasificación de Christense, en presencia de BHI+glucosa al 1% y NaCL al 2%, a diferencia de los *S. aureus* que fue del 96.8% y 51.6% respectivamente (194). Otra característica de la FnBPs presentes en los *S. aureus* es la de capturar el plasminógeno del suero y activarlo, lo cual va degradar las opsoninas y permitir que la bacteria se disemine sobre el tejido infectado (195).

La presencia de la proteína ClfB en *S. aureus* favorece la iniciación de las infecciones bacterianas, debido a su habilidad de adherirse a los depósitos de fibrinógeno presente en el catéter y en los abscesos colonizar queratinocitos sin núcleo (196,197). Estos resultados sugieren, que muchas de las proteínas que se anclan en la pared celular, las cuales pertenecen a la familia MSCRAMM, pueden estar involucradas en la colonización, e invasión del huésped y favorecer la formación de biopelícula.

La proteína SdrF presente en *S. epidermidis* es similar a SdrC, SdrD y SdrE presentes en *S. aureus*, las infecciones producidas por *S. epidermidis* están generando complicaciones médicas, ya que se adhieren a los biomateriales, esta proteína se encuentra en la superficie bacteriana y tiene la capacidad de unirse al colágeno y a la queratina, tiene un papel crítico porque puede adherirse al colágeno tipo I, iniciando la colonización (198) logrando la formación de biopelícula, Walker y col. la encontraron en la superficie de los implantes mamarios (199), lo que nos

lleva pensar que esta proteína presenta una interacción directa con los dispositivos médicos u estéticos, porque puede unirse a la queratina y facilita la adhesión a las células epiteliales humanas (53,200).

Mediante los ensayos enunciados anteriormente, se demuestra que los aislamientos de *S.aureus* y *S.epidermidis*, son capaces de formar biopelícula y poseen proteínas de adhesión MSCRAMM, por lo tanto estas cepas se analizaron con cuatro péptidos análogos al LL37, llamado así por estar compuesto por 37 aminoácidos y empezar con dos leucinas, los péptidos fueron denominados LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1.

El denominado LL37-1 (GRKSAKKIGKRAKRVQRIKDFLR), posee una longitud de 24 aminoácidos y la carga neta de la secuencia es +9 para que mantenga las características antimicrobianas (137,138). El segundo péptido es ACLL37-1, el cual posee una longitud de 23 aminoácidos, (RKSKEKIGKEFKRVQRIKDFLR) pues se eliminó el aminoácido G (glicina) inicial de la secuencia LL37-1 y se acetilo en N-terminal su carga neta +9. El tercer péptido es ACLL37-2, posee una longitud de 24 aminoácidos, se mantienen Acetilación en N-terminal y su carga es +10. Finalmente el péptido DLL37-1, posee una longitud de 25 aminoácidos, se mantienen la Acetilación en N-terminal pero la secuencia se modificó al adicionar una fenilalanina D ((d-PHE)GRKSAKKIGKRAKRVQRIKD(d-PHE)LR ), esto para disminuir el exceso de carga neta, ya que disminuyendo este valor se asegura su actividad antimicrobiana y lo convierte en un enantiómero D.

A cada uno de los péptidos se les garantizo la pureza mediante cromatografía por HPLC la cual mostro un único pico y una pureza superior al >95%, lo que corresponde a las características diseñadas, por espectrometría de masas se identificó el peso molecular de cada péptido y para evaluar la estructura secundaria que toma cada péptido se usó el dicroísmo circular comprobando que los péptidos toman una estructura alfa-helicoidal (201).

Por lo tanto se obtuvieron unos péptidos con un elevado valor antimicrobiano/ antibiopelícula, mostrando que poseen rasgos de anfipaticidad lo que les permite interactuar electrostáticamente con los fosfolípidos de membranas bacterianas, las cuales están cargados negativamente, logrando que la cara no polar del péptido se

inserte en la membrana microbiana logrando alta permeabilidad y por lo tanto pérdida de la función de barrera con el exterior celular (202), logrando la muerte celular. Los AMP se convierten en una nueva alternativa que puede ser usada como los antibióticos, al evaluar la capacidad de hemólisis se encontró que los péptidos tienen una acción hemolítica menor al 4% a las 24 horas y para la citotoxicidad se obtuvo que la viabilidad celular supero el 80% a las 24 horas (203–205).

Para verificar si los péptidos podían inhibir la formación de biopelícula se probaron en microplaca de 96 pozos en caldo BHI con glucosa al 1% y la presencia de los péptidos LL37-1, ACLL37-1, ACLL37-2 y DLL37-1 a una concentración final de 5µM con tiempos de incubación dos, cuatro, seis, 12 y 24 horas a 37°C para identificar el tiempo óptimo de la inhibición de la biopelícula, como resultado obtuvimos que los péptidos con mayor actividad inhibitoria es el LL37-1 y DLL37-1, para *S. epidermidis* fue de 55.5% y para *S. aureus* de un 50% a las 24 horas de incubación. Estos resultados son similares a los encontrados por Hell y colaboradores (206), donde hallaron que a una baja concentración del péptido LL37 disminuye significativamente la unión de bacterias en la superficie a la cual se adhieren, influyendo de manera directa en la masa total de la biopelícula, dado que la biopelícula protege a las bacterias durante las infecciones y permitiendo la supervivencia al entorno hostil que se genera, la acción de la inhibición en la formación de biopelículas por LL37 puede tener un papel clave para prevenir y evitar la colonización(206). Con los péptidos ACLL37-1 y ACLL37-2 se observa leve disminución en la acción de estos péptidos sobre la biopelícula incluso en las 24 horas, con un máximo de inhibición a las 12 horas.

Así mismo se evaluaron los cambios dinámicos del crecimiento mediante las curvas de crecimiento bacteriano, partiendo de una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC, los resultados nos muestran que los péptidos LL37-1, ACLL-37-2 y DLL-37 -1 tiene la habilidad de prolongar la fase de latencia o de adaptación, que es la etapa donde el microorganismo se acopla a un nuevo ambiente, para luego iniciar el aumento de expresión de genes importantes en el crecimiento (207). Los resultados mostraron que durante esta fase se prolonga especialmente en la concentración de 5 µM, por ejemplo, para el péptido LL37-1 con la cepa 22-71 se alarga casi en

10 horas, para el ACLL37-1 los aislamientos no tuvieron resultados estadísticamente significativos, para el ACLL37-2 se tuvo resultados significativos en la concentración de 5  $\mu$ M y finalmente el DLL37-1 fue el que más alargo la fase de adaptación en casi 10 horas y es el péptido que mejor resultados estadísticamente significativos muestra, además, se sugieren que los péptidos probablemente ejercen un cambio en la adaptación y de esta manera disminuye la capacidad de adherencia de la población bacteriana logrando disminuir su capacidad de virulencia (208).

Para el ensayo de PCR en tiempo real se usaron los péptidos LL37-1 y DLL37-1 a una concentración de 5 $\mu$ M de los genes *ClfA*, *FnbA*, *SdrC*, *SdrG* y *SdrF* que conforman las proteínas de adhesión MSCRAMM. Se tomó un aislamiento de *S. epidermidis* (aislamiento 1) esta cepa tenía como característica no ser formadora de biopelícula, sensible a todos los antibióticos probados, en su genoma como factores de virulencia se encontró el casete tipo I, la isla de patogenicidad ACME y un aislamientos de *S. aureus* (aislamiento 21) resistente a cuatro antibióticos (OX,CIP,E,DA), en su genoma se encontró que posee el cassette SCCmec el casete tipo II y era fuertemente adherente así como de cada uno de los controles con los péptidos denominados LL37-1 y DLL37 -1 a una concentración final de 5 $\mu$ M.

Finalmente, comprender cómo el *Staphylococcus spp.* regula la expresión génica de algunas proteínas MSCRAMM es fundamental para diferenciar las etapas de la infección y la capacidad de los péptidos de alterar los niveles de expresión es así como *ClfA*, muestra un aumento significativamente estadístico a las 10 y 12 horas con el tratamiento con el péptido LL37, este resultado es similar a lo encontrado por Sahab et al en 2013, donde los niveles de expresión de esta proteína aumentaron inclusive hasta las 24 horas de crecimiento (209), otro estudio con resultados similares es el de Ythier y cols en el 2012, esta proteína aumento hasta la fase estacionario, por ejemplo, ellos estudiaron cepas de *S. aureus* en TSB, donde encontraron que esta proteína aumento en la fase estacionario temprana de crecimiento (24h) (210). Por lo tanto se puede pensar que las bacterias puede llegar a cambiar su fenotipo según progrese la infección o según sus necesidades de supervivencia (211,212) .

Para la proteína de tipo FnbA la expresión se incrementó en la cepa USA 300 a las 8 y 10 horas, para la cepa 21 a las 12 horas, estos resultados son diferentes a los hallados por Sahab y Col en 2013 (209), donde encontraron que la expresión de *fnb A*, y *fnb B*, se encontraron significativamente más alta después de 24 y 48 H de crecimiento de biopelículas. Por otra parte, Sthanikam y cols en 2016, demostraron que FnbA promueve la formación de biopelícula sobre superficies de poliestireno en *S. aureus* resistente a la meticilina, y en las cepas que investigaron encontraron un aumento en la expresión de FnbA hasta las 24 h de crecimiento y en la expresión se estabilizó a las 48 horas (213). Por lo tanto, se puede pensar que el cambio en la expresión y en su comportamiento es importante para la perpetuación y la supervivencia de la bacteria en la biopelícula, lo que contribuye a lograr la formación estructural de la biopelícula a lo largo del tiempo (209).

Para las proteínas de adhesión de tipo Sdr los resultados señala un aumento en la expresión de esta proteína a las 8, 10 y 12 horas con los péptidos tratados, estos datos son similares a los encontrados por Jenkins y cols en 2015, donde encontraron que adhesinas durante la colonización nasal estuvieron drásticamente aumentados *in vitro*. Por ejemplo, uno de sus hallazgo fueron que ClfB, SdrC, SdrD y SasG desempeñan un papel en la colonización nasal, sus resultados apoyan la hipótesis de que la colonización nasal es un proceso multifactorial que requiere numerosas adhesinas, además evaluaron sus niveles en sangre de ratón donde también estuvieron aumentadas y que por lo tanto *S. aureus* puede pasar rápidamente de ser parte de la microbiota normal a ser patógeno (214). Además Sitkiewicz y cols en 2011, analizaron proteínas SdrC, las cuales fueron tratadas con calcio, magnesio y hierro encontrando que los iones de hierro no causan cambios significativos en la expresión de *sdrC*, por el contrario los iones de magnesio y calcio tienen un efecto profundo en la expresión aumentando 30 veces la cantidad de transcripción en la fase logarítmica, se puede pensar que *sdrC* probablemente esté más relacionada con la transición de la fase exponencial tardía a la estacionaria (53,215).

También se encontró un aumento y una disminución en la expresión de la proteína SdrG con las cepas analizadas, Sellmany Cols en 2008 determinaron la expresión

de esta proteína y la expresión se incrementó in vivo en relación con el inóculo, lo que indica que el mismo modo de regulación es común y posiblemente está generalizado entre los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* (216), Hartford y Cols encontraron que in vitro la proteína Fbe/SdrG se expresó a un nivel suficientemente alto para permitir una adherencia detectable solo cuando llegó a la fase exponencial temprana (217,218).

El péptido con mayor actividad en todos los ensayos fue el péptido DLL37-1, por que posiblemente los ribosomas de la bacteria no incorporan directamente este tipo de aminoácidos en la cadena peptídica, sin embargo; los residuos D dan mayor estabilidad al péptido ocasionando un efecto en el proceso de crecimiento de la bacteria o un incremento en la potencia del péptido, adicionalmente genera estabilidad a las enzimas proteolíticas como es el caso de las aureolisinas debido a los cambios farmacocinéticos que se generan comparado con el péptido nativo LL37-1 (219). Otra característica del péptido DLL-37 es la desestabilización de la pared celular en las bacterias Gram positivas, mediante las alteraciones electroestáticas que pueden unirse más fácilmente a la parte superior de la pared, mientras que los péptidos LL-37 necesitan penetrar esta membrana, todos estos cambios posiblemente pueden generar que el péptido DLL-37 presente mayor actividad biológica (220).

Por lo tanto, podemos indicar que el péptido DLL37-1 tiene mejor actividad antibiopelícula, debido al cambio de fenilalanina L por D, en una investigación realizada por Young y col. (221), evidenciaron que este cambio aumentaba la actividad de péptido, en este trabajo confirmamos que este cambio es muy favorable, además se logró un mejor diseño, basado en el péptido anteriormente trabajado en el grupo de investigación REMA, pero esta vez tiene un valor agregado ya que se probó en aislamientos clínicos.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que MSCRAMM están presentes en los aislamientos analizados, además, son muy activas en la etapa de adhesión de la biopelícula, ya que se encuentran expresadas desde la fase logarítmica e incluso algunas en la fase estacionaria. Además, los patrones de expresión de dichas proteínas variaron entre las cepas analizadas (29). Los

péptidos analizados LL37-1, ACLL37-1, ACLL-37-2 y DLL-37 -1, presentan una baja hemólisis y citotoxicidad, sin embargo, el péptido con mayor actividad de inhibición de la biopelícula en los ensayos realizados es el péptido DLL-37, pero es necesario profundizar en futuros estudios.

## 5.1 Conclusiones

- Se comprobó que los aislamientos clínicos que provienen de ambientes hospitalarios tienen un porcentaje elevado de generar biopelícula.
- En este estudio se evidenció que las MSCRAMM son muy activas en la etapa de adhesión de la biopelícula, además de encontrarse expresadas desde la fase logarítmica e incluso algunas en la fase estacionaria.
- Todos los péptidos mostraron a las 24 horas de incubación, una actividad hemolítica menor al 5% en todas las concentraciones evaluadas, a las 48 horas fue menor al 10% y a las 72 horas la concentración de 10  $\mu$ M fue la que mayor hemólisis (menor al 20%).
- El porcentaje de viabilidad de los péptidos LL37-1, ALL37-1 y DLL37-1 fue superior al 80% excepto el ACLL37-2 que fue de aproximadamente 60%.
- Los péptidos análogos al LL37, diseñados en este trabajo surgen como alternativa al tratamiento de infecciones asociadas a la formación de biopelículas, el péptido que mostro mayor actividad en los ensayos realizados fue el péptido DLL-37-1 el cual se postula como un péptido promisorio para continuar adelantando futuras investigaciones.

## 5.2 Recomendaciones

- Debido a sus características el LL-37 es útil como plantilla para el desarrollo de fármacos antimicrobianos como alternativa controlar infecciones bacterias por lo tanto se recomienda seguir investigando secuencias que potencialicen su actividad.

- Se debe aumentar el número de muestras evaluadas por biología molecular en PCR en tiempo real y estudiarlas a horas de incubación superiores a las 24 horas.
- Se requieren investigaciones adicionales en vivo para comprender mejor el papel de las actividades de los AMP en la biopelícula.
- Determinar la actividad intracelular que realiza cada uno de los péptidos mediante microscopía fluorescente.

## Bibliografía

1. Hall CW, Mah T. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41:276–301.
2. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.*
3. Wolcott R, Dowd S. The role of biofilms: Are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(SUPPL. 1 S):28–35.
4. Barrero L, Rivera S, Villalobos A. Protocolo de vigilancia en salud pública, Infecciones asociadas a dispositivos. Grup Enfermedades Transm Equipo Infecc Asoc a la Aten en salud. 2016;version 03:3–70.
5. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48(1):585–617.
6. Lianhua Y, Yunchao H, Guangqiang Z, Kun Y, Xing L, Fengli G. The Effect of Iatrogenic *Staphylococcus epidermidis* Intercellular Adhesion Operon on the Formation of Bacterial Biofilm on Polyvinyl Chloride Surfaces. *Surg Infect (Larchmt)* [Internet]. 2014;15(6):768–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25402758>
7. Pei L, Palma M, Nilsson M, Guss B, Flock JI. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* [Internet]. 1999;67(9):4525–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96773/pdf/ii004525.pdf>
8. Arora S, Uhlemann AC, Lowy FD, Hook M. A novel MSCRAMM subfamily in coagulase negative *Staphylococcal* species. *Front Microbiol.* 2016;7(APR):1–9.
9. Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
10. C.B. Ardon, E.P. Prens1, K. Fursted, R.N. Ejaz, J. Shailes, H. Jenssen2 and GBE. Biofilm production and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus*

- epidermidis* strains from Hidradenitis Suppurativa lesions.
11. Betancourth M, Botero JE, S Rivera. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb Med*. 2004;35(1):34-39.
  12. Costerson JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (80- ). 1999;284(May):1318–22.
  13. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2016;26:43–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
  14. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2003;55(1):27–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615953>  
<http://pharmrev.aspetjournals.org.gate2.inist.fr/content/55/1/27.abstract>  
<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/55/1/27.full>
  15. Yin P, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2017;50(4):405–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
  16. Koppen BC, Mulder PPG, Boer L De, Riool M, Drijfhout JW, Zaat SAJ. International Journal of Antimicrobial Agents Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*. 2019;53:143–51.
  17. Bandurska K, Krupa P. Unique features of human cathelicidin LL-37. *Int Union Biochem Mol Biol*. 2015;41(5):289–300.
  18. Hancock REW, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. 2006;24(12):1551–7.
  19. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *Int J Pept*. 2013;2013(November 2016).
  20. Yin LM, Edwards MA, Li J, Yip CM, Deber CM. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem*. 2012;287(10):7738–45.
  21. He Y, Lazaridis T. Activity Determinants of Helical Antimicrobial Peptides: A Large-Scale Computational Study. *PLoS One*. 2013;8(6).
  22. Gherardi G, Di Bonaventura G, Savini V. *Staphylococcal* Taxonomy [Internet]. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Elsevier Inc.; 2018. 1–10 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128135471000017>
  23. David MZ, Daum RS. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. 2017;
  24. Kaiser JC. crossm Branching Out: Alterations in Bacterial Physiology and Virulence Due to Branched-Chain Amino Acid Deprivation. 2018;9(5):1–17.
  25. Almeida GCM, dos Santos MM, Lima NGM, Cidral TA, Melo MCN, Lima KC. Prevalence and factors associated with wound colonization by

- Staphylococcus spp.* and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: A cross-sectional study. BMC Infect Dis. 2014;14(1):1–8.
26. Fairbrother RW. Coagulase production as a criterion for the classification of the *Staphylococci*. J Pathol Bacteriol. 1940;2(50(1)):83–8.
  27. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx)
  28. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H a, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis [Internet]. 2005;5(12):751–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309905702954>
  29. Andrea de S. Monteiro , Bruna L. S. Pinto , Joveliane de M. Monteiro, Rômulo M. Ferreira , Patrícia C. S. Ribeiro SYB, , Sirlei G. Marques LCNS, Wallace R. Nunes Neto, Gabriella F. Ferreira MRQB and AGA. Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. :1–14.
  30. Salud IN de. Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). 2016.
  31. Chen H, Liu Y, Jiang X, Chen M, Wang H. Rapid Change of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in a Chinese Tertiary Care Hospital over a 15-Year Period. 2010;54(5):1842–7.
  32. Yu F, Li T, Huang X, Xie J, Xu Y, Tu J, et al. Virulence gene profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2012;74(4):363–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.015>
  33. Paternina-de R, Israel S, Célia M, Aparecida D, Lima S, Martinez R, et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? 2018;2(5):371–6.
  34. Edslev SM, Westh H, Andersen PS, Skov R, Kobayashi N, Bartels MD, et al. Identification of a PVL-negative SCCmec-IVa sublineage of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2018;24(3):273–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.022>
  35. Spaan AN, Van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: *Staphylococcal* bi-component pore-forming toxins find their receptors. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2017;15(7):435–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.27>
  36. Biomed R, Biomed R. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un

- patógeno. 2006;17(4):287–305.
37. Hecker M, Mäder U, Völker U. From the genome sequence via the proteome to cell physiology - Pathoproteomics and pathophysiology of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol [Internet]. 2018;(December 2017):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.002>
  38. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2002;359(9308):753–9.
  39. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome : genomic island SCC. 2003;6:41–52.
  40. Mazmanian SK. *Staphylococcus aureus* Sortase , an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. Sci mag. 1999;285(1999).
  41. Haim M, Trost A, Maier CJ, Achatz G, Feichtner S, Hintner H. Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B : a new possible virulence factor target. 2018;(2010):3710–21.
  42. Pinilla G, Bautista A, Cruz C, Chavarro B, Navarrete J. Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. NOVA. 2017;15(27):67–75.
  43. Ganesh VK, Liang X, Geoghegan JA, Luisa A, Cohen V, Venugopalan N, et al. Lessons from the Crystal Structure of the S . aureus Surface Protein Clumping Factor A in Complex With Te fi bazumab , an Inhibiting Monoclonal Antibody. EBIOM [Internet]. 2016;13:328–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.027>
  44. Camussone CM, Calvino LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: Relevancia y rol como agentes inmunógenos. Rev Argent Microbiol. 2013;45(2):119–30.
  45. Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, Braughton KR, Scott P, Gardner DJ, et al. Contribution of *Staphylococcus aureus* Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. 2016;1–14.
  46. Vaudaux PE, Franc P, Proctor RA, Devitt DMC, Foster TJ, Albrecht RM, et al. Use of Adhesion-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus* To Define the Role of Specific Plasma Proteins in Promoting Bacterial Adhesion to Canine Arteriovenous Shunts. 1995;63(2):585–90.
  47. Id KAL, Mulcahy ME, Id AMT, Id JAG, Id RMM. Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target. 2019;1–20.
  48. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, Keefe KMO, Walsh EJ, Foster TJ, et al. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping

- Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. 2012;8(12).
49. Josefsson E, Mccrea KW, Eidhin DN, Connell DO, Cox J, Hook M, et al. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. 2019;(1 998):3387–95.
  50. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, et al. Immunization with *Staphylococcus aureus* Clumping Factor B , a Major Determinant in Nasal Carriage , Reduces Nasal Colonization in a Murine Model. 2006;74(4):2145–53.
  51. Hair PS, Foley CK, Krishna NK, Nyalwidhe JO, Geoghegan JA, Timothy J, et al. Results in Immunology Complement regulator C4BP binds to *Staphylococcus aureus* surface proteins SdrE and Bbp inhibiting bacterial opsonization and killing. Elsevier [Internet]. 2013;3:114–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinim.2013.10.004>
  52. Mccrea KW, Hartford O, Davis S, Eidhin DN, Lina G, Speziale P, et al. The serine-aspartate repeat ( Sdr ) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. 2000;(146):1535–46.
  53. Trivedi S, Uhlemann A, Herman-bausier P, Sullivan SB, Sowash MG, Flores EY, et al. The Surface Protein SdrF Mediates *Staphylococcus epidermidis* Adherence to Keratin. 2017;215.
  54. Bowden MG, Heuck AP, Ponnuraj K, Kolosova E, Choe D, Gurusiddappa S, et al. Evidence for the “dock, lock, and latch” ligand binding mechanism of the *Staphylococcal* microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG. J Biol Chem. 2008;283(1):638–47.
  55. Mascari LM, Ross JM. Quantification of *Staphylococcal*-collagen binding interactions in whole blood by use of a confocal microscopy shear-adhesion assay. J Infect Dis. 2003;188(1):98–107.
  56. Madani A, Garakani K, Mofrad MRK. Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin , CNA , and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. 2017;1–19.
  57. Shanks RMQ, Meehl MA, Brothers KM, Martinez RM, Donegan NP, Graber ML, et al. Genetic Evidence for an Alternative Citrate-Dependent Biofilm Formation Pathway in *Staphylococcus aureus* That Is Dependent on Fibronectin Binding Proteins and the GraRS Two-Component Regulatory System. 2008;76(6):2469–77.
  58. Mccourt J, Halloran DPO, Mccarthy H, Gara JPO, Geoghegan JA. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. 2014;353:157–64.
  59. Claro T, Kavanagh N, Foster TJ, Brien FJO, Kerrigan SW. *Staphylococcus epidermidis* serine e aspartate repeat protein G ( SdrG ) binds to osteoblast integrin alpha V beta 3. Microbes Infect [Internet]. 2015;17(6):395–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.02.003>

60. Jan-roblero J, García-gómez E, Jan-roblero J, García-gómez E, Rodríguez-martínez S, Mario E. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *intech open Sci*. 2017;
61. Pietrocola G, Nobile G, Gianotti V, Zapotoczna M, Foster TJ, Geoghegan JA, et al. Molecular Interactions of Human Plasminogen with Fibronectin-binding Protein B ( FnBPB ), a Fibrinogen / Fibronectin-binding Protein from *Staphylococcus aureus*. 2016;291(35):18148–62.
62. Kang M, Ko Y, Liang X, Liu Q, Murray BE. Collagen-binding Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule ( MSCRAMM ) of Gram-positive Bacteria Inhibit Complement Activation via the Classical Pathway \*. 2013;288(28):20520–31.
63. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. 2002;4:481–9.
64. Eiff C Von, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase- negative *Staphylococci*. 2002;2(November):677–85.
65. Edited by John E. Bennett, MD, MACP, Raphael Dolin and Martin J. Blaser M. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 8th ed. Elsevier, editor. Vol. 8. 2015. 3960 p.
66. C. Heilmann, W. Ziebuhr KB. Are coagulase-negative *Staphylococci* virulent? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X18307390>
67. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009;7(8):555–67. Available from: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n8/abs/nrmicro2182.html>
68. Götz F, Yu W, Dube L, Prax M, Ebner P. Excretion of cytosolic proteins (ECP) in bacteria. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2015;305(2):230–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.021>
69. Paharik AE, Kotasinska M, Roy P, Fey PD, Horswill AR, Rohde H. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. 2017;103(January):860–74.
70. S. MARTINEZ-GARCIA, S. RODRIGUEZ-MARTINEZ MEC-D and JCC-D. Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. 2018;1–9.
71. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *FutureMicrobiol* [Internet]. 2010;5(1746-0921 (Electronic)):917–33. Available from: <c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CStaphylokokken-PDFs%5CStaph-2010%5CFey - Olson-Current concepts in biofilm formation of S.epidermidis.pdf>
72. Wang C, Li M, Dong D, Wang J, Ren J, Otto M, et al. Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect*. 2007;9(11):1376–83.

73. Frees D, Qazi SNA, Hill PJ, Ingmer H. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. 2003;48:1565–78.
74. Stahlhut SG, Alqarzaee AA, Jensen C, Fisker NS, Ana R, Pinho MG, et al. The ClpXP protease is dispensable for degradation of unfolded proteins in *Staphylococcus aureus*. Sci Rep [Internet]. 2017;(June):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12122-y>
75. Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. Int J Med Microbiol [Internet]. 2018;309(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>
76. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Coillie E Van, Haesebrouck F, Vlieghe S De. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. J Dairy Sci [Internet]. 2014;97(9):5275–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7775>
77. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. Int J Med Microbiol [Internet]. 2014;304(2):170–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.011>
78. Yarawsky AE, English LR, Whitten ST, Herr AB. The Proline / Glycine-Rich Region of the Biofilm Adhesion Protein Aap Forms an Extended Stalk that Resists Compaction. J Mol Biol [Internet]. 2017;429(2):261–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.017>
79. Alabdullatif M, Ramirez-arcos S. Biofilm-associated accumulation-associated protein (Aap): A contributing factor to the predominant growth of *Staphylococcus epidermidis* in platelet concentrates. 2018;1–10.
80. Sivadon V, Rottman M, Quincampoix J, Prunier E, Mazancourt P De, Bernard L, et al. Polymorphism of the Cell Wall-Anchoring Domain of the Autolysin-Adhesin AtlE and Its Relationship to Sequence Type, as Revealed by Multilocus Sequence Typing of Invasive and Commensal *Staphylococcus epidermidis* Strains. 2006;44(5):1839–43.
81. Sivadon V, Rottman M, Quincampoix J, Prunier E, Moal M Le, Mazancourt P De, et al. Partial atlE Sequencing of *Staphylococcus epidermidis* Strains from Prosthetic Joint Infections. 2009;47(7):2321–4.
82. Rohde H, Frankenberger S, Ulrich Z, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. 2010;89:103–11.
83. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA, Fey PD. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. 2014;4(December):1–10.
84. Biswas LV, U. Simon K, Hentschel, Petra. Gunther T. Friedrich G. Activity of the major *Staphylococcal* autolysin Atl. 2006;259:260–8.

85. Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun*. 2011;79(6):2267–76.
86. Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control* [Internet]. 2014;9(3):Doc23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4184040&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. 2010;75(December 2009):187–207.
88. Le KY, Park MD, Otto M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *Front Microbiol*. 2018;9(FEB):1–8.
89. Otto M. Phenol-soluble modulins. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2014;304(2):164–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.019>
90. Vuong C, Dürr M, Carmondy AB, Peschel A, Klebanoff SJ, Otto M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: Quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol*. 2004;6(8):753–9.
91. Toltzis P. *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative Staphylococci [Internet]. Fifth Edit. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier Inc.; 706-712.e4 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00116-X>
92. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(2–3):133–9.
93. Tormo MÁ, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*. 2005;151(7):2465–75.
94. Xue T, Ni J, Shang F, Chen X, Zhang M. Autoinducer-2 increases biofilm formation via an ica - and bhp -dependent manner in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Microbes Infect* [Internet]. 2015;17(5):345–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.003>
95. Marrie TJ, Nelligan, Joyce CJ. A Scanning and Transmission Electron Microscopic Study of an Infected Endocardial Pacemaker Lead. 1982;66(6):1339–42.
96. J URM, Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Sn S, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711–45.
97. Otto M. *Staphylococcal* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207–

- 28.
98. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(8):481–9.
99. Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2015;6(OCT):1–9.
100. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* [Internet]. 2011;2(5):445–59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
101. Roilides E, Simitsopoulou M, Katragkou A, Walsh TJ. How Biofilms Evade Host Defenses. 2015;1–10.
102. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Asif M, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2017;5–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
103. Paharik AE, Horswill AR, Roy J, City I. The *Staphylococcal* Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. 2016;4(2):1–48.
104. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. 2019;3:1–10.
105. Flemming H, Neu TR, Wozniak DJ, Carolina N, Decho A, Kreft J, et al. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol*. 2007;189(22):7945–7.
106. Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*. 2015;20(4):5286–98.
107. Kim J, Park H, Chung S. Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation. 2012;9818–34.
108. Otto M. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* [Internet]. 2013;64:175–88. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-042711-140023>
109. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1367–78.
110. Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M, Disease I. The biogeography of polymicrobial infection. 2016;14(2):93–105.
111. Toole GO, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. 2000;49–79.
112. Donlan RM, Costerton JW, Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol*. 2002;15(2):167–93.
113. Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135–8.

114. Davies DG, Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, et al. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. 2012;295(1998).
115. C JN. Biofilms bacterianos. 2007;61–72.
116. Stoodley P, Wilson S, Hall-stoodley L, Boyle JD, Lappin-scott HM, Costerton JW. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. 2001;67(12):5608–13.
117. Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. J Hosp Infect [Internet]. 2018;98(2):111–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>
118. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. 2019;1–23.
119. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2018;1. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41579-018-0019-y>
120. Joan A. Geoghegan<sup>1</sup> and Yves F. Dufrêne. Mechanomicrobiology: How Mechanical Forces Activate *Staphylococcus aureus* Adhesion. Trends Microbiol. 2018;26(2015):645–8.
121. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular Interactions in Biofilms. 2002;9(02):859–71.
122. Fitzpatrick F, Humphreys H, Gara JPO. Evidence for icaADBC -Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. 2005;43(4):1973–6.
123. Belloso WH. Historia de los antibióticos. Rev Hosp Ital Buenos Aires [Internet]. 2009;29(2):102–11. Available from: [http://www.hiba.org.ar/archivos/noticias\\_attachs/47/documentos/7482\\_102-111-belloso.pdf](http://www.hiba.org.ar/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf)
124. Zaman S Bin, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus [Internet]. 2017;9(6). Available from: <http://www.cureus.com/articles/7900-a-review-on-antibiotic-resistance-alarm-bells-are-ringing>
125. Fernández L, Hancock REW. Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. 2012;25(4):661–81.
126. Laxminarayan R, Laxminarayan R, Brown G, Brown G. Economics of Antibiotic Resistance: A Theory of Optimal Use. Ther Clin Risk Manag [Internet]. 2001;42(2):183–206. Available from: [citeulike-article-id:2385118%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1006/jjeem.2000.1156](http://dx.doi.org/10.1006/jjeem.2000.1156)
127. Khabbaz R, Cars O, Kumar S, Perovic O, Song J-H, Thamlikitkul V, et al. IMPLEMENTATION OF THE GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL

- RESISTANCE. 2017;(32):1–4. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/news/WHO-GAP-AMR-Newsletter-No-32-Nov-2017.pdf?ua=1>
128. Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;271(2):147–61.
129. Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C, Gyssens IC, So AD, Monnet DL, et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - Time to react is now. *Drug Resist Updat.* 2011;14(2):118–24.
130. Olivares J, Bernardini A, Garcia-leon G, Corona F, Sanchez MB, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. 2013;4(April):1–15.
131. Garau G, Marie A, Guilmi D, Hall BG. Structure-Based Phylogeny of the Metallo-  $\beta$  -Lactamases. 2005;49(7):2778–84.
132. Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials. 2013;72(3):2005–13.
133. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):183–95.
134. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. 2001;358:135–8.
135. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Publ Gr [Internet].* 2013;9(12):761–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1393>
136. Fleming A, B PRSL. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. 1922;306–17.
137. Travkova OG, Moehwald H, Brezesinski G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci [Internet].* 2017;247(May):521–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.001>
138. Biswajit Mishra and Guangshun Wang. Ab Initio Design of Potent Anti-MRSA Peptides based on Database Filtering Technology. *NIH Public Access.* 2012;134(30):12426–9.
139. Declan A. Doyle and B. A. Wallace. THE DYNAMIC NATURE OF GRAMICIDIN. 1996. 327–359 p.
140. Hazam PK, Goyal R, Ramakrishnan V. Peptide based antimicrobials : Design strategies and therapeutic potential. *Prog Biophys Mol Biol [Internet].* 2019;142:10–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.006>
141. Lombardi L, Falanga A, Genio V Del, Galdiero S. A New Hope : Self-Assembling Peptides with Antimicrobial Activity. 2019;
142. Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F, Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F.

- Cationic Amphiphiles , a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold MINIREVIEW Cationic Amphiphiles , a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold □. 2010;54(10).
143. Zeth K, Sancho-vaello E. The Human Antimicrobial Peptides Dermcidin and LL-37 Show Novel Distinct Pathways in Membrane Interactions. 2017;5(November):1–6.
  144. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes : The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* [Internet]. 2016;1858(5):936–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>
  145. Reinhardt A, Neundorf I. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. 2016;
  146. Sato H, Feix JB. Peptide – membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic  $\alpha$  -helical antimicrobial peptides. 2006;1758:1245–56.
  147. Sun E, Belanger CR, Haney EF, Hancock REW. Host defense (antimicrobial) peptides [Internet]. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier Ltd; 2018. 253–286 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00010-7>
  148. Lisowski P, Strzałkowska N, Józ A, Jarczak J, Kos EM, Krzy J, et al. Defensins : Natural component of human innate immunity q. 2013;74:1069–79.
  149. Viviane Silva de Paula and Ana Paula Valente. A Dynamic Overview of Antimicrobial Peptides and Their Complexes. *Mol Microbiol*. 2018;23.
  150. Martin L, Meegern A Van, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. 2015;6(August):1–7.
  151. Boman HG. Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13(1):61–92.
  152. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Publica Mex*. 2006;48(1):62–71.
  153. Gwyer E, Silke F, Davidson DJ. Cationic Host Defence Peptides : Potential as Antiviral Therapeutics. 2013;479–93.
  154. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(6):536–47.
  155. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37 , the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* [Internet]. 2012;280(1):22–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.009>
  156. Id ZK, Naseem M, Asiri FYI, Khan RS, Sahibzada HA, Zafar MS. Significance

- and Diagnostic Role of Antimicrobial Cathelicidins (LL-37) Peptides in Oral Health. 2017;1–11.
157. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2016;68(4):802–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.015>
  158. Borowski RG Von, Macedo AJ, Cristina S, Gnoatto B. Peptides as a strategy against bio fi lm-forming microorganisms: Structure- activity relationship perspectives. *Eur J Pharm Sci*. 2018;114(November 2017):114–37.
  159. Sim J, Kim S, Lee J, Lim H, Hyung H, Park Z, et al. A significantly enhanced antibacterial spectrum of D-enantiomeric lipopeptide bactenecin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2019;514(2):497–502. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.153>
  160. Peptides SA. Synthetic Antibiofilm Peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1858(5):1061–9.
  161. Du Y, Bonsu E. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Med Chem (Los Angeles)*. 2015;7:647–71.
  162. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989;42:872–4.
  163. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):996–1006.
  164. Guzmán F, Barberis S. Peptide synthesis : chemical or enzymatic. 2007;10(2).
  165. Rodríguez V, Román JT, Fierro R, Rivera ZJ, García JE. Hydrazine hydrate : A new reagent for Fmoc group removal in solid phase peptide synthesis. 2019;60:48–51.
  166. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on. 2006;1(2):581–5.
  167. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):16–21.
  168. Lau SYM, Taneja AK, Hodges S. Synthesis of a Model Protein of Defined Secondary and Quaternary Structure. 1984;
  169. Secchi C, Lúcia A, Antunes S, Reus L, Perez R, Cantarelli VV, et al. Identification and Detection of Methicillin Resistance in Non -Epidermidis Coagulase-Negative Staphylococci. 2008;12:316–20.
  170. Salud IN de. SIVIGILA [Internet]. Available from: [http://portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/documentos/Docs\\_1.php](http://portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/documentos/Docs_1.php)
  171. El-khier NTA, El-kazzaz SS, El-ganainy AA. Phenotypic and Genotypic Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis* Isolates from

- Retrieved Orthopaedic Implants and Prostheses Phenotypic and Genotypic Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Retrieved Orthopaedic Implants and Prostheses. 2015;(July).
172. Haddad O, Merghni A, Elargoubi A, Rhim H, Kadri Y, Mastouri M. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. 2018;4–11.
  173. T Mathur, S Singhal, S Khan, D J Upadhyay, T Fatma AR. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. Med Microbiol. 2006;24:25–9.
  174. Resistance D, Sheikh AF, Asareh A, Dezfuli Z, Navidifar T, Fard SS, et al. Association between biofilm formation , structure and antibiotic resistance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonatal septicemia in southwest Iran. Infect Drug Resist. 2019;1771–82.
  175. Kord M, Ardebili A, Jamalán M, Jahanbakhsh R, Behnampour N. Evaluation of Biofilm Formation and Presence of Ica Genes in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates. Osong Public Heal Res Perspect. 2018;9(4):160–6.
  176. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by *Staphylococcal* clinical isolates. BMC Res Notes [Internet]. 2018;4–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3820-9>
  177. Fitzpatrick F, Humphreys H, Gara JPO. The genetics of *Staphylococcal* biofilm formation — will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection ? Eur Soc Clin Infect Dis [Internet]. 2005;11(12):967–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01274.x>
  178. Lee J, Bae Y, Han A, Lee S. Development of Congo red broth method for the detection of bio fi lm-forming or slime-producing *Staphylococcus sp*. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2016;73:707–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.023>
  179. Şahín R, Kaleli İ. Comparison of Genotypic and Phenotypic Characteristics in Biofilm Production of *Staphylococcus aureus* Isolates. 2018;52(2):111–22.
  180. Cruzado-bravo MLM, Cristina N, Silva C, Xavier M, Oliveira G, Silva E, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus spp*. isolated from mastitis milk and cheese processing : Study of adherence and biofilm formation. Food Res Int [Internet]. 2019;122(January):450–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.017>
  181. Dias T, Kaiser L, Menezes E, Regina K, Leonor E, Maciel N, et al. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. 2013;75:235–9.
  182. Agarwal A, Jain A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of *Staphylococci*. 2015;(August 2013).

183. Singh, A. K., Prakash, P., Achra, A., Singh, G. P., Das, A., & Singh RK. Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *ournal Glob Infect Dis*. 2017;9(3):93–101.
184. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54881–6.
185. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. 2004;186(3):722–9.
186. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA, et al. Glucose-Related Dissociation between *icaADBC* Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis* : Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. 2003;185(9):2879–86.
187. Nasr RA, Abushady HM, Hussein HS. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of *Staphylococci*. *Egypt J Med Hum Genet* [Internet]. 2012;13(3):269–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.04.007>
188. Vitko NP, Grosser MR, Khatri D, Lance TR, Richardson AR. Expanded Glucose Import Capability Affords *Staphylococcus aureus* Optimized Glycolytic Flux during Infection. 2016;7(3):1–11.
189. Waldrop R, McLaren A, Bse FC, Mclemore R. Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose in Vitro. 2014;3305–10.
190. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. 2017;(October 2016):1–13.
191. Wang F, Wu P, Chen S, Pcr G, Mix M. Distribution of virulence genes in bacteremic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from various sources. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2019;52(3):426–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.01.001>
192. Evgeni V. Sokurenko, Viola Vogel and WET. Catch bond mechanism of force-enhanced adhesion: counter- intuitive, elusive but ... widespread? *NIH Public Access*. 2008;4(4):314–23.
193. Valotteau C, Prystopiuk V, Pietrocola G, Rindi S, Peterle D, Filippis V De, et al. Single-Cell and Single-Molecule Analysis Unravels the Multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Cna. 2017;11:2160–70.
194. Feuillie C, Formosa-dague C, Hays LMC, Vervaeck O, Derclaye S. Molecular interactions and inhibition of the *Staphylococcal* biofilm-forming protein SdrC. 2017;114(14).
195. Peetermans M, Vanassche T, Liesenborghs L, Claes J, Velde G Vande, Kwiecinski J, et al. Plasminogen activation by staphylokinase enhances local spreading of *S . aureus* in skin infections. 2014;1–12.
196. Barbu EM, Mackenzie C, Foster TJ, Diseases I, Genetics M. SdrC induces

- Staphylococcal* biofilm formation through a homophilic interaction. HHS Public Acces. 2017;94(1):172–85.
197. Foster TJ. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. Trends Microbiol [Internet]. 2019;xx(xx):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.007>
  198. Ferrata V, Foundation SM. The Role of Ionic Interactions in the Adherence of the *S. epidermidis* Adhesin SdrF to Prosthetic Material. NIH Public Access. 2014;338(1):24–30.
  199. Walker JN, Pinkner CL, Lynch AJL, Ortbal S, Jerome S, Hultgren SJ, et al. Deposition of Host Matrix Proteins on Breast Implant Surfaces Facilitates *Staphylococcus Epidermidis* Biofilm Formation: In Vitro Analysis. 2019;
  200. Herman-bausier P, Dufrêne YF. Atomic force microscopy reveals a dual collagen-binding activity for the *Staphylococcal* surface protein SdrF. 2016;(2015):611–21.
  201. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. 2006;1(6):2876–90.
  202. Agudelo FAG. Evaluación de la actividad antibiopelícula de péptidos sintéticos análogos a catelicidina humana LL-37 en aislamientos clínicos de *Staphylococcus spp.* en Bogotá Colombia. Universidad Nacional de Colombia; 2010.
  203. Gabrielson J, Hart M, Jarelo A, Ku I, Mckenzie D, Mo R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. 2002;50:63–73.
  204. McGrath CMPQW. An Evaluation of Three New-Generation Tetrazolium Salts for the Measurement of Respiratory Activity in Activated Sludge Microorganisms. Microb Ecol [Internet]. 2005;49(3):379–87. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-004-0012-z>
  205. Vallejo E, Augusto F. APLICACIÓN DE SALES DE TETRAZOLIO DE NUEVA GENERACIÓN ( XTT ) PARA LA ESTIMACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. Acta Biológica Colomb [Internet]. 2010;15:75–90. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027886006.pdf>
  206. Giske CG, Nelson A, Ro U. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. 2010;50:211–5.
  207. George T Yates, Smotzer T. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. 2007;244:511–7.
  208. Lee H, Kim K, Lee S, Han M, Yoon Y. Growth kinetics of *Staphylococcus aureus* on Brie and Camembert cheeses. 2014;252–6.
  209. Sahab S, Nor M, Karunanidhi A, Belkum A Van, Than L, Lung T, et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ). Infect Genet Evol

- [Internet]. 2013;18:106–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.002>
210. Ythier M, Waridel P, Panchaud A, Majcherczyk P, Quadroni M, Moreillon P. Proteomic and Transcriptomic Profiling of *Staphylococcus aureus* Surface LPXTG-proteins : Correlation with agr Genotypes and Adherence Phenotypes \* □. 2012;1123–39.
  211. Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of Clumping Factor A in Attached and Unattached *Staphylococcus aureus* In Vitro and during Device-Related Infection. 2002;70(6):2758–62.
  212. Beenken KE, Dunman PM, Mcaleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. 2004;186(14):4665–84.
  213. Sthanikam Yeswanth, Abhijit Chaudhury PVGKS. Quantitative Expression Analysis of SpA , FnbA and Rsp Genes in *Staphylococcus aureus* : Actively Associated in the Formation of Biofilms. Curr Microbiol. 2017;
  214. Jenkins A, Diep A, Mai TT, Vo NH, Warrener P, Suzich J, et al. Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. 2015;6(1):1–10.
  215. Sitkiewicz I, Babiak I. Characterization of transcription within sdr region of *Staphylococcus aureus*. 2011;409–16.
  216. Sellman BR, Timofeyeva Y, Nanra J, Scott A, Fulginiti JP, Matsuka Y V, et al. Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG Increases following Exposure to an In Vivo Environment. 2008;76(7):2950–7.
  217. Hartford O, Brien LO, Schofield K, Wells J, Foster TJ. The Fbe ( SdrG ) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. 2001;(2001):2545–52.
  218. Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, et al. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. 2019;(2005):1453–64.
  219. Li H, Anuwongcharoen N, Malik AA, Prachayasittikul V. Roles of D -Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides. Int J Mol Sci. 2016;17(i):1–27.
  220. Kelkar DA, Chattopadhyay A. The gramicidin ion channel : A model membrane protein. Biochim Biophys Acta. 2007;1768(2007):2011–25.
  221. Young E, Rajasekaran G, Yub S. LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its D -amino acid substituted analogs with cell selectivity , anti-biofilm activity , synergistic effect with conventional antibiotics , and anti- inflammatory activity. Eur J Med Chem [Internet]. 2017;136:428–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.028>