

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E
INMUNOMODULADORA DEL PÉPTIDO WB14_F FRENTE A *Pseudomonas*
aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES

POR:

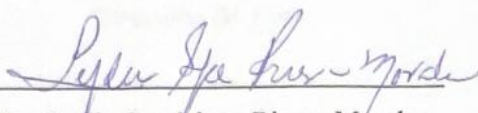
L.B.G. ANA CECILIA ESPINOSA RÍOS

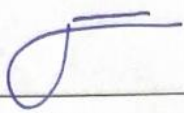
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

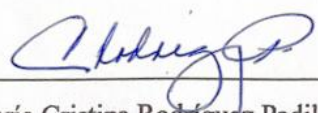
SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., 2025

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E
INMUNOMODULADORA DEL PÉPTIDO WB14_F FRENTE A *Pseudomonas*
aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES

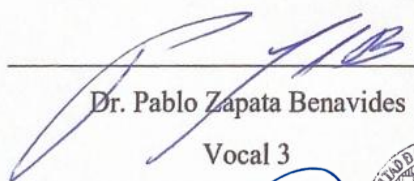
Comité de Tesis

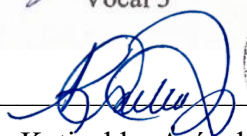

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Presidenta


Dr. José Manuel Vázquez Guillen
Secretario


Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Vocal 1


Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
Vocal 2

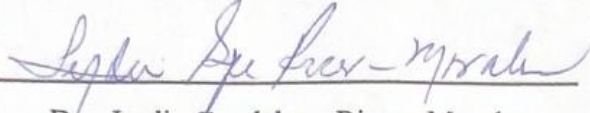

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal 3


Dra. Katiushka Arévalo Nino
Subdirectora de posgrado

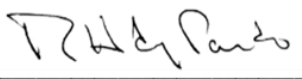

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE SONORA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E
INMUNOMODULADORA DEL PÉPTIDO WB14_F FRENTE A *Pseudomonas*
aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTES

Dirección de Tesis



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Director



Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Director externo

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme concedido la fuerza, la salud y la perseverancia necesarias para alcanzar esta meta, porque su fidelidad es grande y constante. Por renovar mi esperanza cuando me sentí vencida y enseñarme a confiar en sus promesas.

A mi familia, especialmente a mi madre, Aracely Ríos Atilano, por su amor incondicional, su apoyo incansable y por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo. Por comprender el tiempo que implicaba dedicar a este trabajo y confiar totalmente en lo que hacía.

A mi comité de tesis, especialmente a mi Directora, la Dra. Lydia G. Rivera Morales, por su generosa guía, su plena confianza y por fomentar siempre un ambiente de crecimiento académico y personal. Al Dr. José M. Vázquez Guillen, a la Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla, A la Dra. Itza E. Luna Cruz y al Dr. Pablo Zapata Benavides.

Al Dr. Rogelio E. Hernández Pando que fue mi Director externo y al Dr. Tonatiuh Melgarejo de la Western University of Health Sciences (California, EUA), por su generosa donación del péptido WB14_F utilizado en esta tesis, así como por su valioso apoyo y disposición para compartir su experiencia científica, elementos esenciales para el desarrollo de este trabajo.

A otros investigadores que me inspiraron y apoyaron, el Dr. José Luis Zacarías Hernández, por su asesoría técnica, ayudarme a conseguir el material que necesitaba y confiar en mí cuando me sentía perdida. A la Dra. Diana G. Zárate Triviño y la Dra. Diana E. Caballero Hernández, porque me orientaron en clase y me prestaron equipos de laboratorio y lugares de trabajo. Así como también a compañeros de estos laboratorios que me apoyaron, como el M.C. Bruno Valadés a quien agradezco su tiempo y disposición para abrirme el laboratorio y prestarme los equipos que necesitaba. Al Dr. Enrique Wenceslao Coronado Aceves por su valioso tiempo y conocimiento.

A todos mis amigos, dentro y fuera del laboratorio, y a mis compañeros de generación que pronto se convirtieron en amigos, por su apoyo y cariño que le dieron equilibrio a esta etapa: Jessica B. Amaro Fuentes, David H. Suarez Garza, Vianney J. del Mercado González, Juan P. Molina Morales, Daniel E. Rodríguez Espinosa, Mara V. Rodríguez Rodríguez y Lenin

A. Ledesma Sepulveda. Gracias, amigos.

A Gustavo A. Garza Hernández, quien desde el primer día en el laboratorio me recibió con disposición para capacitarme. Por todo su amor, porque con paciencia siempre me escuchó, me alentó y celebró mis pasos, y por compartir con entusiasmo el trabajo del día a día. A Devany A. Treviño Santos, con quien para clases formé un excelente equipo de trabajo, que fue seguro y enriquecedor. Por escuchar sobre mis avances y apoyarme, pero también por las pláticas y risas que aligeraban el trabajo. A Vanessa R. Villafaña Santiago, a quien acompañé como tutora durante su tesis de licenciatura y lo largo de ese proceso compartido, que a veces se complicaba, su compromiso y resiliencia siempre me inspiró. Por su disposición para hacer una y otra vez conmigo experimentos fallidos, porque siempre vimos lo bueno en lo malo y nos reíamos para no llorar.

GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios,

por ser mi guía constante, por sostenerme en cada dificultad y darme fuerzas cuando las mías no fueron suficientes. Gracias por iluminar mi camino, por tu amor incondicional y por permitir que este proyecto llegara a su término. Todo honor y toda gloria sean para Ti.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA.....	7
INDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Resistencia antimicrobiana (RAM): panorama general y mecanismos	16
2.1.1. Impacto global y causas del aumento de RAM.....	16
2.1.2. Mecanismos de resistencia bacteriana.....	16
2.2. Bacterias del grupo ESKAPE: importancia clínica.....	17
2.2.1. Definición y relevancia hospitalaria.....	17
2.2.2. Epidemiología reciente en México.....	18
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
2.2.5. Infecciones asociadas y respuesta inmune del hospedero	29
2.3. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	32
2.3.1. Definición, mecanismos de acción y ventajas terapéuticas.....	32
2.3.2. Actividad antibacteriana e inmunomoduladora.....	32
2.3.3. Catelicidinas: estructura, mecanismos y estudios previos	35
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	44
5.1. Objetivo general	44
5.2. Objetivos específicos.....	44
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
6.1. Obtención de las muestras bacterianas.....	45
6.2. Cultivo e identificación de las bacterias.....	45
6.2.1. Cultivo.....	45
6.2.2. Tinción Gram	45
6.2.3. Pruebas bioquímicas.....	45
6.2.4. Cinética de crecimiento.....	46
6.3. Clasificación de resistencia antimicrobiana	46
6.4. Criopreserva de los aislados.....	46
6.5. Estandarización de inóculo.....	47

6.6.	Preparación del péptido WB14_F	47
6.7.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de WB14_F	48
6.8.	Evaluación de la actividad hemolítica de WB14_F	52
6.9.	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humanas.....	52
6.10.	Evaluación de la actividad citotóxica de WB14_F.....	53
6.11.	Ensayo de modulación inmunológica de WB14_F	54
7.	RESULTADOS.....	55
7.1.	Cultivo e identificación de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i>	55
7.2.	Clasificación de resistencia antimicrobiana de los aislados	57
7.3.	Estandarización del inóculo para cuenta en placa	58
7.4.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de WB14_F	59
7.5.	Evaluación de la actividad hemolítica de WB14_F.....	64
7.6.	Evaluación de la actividad citotóxica de WB14_F.....	65
7.7.	Evaluación de la modulación inmunológica de WB14_F	66
8.	DISCUSIÓN	68
9.	CONCLUSIONES	72
10.	PERSPECTIVAS	73
11.	ANEXO.....	74
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos bacterianos de resistencia a antibióticos	17
Figura 2. Bacterias que conforman al grupo ESKAPE	18
Figura 3. Principales microorganismos aislados en IAAS	19
Figura 4. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 5. Composición de la membrana celular de <i>K. pneumoniae</i>	28
Figura 6. Permeabilización de la membrana celular por ZY4.....	33
Figura 7. Estructura del gen de las catelicidinas y su procesamiento	36
Figura 8. Modelos de los mecanismos de acción de las catelicidinas.....	37
Figura 9. Disrupción de membrana celular de <i>M. tuberculosis</i> por K9CATH	39
Figura 10. Actividad antibacteriana de WBCATH sobre cepa H37Rv y cepa MDR de <i>M. tuberculosis</i>	40
Figura 11. Producción de TNF α e IL-12 por macrófagos infectados con Mtb H37Rv tratados con WBCATH (160 μ g/mL).	41
Figura 18. Curva de crecimiento de los aislados bacterianos.	57
Figura 19. Siembra en placa de suspensiones bacterianas	59
Figura 23. Evaluación del efecto antimicrobiano del plasma derivado de células inmunes sanguíneas humanas expuestas a WB14_F (25 μ g/mL) sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i>	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación bioquímica de <i>P. aeruginosa</i>	21
Tabla 2. Identificación bioquímica de <i>K. pneumoniae</i>	27
Tabla 3. Resistencia de P012 a los grupos de antibióticos establecidos para la clasificación de resistencia.	57
Tabla 4. Resistencia de K065 a los grupos de antibióticos establecidos para la clasificación de resistencia.	58
Tabla 5. Suspensiones bacterianas y su crecimiento en placa.....	59
Tabla 6. Porcentaje de hemólisis inducida por el péptido WB14_F en eritrocitos humanos a diferentes concentraciones.....	65
Tabla 7. Porcentaje de PBMC viables y no viables tratadas con diferentes concentraciones de WB14_F.	65

ABREVIATURAS

AA – Ácido Acético

AD – Agua Destilada

AMP – *Antimicrobial Peptide* (Péptido Antimicrobiano)

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análisis de Varianza)

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAP18 – *Catelicidina Humana* LL-37

CMB – Concentración Mínima Bactericida

CMI – Concentración Mínima Inhibitoria

DO – Densidad Óptica

IAAS – Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

IL – Interleucina

LPS – Lipopolisacárido

MDR – *Multidrug-Resistant* (Multirresistente)

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (Células Mononucleares de Sangre Periférica)

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* (Solución Salina Tamponada con Fosfatos)

PDR – *Pan Drug-Resistant* (Panresistente)

RAM – Resistencia Antimicrobiana

TLR – Toll-Like Receptor

TNF- α – Tumor Necrosis Factor alfa

UFC – Unidades Formadoras de Colonias

UMAE – Unidad Médica de Alta Especialidad

WBCATH – Catelicidina del búfalo de agua

WB14_F – Péptido catelicidina sintético derivado de búfalo de agua

XDR – *Extensively Drug-Resistant* (Con resistencia extendida)

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana limita la eficacia de los tratamientos convencionales frente a infecciones causadas por bacterias multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. En este proyecto, se evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana, hemolítica, citotóxica e inmunomoduladora del péptido WB14_F frente a cepas de referencia drogosensibles y multirresistentes de ambas especies bacterianas. En agua destilada, WB14_F presentó una CMI $< 50 \mu\text{g/mL}$ y una CMB $= 50 \mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa* ATCC 27853; aunque esta concentración provocó un 21% de reducción de resazurina. No se registró una CMI sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883 en el mismo medio, ni se detectó actividad bactericida significativa. En aislados MDR, WB14_F (ácido acético 0.01 %) disminuyó la densidad óptica de forma dosis-dependiente; sin embargo, solo $50 \mu\text{g/mL}$ en agua destilada redujo a 25 % la viabilidad de *P. aeruginosa* P012 y no afectó a *K. pneumoniae* K065. El solvente condicionó la potencia, ya que las formulaciones en ácido acético 0.1 % + NaCl 0.85 % produjeron la mayor inhibición sobre *K. pneumoniae* ATCC a 200–100 $\mu\text{g/mL}$. La hemólisis de WB14_F en agua destilada fue $\leq 8.1 \%$ a 200 $\mu\text{g/mL}$ y $\leq 0.4 \%$ a 6.25 $\mu\text{g/mL}$; sobre PBMC humanas, la viabilidad descendió de 72.22 % (0.391 $\mu\text{g/mL}$) a 25 % (50 $\mu\text{g/mL}$) de forma dosis-dependiente. El plasma de células expuestas a 25 $\mu\text{g/mL}$ no mostró efecto antimicrobiano adicional. En conjunto, WB14_F posee actividad bactericida moderada y dependiente del vehículo contra *P. aeruginosa* drogosensible y cierto efecto sobre el aislado multirresistente, con baja hemólisis pero citotoxicidad creciente a altas dosis y sin evidencia de activación funcional de plasma inmunitario bajo las condiciones evaluadas.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance limits the effectiveness of conventional treatments against infections caused by multidrug-resistant bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. This project evaluated *in vitro* the antimicrobial, hemolytic, cytotoxic and immunomodulatory activity of the peptide WB14_F against reference drug-susceptible and multidrug-resistant (MDR) strains of both species. In distilled water, WB14_F displayed an MIC < 50 µg/mL and an MBC = 50 µg/mL against *P. aeruginosa* ATCC 27853, while producing a 21 % resazurin reduction at that concentration. No MIC or significant bactericidal activity was observed for *K. pneumoniae* ATCC 13883 under the same conditions. In MDR isolates, WB14_F (0.01 % acetic acid) decreased optical density in a dose-dependent manner; however, only 50 µg/mL in distilled water reduced *P. aeruginosa* P012 viability to 25 % and had no effect on *K. pneumoniae* K065. Solvent choice modulated potency: formulations in 0.1 % acetic acid + 0.85 % NaCl produced the strongest inhibition of *K. pneumoniae* ATCC at 200–100 µg/mL. Hemolysis in distilled water was ≤ 8.1 % at 200 µg/mL and ≤ 0.4 % at 6.25 µg/mL; human PBMC viability fell from 72.22 % (0.391 µg/mL) to 25 % (50 µg/mL) in a dose-dependent manner. Plasma from cells exposed to 25 µg/mL showed no additional antimicrobial effect. Overall, WB14_F exhibits moderate, vehicle-dependent bactericidal activity against drug-susceptible *P. aeruginosa* and partial activity on the MDR isolate, with low hemolysis but increasing cytotoxicity at high doses and no evidence of functional immune-plasma activation under the conditions tested.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad de los microorganismos, como bacterias, virus, hongos y parásitos, para resistir los efectos de los fármacos antimicrobianos que anteriormente eran efectivos para su tratamiento. Este fenómeno se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel global, ya que limita las opciones de tratamiento y aumenta la morbilidad y mortalidad (Ortiz-Brizuela *et al.*, 2023). Se estima que actualmente casi 1.3 millones de personas mueren anualmente por infecciones causadas por bacterias resistentes, y que para el año 2050 esta cifra aumentará a 10 millones, convirtiéndose en la principal causa de muerte a nivel mundial (Souza *et al.*, 2024).

Entre los patógenos resistentes más preocupantes se encuentra el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), que lidera la lista de prioridades de la Organización Mundial de la Salud para la investigación de nuevos fármacos (Santos *et al.*, 2020).

Pseudomonas aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae* son bacterias Gram negativas, oportunistas que pueden causar Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), especialmente, en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Qin *et al.*, 2022; Mohan *et al.*, 2024). Debido a la alta resistencia de estas bacterias contra una amplia gama de antibióticos que ocasionan una lucha complicada y costosa se deben explorar terapias alternativas y la investigación en la actividad biológica de péptidos antimicrobianos (AMP), esenciales en la inmunidad innata de muchos organismos se ha vuelto un campo de estudio prometedor. Las catelicidinas son péptidos catiónicos cuya actividad antimicrobiana e inmunomoduladora puede contribuir en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes. Si bien, el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) no es inmune a infecciones por *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, son animales que cuentan con AMP que resultan de una adaptación evolutiva debido a la exposición de estos a ambientes hostiles donde abundan los microorganismos patógenos (Palacios *et al.*, 2023).

2. ANTECEDENTES

2.1. Resistencia antimicrobiana (RAM): panorama general y mecanismos

2.1.1. Impacto global y causas del aumento de RAM

El uso inadecuado de agentes antimicrobianos, así como la exposición a estos en la vida diaria, incluyendo, por ejemplo, el uso de antibióticos para el ganado en la industria de alimentos, ha conducido a la aparición de microorganismos resistentes. Las infecciones bacterianas para las que ya existían antibióticos efectivos, ocasionan ahora enfermedades con pronósticos desfavorables (Chang *et al.*, 2021). Además, es importante destacar que la pandemia de COVID-19 intensificó el uso de antibióticos y aceleró el desarrollo de resistencia a patógenos. Los efectos de la morbilidad o mortalidad relacionada con la RAM son particularmente graves en los países de ingresos bajos y medios, debido a que se conlleva a un aumento sustancial en los gastos de atención médica (hospitalizaciones prolongadas, los tratamientos intensivos, la discapacidad y la muerte. La RAM plantea amenazas importantes para la salud para quienes la aparición de infecciones resistentes a los medicamentos se acelera por el uso de antibióticos profilácticos y la necesidad de tratamientos antibióticos prolongados (Ho *et al.*, 2025)

2.1.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

En bacterias, la RAM puede ser intrínseca, adquirida y/o adaptativa. La resistencia intrínseca es parte de las características específicas del microorganismo; la resistencia adquirida resulta de la transferencia horizontal de genes de resistencia de otras bacterias; y la resistencia adaptativa es desarrollada mediante mutaciones espontáneas en su genoma que con el tiempo resultan beneficiosas para resistir a un antibiótico (Camacho-Silvas *et al.*, 2021; Coleman *et al.*, 2020).

Los mecanismos de transferencia horizontal que median la adquisición de genes son la transducción, la conjugación y la transformación. La transducción es el proceso mediante el cual un bacteriófago introduce material genético al interior de una célula bacteriana y éste se incorpora a su genoma; la conjugación ocurre mediante el contacto directo entre dos células bacterianas, una donadora y la otra receptora que permite la transferencia de plásmidos así como de elementos integrativos; y la transformación ocurre cuando el material genético se libera mediante la lisis de la célula donadora y la célula receptora lo incorpora a su genoma (Chávez-Jacobo, 2020).

Las bacterias pueden contar con bombas de eflujo, que son proteínas transmembranales que expulsan activamente los antibióticos reduciendo su concentración intracelular, disminuyendo su eficacia; pueden mutar secuencias de moléculas diana para los antibióticos reduciendo la afinidad de estos con su sitio de unión; o pueden producir enzimas que modifican químicamente los antibióticos. No obstante, las bacterias también pueden impedir la entrada del antibiótico cuando ocurren mutaciones en la permeabilidad de la membrana externa, específicamente en las porinas, las cuales funcionan como canales que una vez mutadas van a dificultar la entrada de los antibióticos al interior de la célula (Idris y Nadzir, 2023) (**Figura 1**).

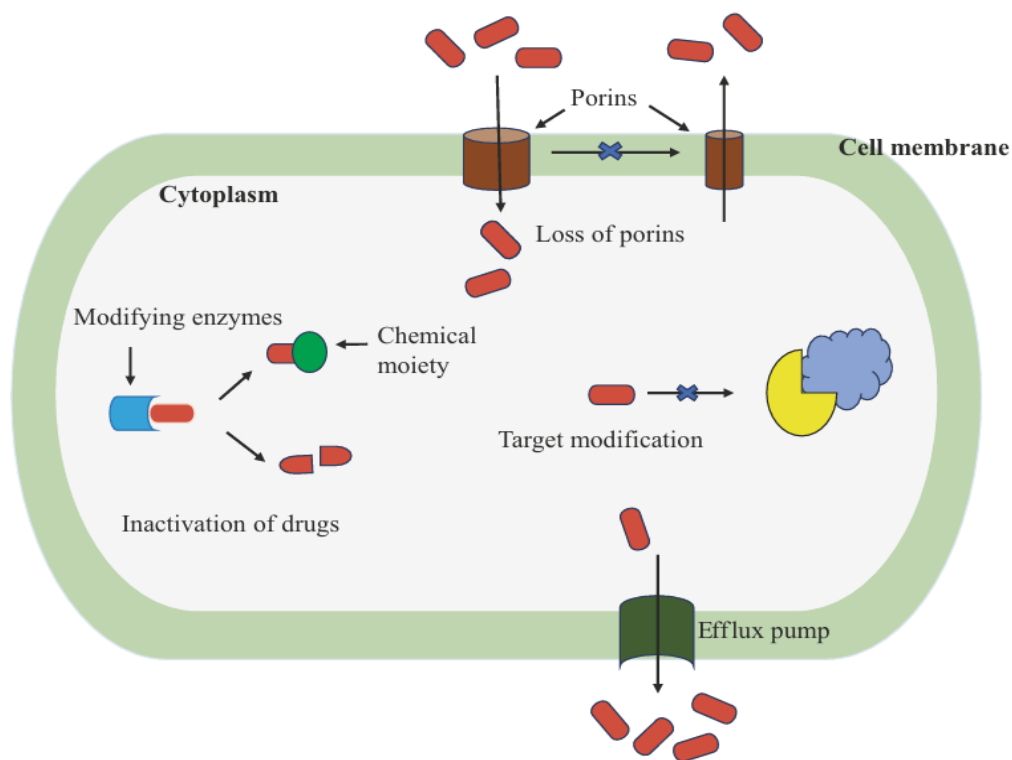


Figura 1. Mecanismos bacterianos de resistencia a antibióticos. Cuando el antibiótico entra en la célula, la bacteria podría expulsarlo mediante bombas de eflujo, alterar la estructura de la molécula diana a la que se une el antibiótico o modificar enzimas que alteran o destruyen el antibiótico. Por otro lado, también podría perder o modificar sus porinas para bloquear la entrada del antibiótico a la célula. **Fuente:** Salim y colaboradores (2024).

2.2. Bacterias del grupo ESKAPE: importancia clínica

2.2.1. Definición y relevancia hospitalaria

Los principales patógenos resistentes son un grupo de bacterias denominado ESKAPE, acrónimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp (Santos *et al.*,

2020) (**Figura 2**). Estas bacterias tienen la capacidad de "escapar" de los efectos de antibióticos comúnmente utilizados, lo que las hace especialmente problemáticas en entornos hospitalarios, donde los pacientes vulnerables con sistemas inmunitarios comprometidos están en mayor riesgo de infección. Por este motivo, las bacterias ESKAPE ocupan las primeras posiciones de prioridad en la lista de la Organización Mundial de la Salud para la investigación de nuevos fármacos (Joseph *et al.*, 2024).

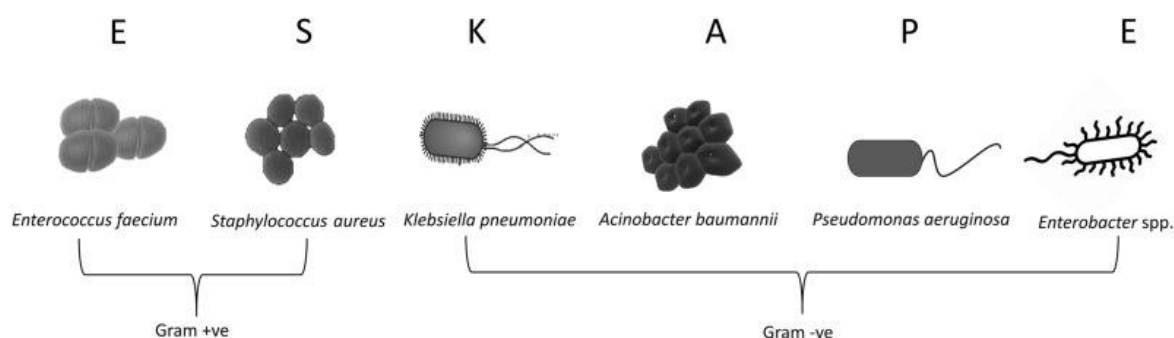


Figura 2. Bacterias que conforman al grupo ESKAPE. Bacterias Gram positivas (E: *Enterococcus faecium*, S: *Staphylococcus aureus*); Bacterias Gram negativas (K: *Klebsiella pneumoniae*, A: *Acinetobacter baumannii*, P: *Pseudomonas aeruginosa*, E: *Enterobacter spp.*). **Fuente:** Idris y Nadzir (2023).

Las bacterias ESKAPE predominan como agentes causales de IAAS, las cuales se definen como infecciones localizadas o sistémicas provocadas por uno o varios agentes infecciosos, que no estaban presentes en el paciente, antes de su ingreso en el centro de atención de la salud. Se manifiestan al menos 48 horas después del ingreso y hasta 72 horas posteriores y ocurren hasta en el 10% de los pacientes hospitalizados. Las IAAS generan un incremento en la morbilidad, mortalidad, tiempo de hospitalización y costos (Ramos-Cevallos *et al.*, 2022).

De acuerdo con Ramos-Cevallos y colaboradores (2022), las bacterias más frecuentemente implicadas en IAAS son: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus coagulasa negativo* (coagulasa negativo), *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.* y *K. pneumoniae*.

2.2.2. Epidemiología reciente en México

En México, el Boletín de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica informó los 10 principales microorganismos aislados en IAAS durante enero 2025 y podemos observar que todas las bacterias ESKAPE

se posicionan dentro de esta lista. *P. aeruginosa* ocupa el 2do lugar con 791 aislados y *K. pneumoniae* el 4to lugar con 488 aislados (**Figura 3**).

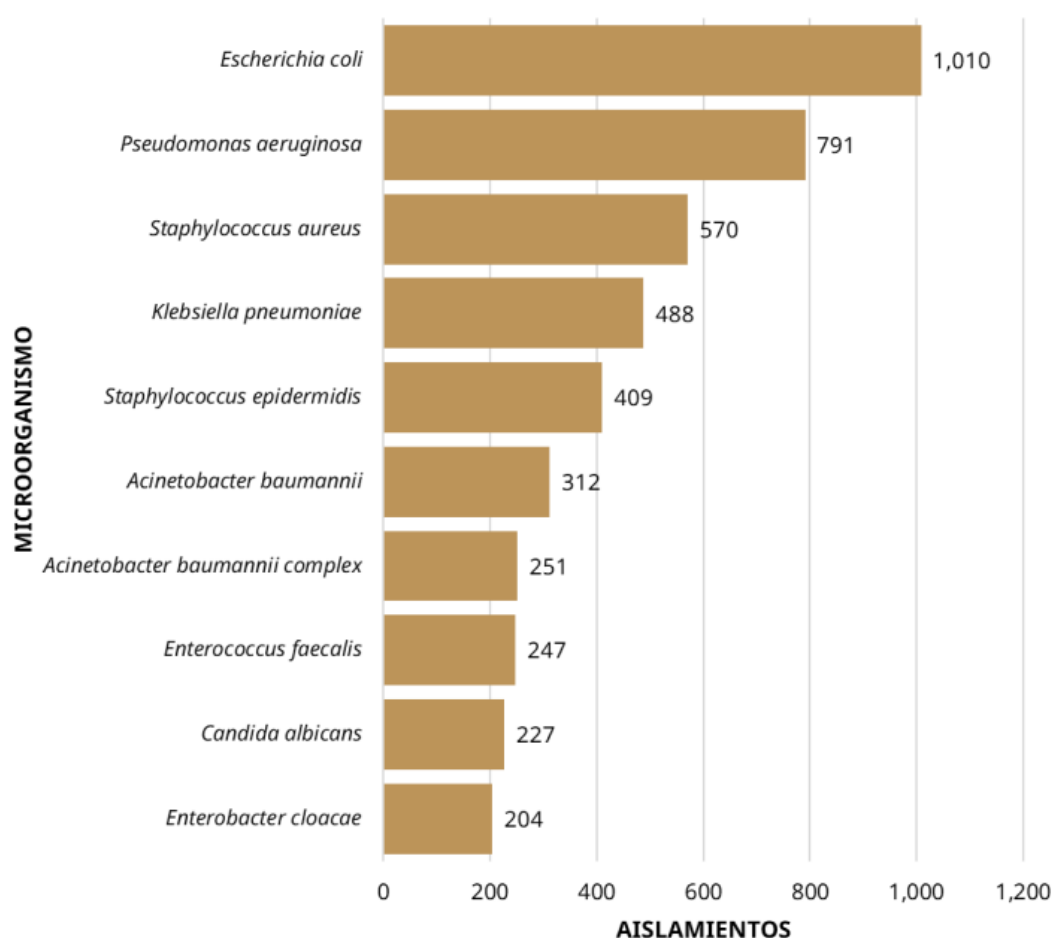


Figura 3. Principales microorganismos aislados en IAAS. Reportes enero 2025. Fuente: Boletín de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (2025).

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.3.1. Generalidades y factores de virulencia

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa del filo Proteobacteria, clase Gamma proteobacteria (Ramírez *et al.*, 2021), cuya morfología microscópica consiste en bacilos de un tamaño aproximado de 1 μm por 5 a 7 μm con extremos redondeados (De la Maza *et al.*, 2020). En cuanto a su morfología macroscópica se observa como colonias grandes y planas que tienden a extenderse. Su tasa de crecimiento es generalmente alta, lo que permite una rápida proliferación. Tiene la capacidad para producir un pigmento llamado piocianina, que contribuye al color azul-verde observado en las colonias. Esta pigmentación, dada por la piocianina, exclusiva de esta bacteria, simplifica la identificación preliminar (Parasuraman *et al.*, 2024).

P. aeruginosa es aerobia pero puede crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones en lugar del oxígeno. Es una bacteria no fermentadora que obtiene su energía de la oxidación principalmente de la glucosa (Murray *et al.*, 2021). Por lo anterior, la prueba bioquímica clave para su identificación es la prueba de la oxidasa, la cual se realiza con un reactivo que contiene el compuesto N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina, que actúa como donador de electrones y es oxidado cuando la bacteria posee citocromo c oxidasa, una enzima del sistema de transporte de electrones. Tiene una amplia distribución y rango de temperatura para su crecimiento, que va de 4°C a 42°C. Es ubicua en el medio ambiente (suelo, compuestos orgánicos y agua) e infecta una amplia gama de hospederos, desde plantas hasta humanos. En el ambiente hospitalario se puede encontrar en lavabos, baños, equipos de diálisis y terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes (Kumate *et al.*, 2016; Coleman *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2021). La identificación mediante el método tradicional enfocado en la actividad endoenzimática puede consistir en pruebas para la determinación de movilidad, la utilización de carbohidratos, la utilización de oxígeno como aceptor final de electrones, la nula generación de productos de la fermentación, la utilización de ácidos orgánicos y la no utilización de compuestos nitrogenados y azufrados (Ramírez-Gama *et al.*, 2021). Los resultados de algunas de estas pruebas para *P. aeruginosa* se muestra en la **Tabla 1**. La combinación de los resultados de las pruebas bioquímicas con la morfología (macroscópica y microscópica) y los patrones de crecimiento, permite la identificación bacteriana (Parasuraman *et al.*, 2024).

Tabla 1. Identificación bioquímica de *P. aeruginosa*.

Prueba	Resultado			
TSI	Bisel	Fondo	Producción de CO ₂	Producción de H ₂ S
	K	K	Negativa	Negativa
SIM	Producción de H ₂ S		Producción de indol	Movilidad
	Negativa		Negativa	Positiva
Ureasa	Negativa			
Catalasa	Positiva			
Oxidasa	Positiva			
MIO	Movilidad		Producción de indol	Ornitina descarboxilasa
	Positiva		Negativa	Negativa
LIA	Descarboxilación de lisina		Desaminación de lisina	Producción de H ₂ S
	Negativa		Negativa	Negativa
Citrato	Positiva			
Malonato	Negativa			

Fuente: Tabla propia adaptada de Parasuraman y colaboradores (2024).

Los factores de virulencia son moléculas que le confieren a la bacteria la capacidad de colonizar, superar las defensas del hospedero y dañar los tejidos de este (Joseph *et al.*, 2024). *P. aeruginosa* posee una gran variedad de factores de virulencia (**Figura 4**) que contribuyen a la adhesión, colonización y atenuación de los mecanismos de defensa del paciente. Estos factores pueden agruparse en tres tipos, de acuerdo con Mohan y colaboradores (2024), 1) componentes de virulencia de superficie, comprendidos por el pili tipo IV, el flagelo, los lipopolisacáridos (LPS) y otros sistemas de secreción; 2) elementos de virulencia secretados como los exopolisacáridos, pigmentos, proteasas, toxinas, entre otros; y 3) mecanismos de comunicación bacteriana entre células como el quorum sensing y la formación de biopelícula.

Las islas genómicas (GI) que contienen genes que codifican factores de virulencia existentes en el genoma accesorio de *P. aeruginosa* se conocen como islas de patogenicidad (PAPI), y ayudan en la adaptación de la bacteria en el paciente infectado y a la diversificación del patógeno. De hecho, la adaptación al medio exterior es una característica destacada de *P. aeruginosa* (Mohan *et al.*, 2024).

En cuanto a sus sistemas de secreción se han identificado 6 tipos incluido el flagelo (asociado a T6SS), el pili (T4SS) y el sistema de secreción tipo 3 con componentes multitoxina (T3SS), que funcionan en la colonización del huésped, la adhesión, el *swimming* y el *swarming* que responde a la señalización quimiotáctica (Qin *et al.*, 2022).

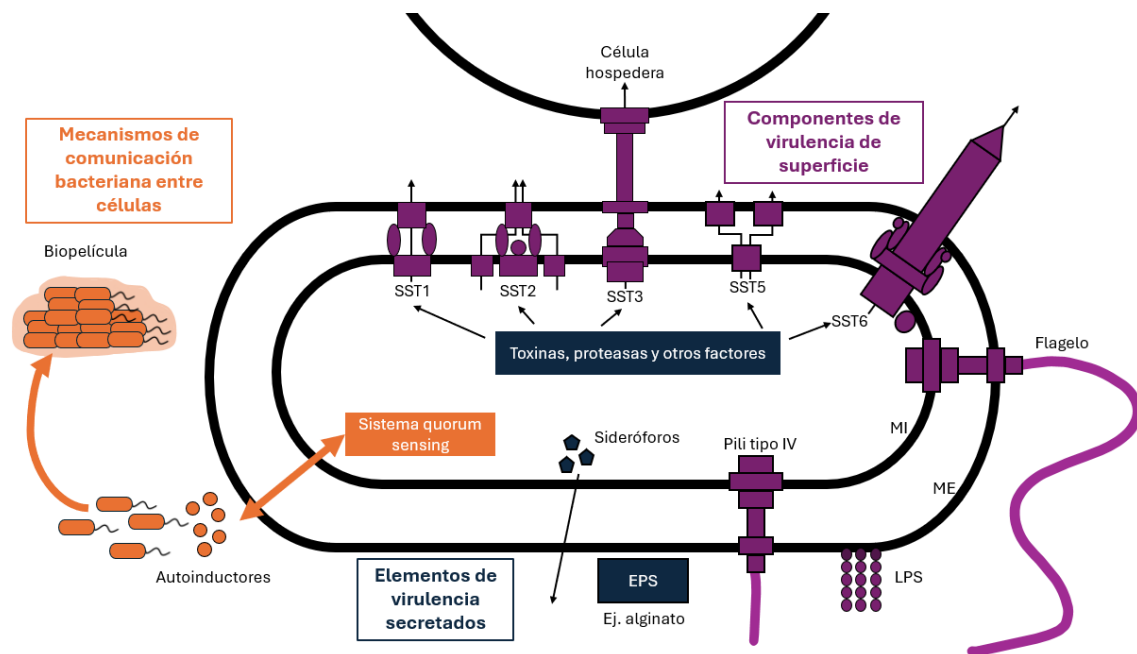


Figura 4. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Fuente: Ilustración propia adaptada de Mohan y colaboradores (2024).

La formación de biopelícula es un modo de vida de *P. aeruginosa* y es el principal mecanismo de resistencia adaptativa que muestra (Mohan *et al.*, 2024). Surge cuando las células bacterianas, individualizadas y en estado libre, exploran su entorno en busca de un lugar adecuado para colonizar y formar una comunidad. Una vez asentadas, se adhieren mediante adhesinas y producen un inductor que a medida que aumenta el número de células en la comunidad, el inductor también se ve incrementado, hasta alcanzar un umbral determinado. Cuando el umbral es alcanzado, se activa un factor de transcripción que promueve la expresión de todos los genes relacionados con la patogenicidad y la acumulación suficiente del inductor inicia la producción de una matriz extracelular mucosa que envuelve y encapsula las células bacterianas formando una estructura tridimensional (Ledermann, 2023).

La biopelícula puede ser no mucoide o mucoide y la transición de la forma no mucoide a la

mucoide está relacionada con el avance de la resistencia de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos y por ende con la baja esperanza de vida del paciente infectado con esta bacteria. La estructura y resistencia de la biopelícula dependen de los factores ambientales. El exopolisacárido alginato producido por la expresión predominante de c-di-GMP actúa como un obstáculo para la difusión de los antibióticos en la biopelícula y dificulta el mecanismo de defensa humana contra las biopelículas. La mayor carga negativa del alginato permite que las variantes mucoides se protejan de la acción de la catelicidina LL-37, mientras que las no mucoides sobreproducen la enzima catalasa para neutralizar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Mohan *et al.*, 2024).

La piocianina es un pigmento azul soluble en agua, exclusivo de *P. aeruginosa* que se produce en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno y causa gravedad de la enfermedad dañando tejido y función de los órganos. También puede secretar un sideróforo llamado pioverdina (o fluoresceína) que confiere una pigmentación verde que actúa como sistema de captación de hierro del hospedero (Ledermann, 2023), piorrubina un pigmento rojizo y piomelanina, un pigmento marrón oscuro (AL-Khikani, 2023).

2.2.3.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Jiménez y colaboradores en el 2019 presentaron un consenso latinoamericano que permitió estandarizar las definiciones de las categorías de resistencia de las tres bacterias Gram negativas que conforman al grupo ESKAPE y que, además tienen un gran impacto como agentes causales de IAAS: *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Acinetobacter* spp. Las reglas se establecieron con base en los antibióticos comúnmente utilizados, en la monitorización de los fenotipos de resistencia, en la relevancia para el tratamiento de las infecciones causadas por la bacteria en cuestión y en los países latinoamericanos que participaron en el consenso, entre los cuales se encuentra México. Estos autores establecieron la definición de *P. aeruginosa* multirresistente (MDR) cuando es resistente a 3 de los 10 grupos de antibióticos, de resistencia extendida (XDR) cuando es resistente a 8 o 9 de los 10 grupos de antibióticos y panresistente (PDR) cuando es resistente a todos los siguientes grupos de antibióticos, los cuales se mencionan a continuación: 1) piperacilina-tazobactam, 2) ceftazidima, 3) cefepima, 4) aztreonam, 5) imipenem, 6) meropenem, 7) gentamicina, 8) amikacina, 9) ciprofloxacino o levofloxacino y 10) colistina.

La separación de algunos antibióticos en grupos diferentes, aunque pertenezcan a la misma

familia, se basó en el hecho de que ciertos mecanismos de resistencia son exclusivos de un antibiótico o pueden presentarse como disociaciones, es decir, un aislado clínico podría ser resistente a imipenem pero drogosenible a meropenem.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido que se utiliza comúnmente en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Sin embargo, la efectividad de la gentamicina se ha visto limitada debido a la creciente resistencia de esta bacteria, pero sigue siendo utilizada en combinación con otros antibióticos para tratar infecciones graves (Espinoza y Esparza, 2021).

El impacto de la resistencia en la mortalidad y en los costos ha indicado que el 67% de los pacientes infectados con cepas de *P. aeruginosa* resistentes tienen significativamente mayor mortalidad que los pacientes con cepas drogosenibles representada por el 23%. Además el costo por una infección resistente es prácticamente del doble que en los pacientes con cepas drogosenibles (Kumate *et al.*, 2016).

En cuanto a los mecanismos de resistencia, la membrana externa puede inhibir la penetración de antibiótico debido a las porinas. La porina principal es OprF la cual induce el establecimiento de biopelículas, pero mutaciones en la segunda porina principal, la OprD, conduce a la resistencia a los carbapenémicos, mientras que la porina más pequeña, OprH, conduce a la resistencia a la gentamicina y la polimixina B (Qin *et al.*, 2022; Mohan *et al.*, 2024).

Las bombas de eflujo son un mecanismo conservado para eliminar compuestos tóxicos derivados de los antimicrobianos dentro de las células bacterianas. La familia de bombas de expulsión RND (resistencia-nodulación-división) tiene la correlación más fuerte con la resistencia a los antibióticos, principalmente cuatro de las 12 bombas de eflujo: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-prM. La primera es responsable de la resistencia a los aminoglucósidos, el triclosán, el dodecilsulfato de sodio y los carbapenémicos. La regulación positiva de MexCD-OprJ está estrechamente asociada con una mayor resistencia de la mayoría de las cepas clínicas al ciprofloxacino, la cefepima y el cloranfenicol. MexEF-OprN está asociada con la resistencia a los aminoglucósidos y los carbapenémicos, y la resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas depende de la bomba de eflujo de MexXY-OprM (Qin *et al.*, 2022; Mohan *et al.*, 2024).

Además de los plásmidos, los integrones y transposones también contribuyen a la resistencia a través de la transferencia horizontal de genes y mutaciones. Los genes que codifican carbapenemasas (CEG) y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) están ampliamente presentes y las enzimas codificadas por genes presentes en cromosomas y plásmidos pueden conducir al desarrollo de resistencia intrínseca y adquirida (Mohan *et al.*, 2024).

En un estudio llevado a cabo en Brasil por Santos y colaboradores en el 2019, se encontró que 57 de 102 pacientes con ingreso de 48 h en la Unidad de Cuidados Intensivos presentaban infecciones por bacterias del grupo ESKAPE, siendo que el 26.3% correspondía a *P. aeruginosa* y el 26.7% de estos pacientes presentaban resistencia a ceftazidima, gentamicina, norfloxacin, ertapenem e imipenem, estos dos últimos corresponden a la categoría de carbapenémicos. Además, con relación al perfil de los pacientes infectados por ESKAPE se vio una prevalencia del sexo masculino y de edad avanzada. Particularmente en México, Garza-González y colaboradores realizaron un estudio, publicado en el 2019, cuyo objetivo era evaluar las tasas de resistencia antimicrobiana presentes en el país tomando en consideración muestras de 47 centros hospitalarios. Con relación al total de muestras de las que se aisló *P. aeruginosa* (respiratorias, orina, sangre y fluido cerebroespinal) el 29.7% de los aislados presentaron resistencia a imipenem y el 27.8% a meropenem (otro carbapenémico) coincidiendo con la resistencia a carbapenémicos (ertapenem e imipenem) encontrada en el estudio anteriormente citado, señalando que es un problema global que implica una amplia distribución de cepas resistentes. Asimismo, es importante destacar que la distribución de aislados MDR, PDR y XDR señalan que el 8.8% de los aislados de *P. aeruginosa* fueron MDR y también se identificaron aislados XDR y posibles PDR.

Más recientemente, en otro estudio realizado en 2021, en el norte de México, por Camacho-Silvas y colaboradores obtuvieron que a partir de 166 aislados bacterianos de orina, exudado de herida, sangre, secreción bronquial y otros, la multirresistencia a los antibacterianos abarcó hasta el 75% de los aislados y las bacterias más frecuentes fueron *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* y *K. pneumoniae*. El análisis de la multirresistencia según el tipo de muestra señala que el problema es de mayor complejidad y gravedad en los pacientes con infecciones en la sangre o en las vías respiratorias, ya que en estos fluidos fue donde se encontró el mayor porcentaje de aislados multirresistentes, la mayor variedad de bacterias

e incluso dos aislados PDR de *P. aeruginosa*.

2.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

2.2.4.1. Generalidades y factores de virulencia

K. pneumoniae es un bacilo encapsulado Gram negativo que pertenece a clase Gamma proteobacteria, familia Enterobacteriaceae (Idris y Nadzir, 2023). La morfología de las colonias en placas de agar muestra colonias grandes de consistencia mucoide y una apariencia lisa o brillante. El color de estas colonias puede variar, desde blanco hasta cremoso o amarillo pálido. Es una bacteria de rápido crecimiento que comúnmente no presenta pigmentación; sin embargo, ciertas cepas pueden exhibir pigmentación amarilla pálida o rosada (Parasuraman *et al.*, 2024).

Esta bacteria es ubicua; se puede encontrar en el suelo, el agua y las plantas, y es colonizadora de mucosas de humanos y animales, sin causar infección, pero con un comportamiento patógeno oportunista. De hecho, las heces de personas sanas contienen *K. pneumoniae* (Joseph *et al.*, 2024). Debido a su amplia presencia en humanos, la colonización gastrointestinal sirve como un reservorio importante para la transmisión e infección a otros sitios y se ha confirmado la relación entre las cepas colonizadoras y las cepas obtenidas de los sitios de infección (Chang *et al.*, 2021).

La identificación mediante el método tradicional enfocado en la actividad endoenzimática puede consistir en pruebas para la determinación de movilidad, la utilización de carbohidratos, la utilización de oxígeno como aceptor final de electrones, la nula generación de productos de la fermentación, la utilización de ácidos orgánicos y la no utilización de compuestos nitrogenados y azufrados (Ramírez-Gama *et al.*, 2021). Los resultados de algunas de estas pruebas para *K. pneumoniae* se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Identificación bioquímica de *K. pneumoniae*.

Prueba	Resultado			
TSI	Bisel	Fondo	Producción de CO ₂	Producción de H ₂ S
	A	A	Positiva	Negativa
SIM	Producción de H ₂ S		Producción de indol	Movilidad
	Negativa		Negativa	Negativa
Ureasa	Positiva			
Catalasa	Positiva			
MIO	Movilidad		Producción de indol	Ornitina descarboxilasa
	Negativa		Negativa	Negativa
LIA	Descarboxilación de lisina		Desaminación de lisina	Producción de H ₂ S
	Positiva		Negativa	Negativa
Citrato	Positiva			
Malonato	Positiva			

Fuente: Tabla adaptada de Parasuraman y colaboradores (2024).

Los principales factores de virulencia que contribuyen en la patogénesis son sus polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS), sideróforos, adhesinas (fimbrias) y biopelícula (Chang *et al.*, 2021; Joseph *et al.*, 2024).

Los CPS son unidades repetitivas de polisacáridos que cubren la superficie bacteriana y en conjunto es conocido como antígeno K. Este contribuye significativamente a su virulencia, o capacidad de causar enfermedades según las variantes en la composición de azúcares. Cada variante de CPS se produce mediante el sistema de ensamblaje de polisacáridos Wzx/Wzy, el cual es controlado por un único locus de biosíntesis. Las principales unidades de monosacáridos son d-galactosa, d-glucosa, l-fucosa, l-ramnosa y d-manosa. Las formas capsulares (antígenos K) son de carga negativa, ya que consisten en piruvato y/o ácido urónico (Joseph *et al.*, 2024).

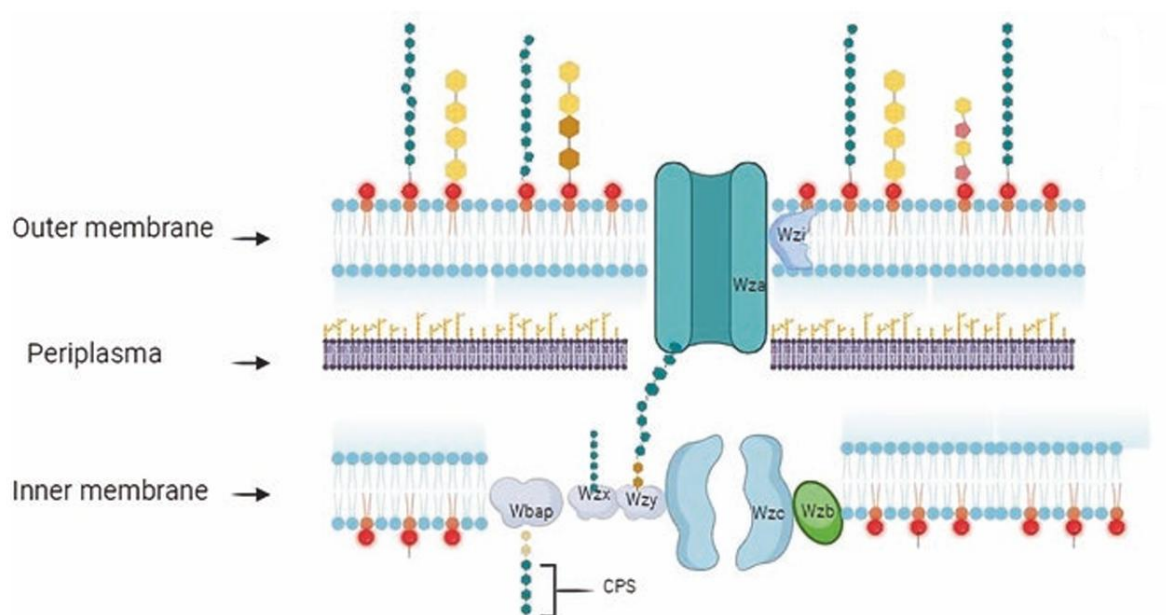


Figura 5. Composición de la membrana celular de *K. pneumoniae*. Wbp: transferasa de galactosa, cataliza el primer paso en la formación de la cápsula; Wzx: flipasa, transporta las unidades de oligosacáridos repetitivos desde el lado citoplasmático hacia el lado periplásmico; Wzy: copolimerasa, cataliza la polimerización de las unidades de oligosacáridos; Wzc: tirosina autoquinasa, exporta y organiza los CPS. Wzb: fosfatasa de tirosina, desfosforila a Wzc; Wza: proteína de transporte, forma el poro de exportación del CPS en la membrana externa; Wzi: proteína de membrana externa, ancla los CPS a la superficie de la bacteria. **Fuente:** Joseph y colaboradores (2024).

La aerobactina es un sideróforo producido por *K. pneumoniae* que juega un papel crucial en la virulencia de cepas hipervirulentas (hvKp). La producción de aerobactina está mediada por un conjunto de genes que se encuentran en un plásmido de virulencia. El operón *iucABCDiutA* es responsable de la síntesis de aerobactina, y su expresión se ha relacionado con la capacidad de la bacteria para causar infecciones invasivas (Liu *et al.*, 2022; Struve *et al.*, 2015).

No todas las hvKp tienen fenotipo hipermucoviscoso, ya que algunas cepas clásicas son hipermucoviscosas (Chang *et al.*, 2021). Por eso, las cepas hvKp no se pueden definir solo mediante la prueba de cuerda, de acuerdo con Zhang y colaboradores (2016), la aerobactina es un determinante de virulencia importante y un nuevo rasgo definitorio para la hvKp basado en el trasfondo genético.

2.2.4.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Como ya se había mencionado, Jiménez y colaboradores en el 2019 presentaron un consenso

latinoamericano que permitió estandarizar las definiciones de las categorías de resistencia de *K. pneumoniae* y establecieron que las cepas de *K. pneumoniae* MDR deben ser resistentes a 3 de los 12 grupos de antibióticos, las XDR a 10 u 11 de los 12 grupos de antibióticos y las PDR a todos los siguientes grupos de antibióticos: 1) amoxicilina-ácido clavulánico o ampicilina-sulbactam, 2) piperacilina tazobactam, 3) ceftazidima o cefotaxima/ceftriaxona o cefepima, 4) imipenem o meropenem, 5) aztreonam, 6) gentamicina, 7) amikacina, 8) ciprofloxacino, 9) trimetoprima-sulfametoxazol, 10) fosfomicina, 11) tigeciclina, 12) colistina.

K. pneumoniae es importante productor de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) (Venkateswaran *et al.*, 2023) y otros mecanismos de resistencia destacados son la modificación de los sitios de unión de los antibióticos, la disminución de la permeabilidad de la membrana celular y la activación de bombas de eflujo (Rossi *et al.*, 2015; Santacruz *et al.*, 2023; Cuenca-Riascos *et al.*, 2023).

El tratamiento para infecciones por esta bacteria se lleva a cabo con cefalosporinas de tercera generación, cefepima, carbapenémicos, fluoroquinolonas, piperacilina/tazobactam o aminoglucósidos (Thaden *et al.*, 2017). La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que se utiliza ampliamente contra *K. pneumoniae* pero su eficacia se ha visto disminuida debido a la creciente resistencia de esta bacteria (Jiang *et al.*, 2018).

Del mismo modo, en los últimos años, el uso extensivo de carbapenémicos, considerados antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones graves, aumentó la resistencia a estos, en *K. pneumoniae* (Chang *et al.*, 2021). Uno de los mecanismos implicados es la producción de carbapenemasas, que son enzimas capaces de inactivar los carbapenémicos. La prevalencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) ha aumentado significativamente en diversas regiones, incluyendo América Latina (Rodríguez *et al.*, 2011; Lucas-Parrales, 2024).

2.2.5. Infecciones asociadas y respuesta inmune del hospedero

P. aeruginosa causa severas infecciones principalmente en personas inmunocomprometidas. Se ha asociado especialmente a personas que presentan enfermedad pulmonar crónica, asma, fibrosis quística y enfermedades pulmonares obstructivas (Salim *et al.*, 2024), aunque su papel patogénico no debe descartarse en pacientes inmunocompetentes (Qin *et al.*, 2022). Ocasiona infecciones del tracto urinario,

respiratorio, de heridas en la piel y endocarditis (Agrawal y Patel, 2024). Es la quinta causa más frecuente de las infecciones en general, la segunda causa de neumonía como IAAS, la tercera causa de infección urinaria, la cuarta de infección de sitio quirúrgico y la séptima de sepsis (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

K. pneumoniae, desarrolla infecciones que incluyen neumonía, infecciones del tracto urinario, sepsis y abscesos hepáticos, especialmente en pacientes que reciben atención en entornos hospitalarios (Salim *et al.*, 2024). La formación de abscesos hepáticos se ha asociado a individuos con comorbilidades como diabetes. La respuesta inmune en estos casos puede ser insuficiente, lo que permite que la bacteria cause infecciones sistémicas severas y complicaciones como meningitis (Maheswaranathan *et al.*, 2018). La identificación de cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* ha resaltado la importancia de la virulencia en la patogénesis, ya que estas cepas son capaces de causar infecciones más agresivas y con mayor tasa de mortalidad (Zhang *et al.*, 2016). Estas infecciones pueden producirse por contacto con un hospedero infectado o pueden ser endógenas (Idris y Nadzir, 2023), cuando hay transición de la colonización a una infección debida al deterioro de la defensa del hospedero por enfermedades subyacentes o terapias inmunomoduladoras (Chang *et al.*, 2021).

El proceso de patogénesis de la bacterias del grupo ESKAPE es complejo y de múltiples niveles que involucra varios factores para establecer una infección exitosa del hospedero. Aunque los elementos y el enfoque de los patógenos varían, se sigue un patrón similar. El primer paso es una adhesión sólida al hospedero a través de las superficies mucosas. Una vez que se han adherido, las células bacterianas invaden las células del hospedero y liberan diferentes toxinas (proteínas, enzimas y sideróforos) para afectar a las células sanas y evadir el sistema inmunitario (Venkateswaran *et al.*, 2023).

En el caso de patógenos Gram-negativos, la producción de fosfolipasa D, que escinde la fosfolipasa y la hemolisina, se utiliza comúnmente para dañar al hospedero. Los polisacáridos capsulares rodean la superficie bacteriana y evaden la activación del complemento, la muerte fagocítica y la opsonización en *K. pneumoniae* (Venkateswaran *et al.*, 2023).

El hierro es un metal esencial que los patógenos bacterianos requieren para múltiples procesos como la respiración y el metabolismo por lo que la adquisición de hierro es un

prerrequisito para sostenerlas en el entorno del hospedero. El hierro es un cofactor para múltiples procesos enzimáticos en el sistema humano. Se encuentra en complejos hemo de metaloproteína: hemoglobina, mioglobina, catalasas, citocromos y aconitasa como grupos Fe-S. Por lo tanto, la competencia por el hierro es feroz entre las bacterias y el hospedero. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para secuestrar el hierro disponible del entorno. *K. pneumoniae* produce los sideróforos aerobactina y salmoquelina y *P. aeruginosa* produce pioverdina (Venkateswaran *et al.*, 2023).

Si la evasión del sistema inmune por estas bacterias no es exitosa, activan neutrófilos y macrófagos reconocen a la bacteria, luego anticuerpos y proteínas del complemento, se unen a la superficie de la bacteria en un proceso llamado opsonización. Los receptores tipo Toll (TLR) son posiblemente los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) más importantes para el reconocimiento inicial de bacterias y virus (Qin *et al.*, 2022). En particular, los TLR2 y TLR4 son activados por componentes de la pared celular bacteriana, como los lipopolisacáridos (LPS) (Muñoz y Rodríguez, 2016). El TLR5 también juega un importante papel en el reconocimiento de bacteria, ya que se activa con la flagelina y puede inducir un inflamasoma específico; y el TLR9 puede detectar intracelularmente el ADN CpG bacteriano no metilado. Aunque la vía TLR4 no funciona sola y es muy compleja, se ha demostrado que ratones deficientes de TLR4 muestran cargas bacterianas más altas y lesiones pulmonares graves bajo la infección (Qin *et al.*, 2022). La activación de los macrófagos desencadena la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-1 β , el TNF- α , y la interleucina-8 (IL-8) (Wieland *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2022).

La opsonización marca a la bacteria para su eliminación y aumenta su reconocimiento por parte de los fagocitos (Guzmán-Beltrán *et al.*, 2023). Una vez que la bacteria ha sido opsonizada, los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) se adhieren a la superficie bacteriana y comienzan a envolverla mediante un proceso llamado endocitosis. Durante este proceso, la membrana celular del fagocito se extiende alrededor de la bacteria, formando una vesícula llamada fagosoma (Patrón-Ordóñez *et al.*, 2023; Miranda y Lucas, 2023). Una vez que el fagosoma se ha formado, se fusiona con los lisosomas, que son orgánulos que contienen enzimas lisosomales y otros elementos antimicrobianos. Las enzimas lisosomales, como las proteasas y las lipasas, así como las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno y el superóxido actúan para descomponer y destruir la bacteria (Chávez-Solórzano *et al.*, 2020; Valderrama *et al.*, 2016). Después de que las bacterias fueron destruidas, los macrófagos pueden presentar fragmentos de antígenos bacterianos en

su superficie mediante moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) para activar la respuesta inmune adaptativa (Abad-Restrepo *et al.*, 2018; Gaete *et al.*, 2020).

2.3. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

2.3.1. Definición, mecanismos de acción y ventajas terapéuticas

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son pequeños péptidos catiónicos y anfipáticos, componentes de la inmunidad innata de una amplia variedad de organismos eucariotas, que participan en la primera línea de defensa contra patógenos bacterianos, virales, fúngicos y parásitos (Zhang *et al.*, 2021). Su mecanismo de acción se puede clasificar en: la modulación inmunológica y la muerte directa de patógenos. Tienen la capacidad activar leucocitos, estimular la angiogénesis para la cicatrización de heridas y reparación de tejidos (Morales *et al.*, 2021), modular la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias e incluso se ha reportado que cuentan con actividad antitumoral (Zhang *et al.*, 2021).

En comparación con los antibióticos convencionales, los AMPs muestran la ventaja de actuar sobre múltiples objetivos en la membrana celular de las bacterias, debido a su diversidad estructural y a sus múltiples mecanismos de acción y por esto mismo son menos propensos a que las bacterias desarrollen resistencia contra ellos (Pastrian, 2018; Samael Olascoaga-Del *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Por lo anterior, los AMPs están siendo objeto de estudio y es muy importante analizar y comprender mejor su estructura, función y aplicaciones. La identificación de nuevos AMPs a partir de fuentes naturales, como venenos y otras secreciones de animales, ha ampliado el repertorio de compuestos disponibles para el desarrollo de nuevos tratamientos (Morales *et al.*, 2021; Rivera *et al.*, 2011). Estos estudios no solo proporcionan información valiosa sobre la biología de los AMPs, sino que también abren nuevas vías para la innovación en el diseño de fármacos.

2.3.2. Actividad antibacteriana e inmunomoduladora

En la investigación de estrategias terapéuticas contra infecciones del grupo ESKAPE, Mwangi y colaboradores (2019), diseñaron un péptido cíclico con alta estabilidad basado en una catelicidina del veneno de serpiente y fue denominado como ZY4. Evaluaron su actividad antibacteriana *in vitro* contra *P. aeruginosa* MDR y *A. baumannii* MDR aisladas de muestras clínicas y se determinó una concentración mínima inhibitoria entre 2.0 y 4.5

$\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* MDR y entre 4.6 y 9.4 $\mu\text{g/mL}$ para *A. baumannii*. La morfología de la membrana celular de las bacterias fue observada mediante microscopía electrónica de barrido y ZY4 causó la disrupción de la membrana de *P. aeruginosa* MDR y *A. baumannii* MDR, como se puede ver en la **Figura 6 A y B**.

La suspensión bacteriana tratada con ZY4 se extrajo en diferentes tiempos, se sembró y la cuenta de CFU mostró que la actividad antibacteriana de ZY4 es más fuerte y rápida que la de la colistina, ya que ZY4 eliminó a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* dentro de los 30 minutos después del tratamiento a una concentración de 5 veces la CMI, mientras que en ese tiempo y a esa misma concentración de colistina, este antibiótico no pudo eliminar a todas las bacterias. Además, en la **Figura 6 C y D** se puede observar que la actividad antibacteriana de ZY4 sobre estas bacterias es dependiente de la dosis.

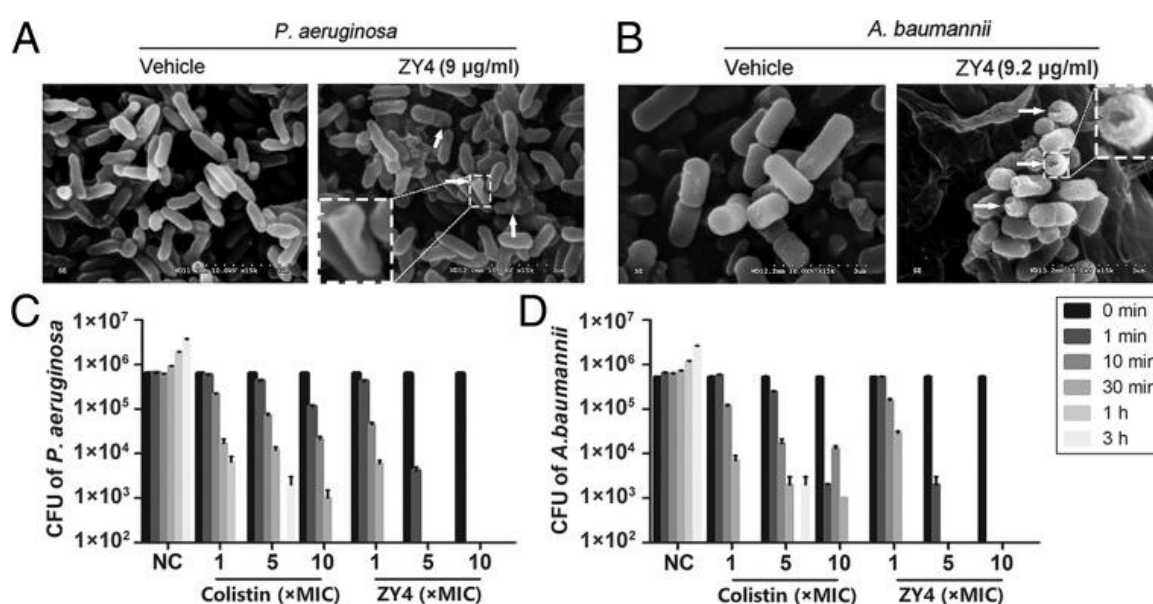


Figura 6. Permeabilización de la membrana celular por ZY4. A y B: *P. aeruginosa* y *A. baumannii* tratada con ZY4 mostraron disrupción de su membrana celular, mientras que la membrana de las bacterias no tratadas se mantuvo intacta. C y D: UFC de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* después del tratamiento con colistina y ZY4 a diferentes concentraciones y la bacteria sembrada a diferentes tiempos. **Fuente:** Mwangi y colaboradores (2019)

De manera significativa, ZY4 inhibió la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* de forma dependiente de la dosis. Además, las biopelículas preformadas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* también fueron eliminadas por ZY4 de manera dependiente de la dosis.

Mwangi y colaboradores (2019) también evaluaron la selección de resistencia mediante pases seriados de la bacteria en presencia de concentraciones subinhibitorias de ZY4 o colistina hasta 60 pases. A diferencia de la colistina, las cepas de *P. aeruginosa* no desarrollaron resistencia fácilmente a ZY4. La exposición a colistina resultó en un aumento constante de la CMI ya desde los primeros 20 pases, alcanzando un incremento de 16 a 25 veces en la CMI después de 60 pases. Sin embargo, no se observó un cambio significativo con ZY4, mostrando solo un aumento de 4.0 a 4.5 veces después de 60 pases. Un fenómeno similar se observó en las cepas de *A. baumannii*.

Por último, la administración de ZY4 en ratones con infección pulmonar por *P. aeruginosa* disminuyó la carga bacteriana de una manera dosis dependiente, logrando inhibir hasta el 90% la colonización pulmonar con 8 mg/kg del péptido. ZY4 redujo los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias sugiriendo un potencial antiinflamatorio *in vivo*. El análisis farmacocinético de ZY4 demostró una vida media de 1.8 horas después de una inyección intravenosa (i.v.) en ratones, lo que indica además el efecto protector de las modificaciones de la catelicidina del veneno de serpiente para mejorar la estabilidad del péptido. La toxicidad aguda *in vivo* de ZY4 en ratones tras una inyección i.v. mostró solo signos leves de toxicidad aguda a 40 mg/kg, mientras que la colistina mató a casi todos los ratones a 10 mg/kg, lo que sugiere una menor toxicidad de ZY4.

En el 2020, Zhou y colaboradores diseñaron y sintetizaron un análogo optimizado del péptido Jelleine-1 aislado de la jalea real de las abejas melíferas que mostró una actividad antimicrobiana mejorada contra *P. aeruginosa* MDR. El análogo, enriquecido en arginina y leucina, que se identificó como análogo 15 mostró una potente actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* con una CMI de 8 μ M. Mostró una actividad hemolítica insignificante en concentraciones de 1 a 256 μ M y asimismo una citotoxicidad insignificante en células NIH 3T3, RAW 264.7 y Hela. No se observaron cambios significativos en el nivel de ALT, AST, proteína total y albúmina en ratones después de 8 días de tratamiento ni se detectaron diferencias significativas en el cambio de peso corporal lo cual indica que el análogo 15 de Jelleine-1 no exhibió toxicidad *in vivo* en los animales probados.

Es importante también mencionar que en la literatura se ha reportado el uso de diferentes disolventes para péptidos antimicrobianos, los cuales influyen en su solubilidad, estabilidad y actividad biológica. En estudios con la catelicidina humana LL-37, Huang *et al.* (2006)

utilizaron ácido acético al 0.01 % como vehículo para disolver el péptido, observando que esta solución no presentó efectos citotóxicos ni actividad antimicrobiana por sí sola, lo que validó su uso como control. Por otro lado, López-García et al. (2006) emplearon agua bidestilada estéril para preparar soluciones de LL-37, las cuales fueron liofilizadas para su conservación, sin reportar pérdida de actividad ni interferencia atribuible al solvente. Finalmente, en la patente CA2632782A1 se describe la disolución del péptido canino K9CATH en ácido acético al 0,01 % complementado con albúmina al 0,1 %, estrategia que mejora la estabilidad del péptido y previene su adsorción a superficies.

2.3.3. Catelicidinas: estructura, mecanismos y estudios previos

2.3.3.1. Características estructurales y actividad biológica

Las catelicidinas son AMPs distribuidos en varios organismos, incluidos mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces, que tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, virus y hongos (Guerra *et al.*, 2024). Son producidas principalmente por neutrófilos, células epiteliales, macrófagos y fibroblastos (Cavagnero y Gallo, 2022) y su expresión constitutiva e inducida tiene lugar en glándulas salivales, amígdalas, ganglios linfáticos, glándula tiroidea, pulmones, corazón, bazo, hígado, intestino delgado, placenta, médula ósea y testículos.

Las catelicidinas están conformadas por 12 a 97 aminoácidos y fueron descubiertas en neutrófilos bovinos por Zanetti y colaboradores a principios de la década de 1990 (Mookherjee *et al.*, 2013). En el caso de los neutrófilos, la catelicidina se almacena en gránulos intracelulares y se libera al exterior de la célula mediante un proceso llamado degranulación. Este proceso ocurre en respuesta a estímulos inflamatorios incluyendo la presencia de patógenos y bajo estas condiciones su expresión es inducida por la vía NF-κB que inicia con los receptores TLR, y el prepropéptido almacenado en los gránulos de las células productoras se libera (Moreno-Angarita *et al.*, 2020).

Las deficiencias en la producción o actividad de las catelicidinas se han asociado con un mayor riesgo de infecciones, ya que se ha reportado, por ejemplo, que Huang y colaboradores (2007) experimentaron con ratones deficientes de catelicidina y estos presentaron un retraso significativo en la eliminación de *P. aeruginosa* de la córnea. Esta evidencia directa *in vivo* demuestra que la expresión endógena de catelicidina proporciona defensa contra la infección.

El término "catelicidina" se acuñó en 1995 para describir a esta familia de péptidos

cati3nicos bipartitos que comparten una secuencia conservada de ADN pre-proteica en el extremo N-terminal (**Figura 7**), altamente hom3loga a la secuencia aguas arriba del gen que codifica la prote3na catelina, un inhibidor de proteasa. As3, las catelicidinas reciben este nombre debido a esta homolog3a en la parte de la prote3na precursora, la cual est3 involucrada en la secreci3n y el procesamiento, pero esta familia es m3s conocida por las sus propiedades antimicrobianas. El dominio antimicrobiano es estructuralmente variable y se activa proteol3ticamente cuando es escindido, convirti3ndose en el p3ptido maduro (Mookherjee *et al.*, 2013).

En el humano, solo se ha descrito un miembro de la familia de las catelicidinas y se denomina LL-37, codificada por el gen CAMP en el cromosoma 3 con localizaci3n 3p21.31. Est3 constituida por 37 amino3cidos (Moreno-Angarita *et al.*, 2020) y se conoce tambi3n como CAP18, FALL-39 y FALL39 de acuerdo con lo reportado en la base de datos THE HUMAN PROTEIN ATLAS.

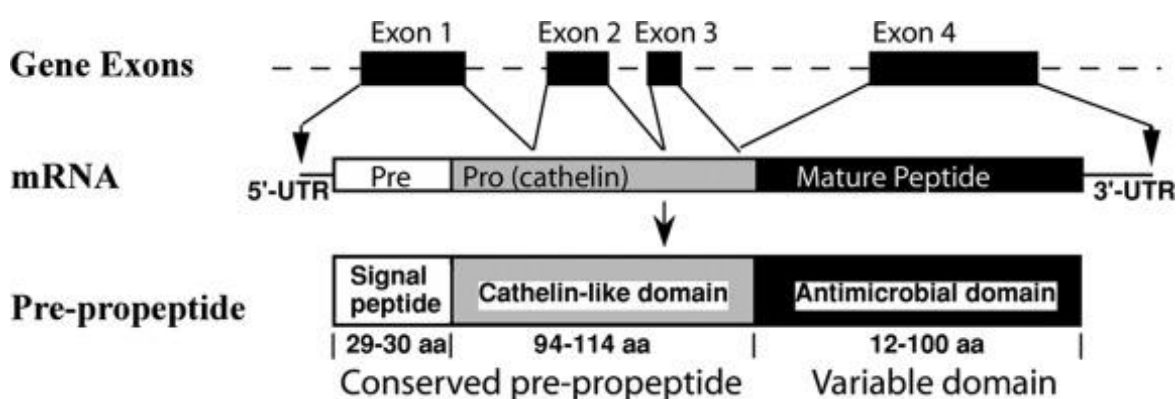


Figura 7. Estructura del gen de las catelicidinas y su procesamiento. Fuente: Mookherjee y colaboradores (2013)

2.3.3.2. Modelos de acci3n sobre membranas

Su porci3n hidrof3bica compuesta principalmente de residuos cargados positivamente interact3a con mol3culas cargadas negativamente como el LPS de las membranas bacterianas Gram negativas o el 3cido teicoico de bacterias Gram positivas (Moreno-Angarita *et al.*, 2020). A continuaci3n se describen los modelos hipot3ticos del mecanismo de acci3n de las catelicidinas y otros AMPs, de acuerdo con Zhang y colaboradores (2021).

Los p3ptidos pueden translocarse en la membrana hacia el citoplasma para actuar intracelularmente de manera que pueden inhibir la s3ntesis de ADN, ARN, prote3nas y el plegamiento de estas, o pueden actuar sobre la membrana, como se ilustra en la **Figura 8**

(Guerra *et al.*, 2024).

Modelo barril-duela: Los péptidos se insertan perpendicularmente a la bicapa lipídica, formando poros. La parte hidrófila de los AMPs interactúa con el interior del barril, mientras que la parte hidrófoba interactúa con los lípidos dentro de la membrana, facilitando el transporte de sustancias, similar a un barril.

Modelo toroidal: Los péptidos se insertan en la membrana e inducen una curvatura que hace que los lípidos se reorganicen y formen un poro con bicapa lipídica continua, que tiene la apariencia de un toroide (una estructura similar a un anillo o dona). Los lípidos se curvan hacia el interior del poro y se incrustan dentro del centro hidrofóbico de modo que los bordes del poro están compuestos tanto por los péptidos como por los lípidos de la membrana. Este tipo de poro provoca una pérdida de la barrera selectiva de la membrana, permitiendo la fuga de iones y otras moléculas pequeñas, lo que desestabiliza la célula y puede llevar a su muerte.

Modelo de alfombra: Los péptidos se disponen paralelamente a la superficie de la membrana, como si formaran una "alfombra" sobre la bicapa lipídica. En una acción análoga a la de los detergentes, los péptidos forman micelas con los lípidos que alteran la función de la membrana celular.

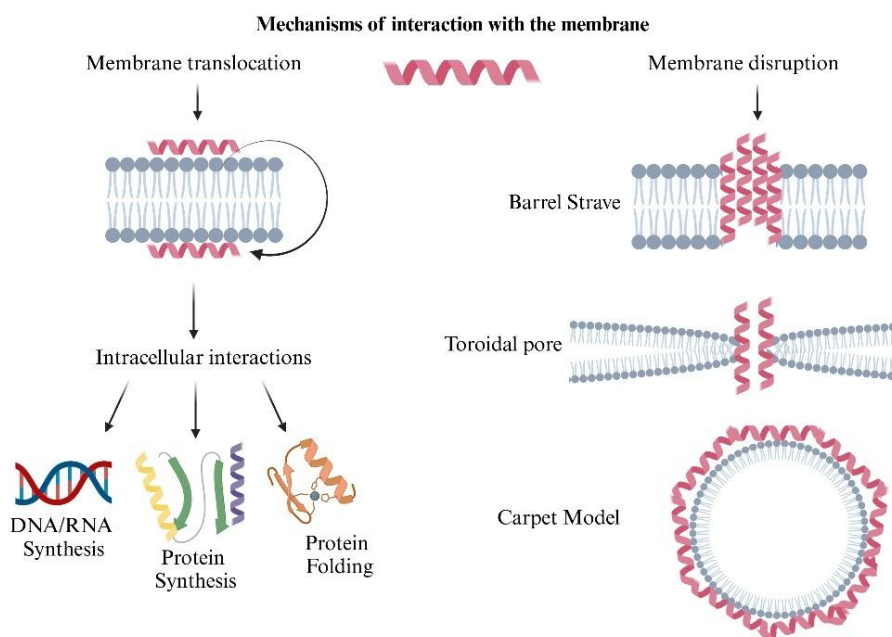


Figura 8. Modelos de los mecanismos de acción de las catelicidinas. Fuente: Guerra y colaboradores (2024).

En cuando a las propiedades inmunomoduladoras de las catelicidinas, Alford y colaboradores (2020) y Moreno-Angarita y colaboradores (2020) exponen que la mayoría de las catelicidinas son proinflamatorias y antiinflamatorias, dependiendo del microambiente donde se secreta. Durante la diferenciación de monocitos en macrófagos, la presencia de LL-37 genera un ambiente proinflamatorio, resultando en una regulación negativa de IL-10 y un aumento de IL-12p40 que favorece la población de macrófagos M1 sobre los de tipo M2; otros estudios han demostrado que LL-37 promueve la producción de IL-6 (Moreno-Angarita et al., 2020).

Pero por otro lado, se ha reportado que la unión de LL-37 a lipopolisacáridos (LPS) puede prevenir la sepsis inducida por endotoxinas bacterianas, al inhibir la activación del TLR4 por LPS. Esta inhibición reduce la disponibilidad del LPS para la activación de la cascada de señalización que lleva a la respuesta inflamatoria excesiva característica de la sepsis (Moreno-Angarita *et al.*, 2020; Al Adwani *et al.*, 2021). LL-37 interrumpe la función del receptor TLR-4 específicamente, en células dendríticas y macrófagos en presencia de LPS, lo que resulta en niveles más bajos de producción de citocinas proinflamatorias, de acuerdo con lo reportado por Moreno-Angarita y colaboradores (2020).

2.3.3.3. Catelicidinas animales

Las catelicidinas desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata de diversos animales y ya se han aislado, caracterizado y sintetizado muchas de estas. El péptido K9CATH es una catelicidina canina compuesta por 38 aminoácidos presente en el contenido de los gránulos de neutrófilos. Tamayo y colaboradores (2012), han reportado que K9CATH tiene una amplia actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias grampositivas (*Listeria monocytogenes* y *S. aureus*), bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* serotipo *typhimurium*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Salmonella* serotipo *enteritidis* y *N. gonorrhoeae*), y levaduras (*Candida albicans*). Por lo tanto esta actividad fue probada contra *Mycobacterium tuberculosis* observando que 1 péptido K9CATH inhibió a *M. tuberculosis* H37Rv con una CMI de 10.66 µg/mL y por microscopía electrónica pudieron observar una disrupción en la membrana de *M. tuberculosis* H37Rv. K9CATH no fue citotóxico, ya que se obtuvo una viabilidad celular del 95% en células A549 a una concentración de 32 µg/mL.



Figura 9. Disrupción de membrana celular de *M. tuberculosis* por K9CATH. Fuente: Tamayo y colaboradores (2012).

El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) se enfrenta a un ambiente hostil, caracterizado por zonas pantanosas de los climas tropicales y subtropicales, favorable para las infecciones (Palacios *et al.*, 2023). Sin embargo, este mamífero tiene una inmunidad innata fuerte que ha evolucionado para luchar contra los patógenos. Esta capacidad se ha relacionado con que sus células polimorfonucleares contienen una variedad de proteínas y péptidos antimicrobianos. En el búfalo, los AMP estudiados hasta ahora pertenecen a las defensinas y catelicidinas. Se han identificado varias catelicidinas y la alineación de sus secuencias aminoacídicas ha mostrado una alta variabilidad en el dominio antimicrobiano C-terminal.

Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que dosis bajas de la catelicidina de búfalo de agua (WBCATH) mejoran la respuesta inmune mediada por macrófagos, contra la infección por una cepa de referencia y una cepa clínica MDR de *Mycobacterium tuberculosis*, disminuyendo las cargas bacilares pulmonares en modelo murino, al tiempo que induce una alta expresión de citocinas proinflamatorias. En todas las concentraciones probadas hubo un efecto antimicrobiano y bactericida significativo, de 1 a 16 µg/mL, siendo máximo a 32 y 64 µg/mL (**Figura 10**). Existe un efecto dosis dependiente de WBCATH contra la cepa H37Rv y la cepa MDR, basado en la lectura de la densidad óptica y confirmado por el recuento de UFC.

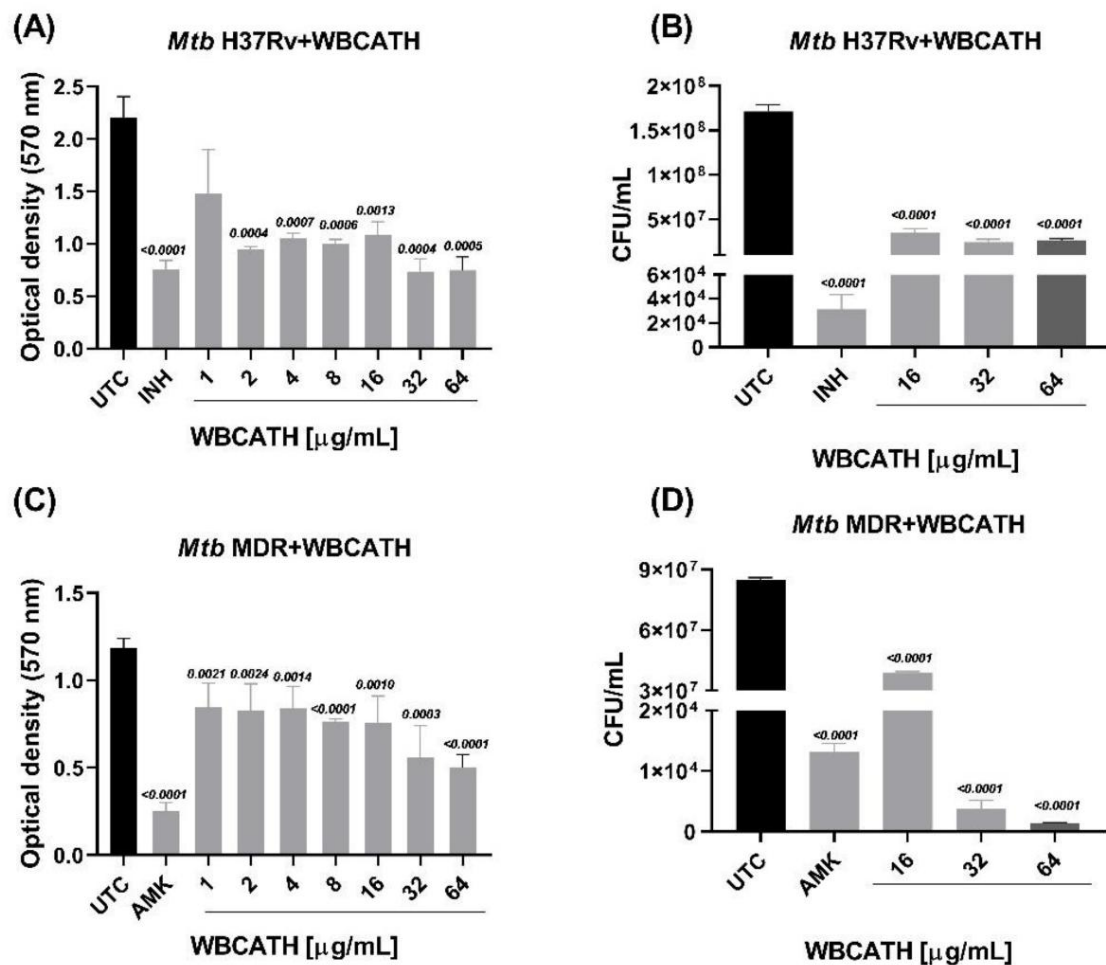


Figura 10. Actividad antibacteriana de WBCATH sobre cepa H37Rv y cepa MDR de *M. tuberculosis*
A: Densidad óptica medida para *Mtb* H37Rv y concentraciones de WBCATH desde 1 hasta 64 $\mu\text{g/mL}$. **B:** UFC/mL de *Mtb* H37Rv después de la incubación con 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ de WBCATH. **C:** Densidad óptica medida para *Mtb* MDR y concentraciones de WBCATH desde 1 hasta 64 $\mu\text{g/mL}$. **D:** UFC/mL de *Mtb* MDR después de la incubación con 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ de WBCATH. INH: Isoniazida (control positivo para *Mtb* H37Rv; AMK: Amicacina (control positivo para *Mtb* MDR). **Fuente:** Palacios y colaboradores (2023).

Asimismo, también se observó mediante microscopía electrónica que después de 18 horas de incubación de *M. tuberculosis* H37Rv y MDR con WBCATH en concentraciones de 32 y 64 μg produjo muchas anomalías estructurales y esta evidencia destaca la actividad antimicrobiana directa del péptido.

WBCATH en una concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$ se utilizó como tratamiento de macrófagos alveolares infectados y en comparación con los macrófagos infectados no tratados, WBCATH disminuyó en un 86.27% la carga bacilar 24 horas después de la infección, 87.02% después de 72 horas y 74.85% después de 144 horas, demostrando que WBCATH mejora la eliminación bacteriana. También evaluaron la producción de citocinas por macrófagos infectados y no infectados y se recogieron sobrenadantes después de 1 y 24

horas para medir mediante ELISA la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-12. WBCATH en una concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$ indujo una producción significativamente dos veces mayor de $\text{TNF}\alpha$ después de 24 horas de infección en macrófagos incubados con WBCATH y una producción tres veces mayor de IL-12 después de 1 y 24 horas de incubación con macrófagos alveolares infectados y no infectados.

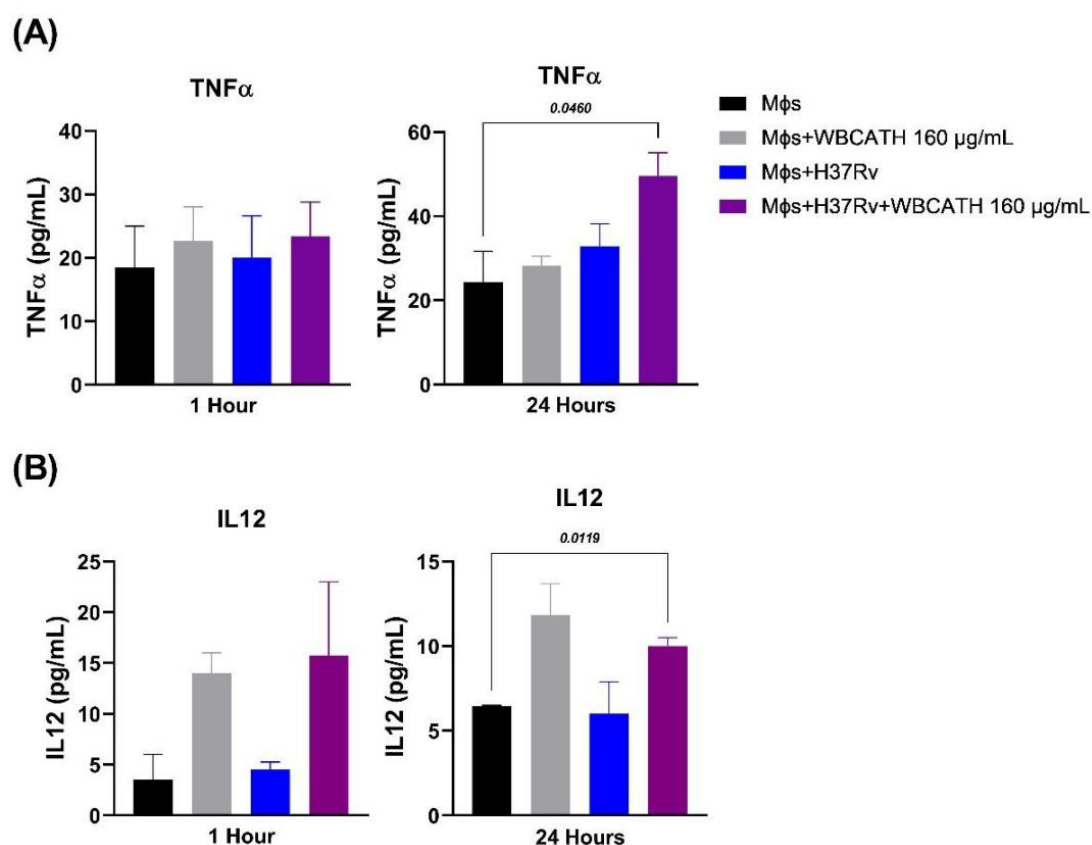


Figura 11. Producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-12 por macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv tratados con WBCATH (160 $\mu\text{g/mL}$). A: Producción de $\text{TNF}\alpha$ después de 1 y 24 h de tratamiento con WBCATH. B: Producción de IL-12 después de 1 y 24 h de tratamiento con WBCATH. **Fuente:** Palacios y colaboradores (2023).

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento de infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos representa un desafío global en la salud pública, especialmente por el impacto de bacterias del grupo ESKAPE, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, que lideran las tasas de resistencia en entornos hospitalarios de México. Las cepas MDR de estas bacterias frecuentemente causan Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud para las cuales el tratamiento es limitado y conllevan un incremento de la morbilidad y mortalidad.

En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, el estudio de péptidos antimicrobianos (AMPs) ha sido de gran importancia debido a que confieren inmunidad innata a mamíferos que se enfrentan a ambientes con una gran variedad de agentes patógenos, por eso en este trabajo se evalúa el efecto del péptido WB14_F, una catelicidina del búfalo de agua. Ya se ha explorado su efecto antimicrobiano e inmunomodulador sobre *Mycobacterium tuberculosis* pero los siguientes ensayos buscan conocer su efecto sobre *P. aeruginosa* MDR y *K. pneumoniae* MDR, patógenos clínicamente relevantes y con alta incidencia en el noreste de México.

4. HIPÓTESIS

La catelicidina WB14_F tiene actividad bacteriostática y/o bactericida, y es capaz de activar células inmunes innatas *in vitro* que producen factores solubles que ayudan a combatir infecciones por *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* multirresistentes aisladas de pacientes de un hospital de tercer nivel de atención en el Noreste de México.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la catelicidina WB14_F *in vitro* sobre aislados MDR de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* obtenidos de un hospital de tercer nivel de atención en el Noreste de México.

5.2. Objetivos específicos

1. Identificar los aislados bacterianos y clasificar su resistencia antimicrobiana.
2. Estandarizar inóculo para la cuenta en placa de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de WB14_F contra los aislados MDR de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.
4. Evaluar la actividad hemolítica y citotóxica de WB14_F utilizando eritrocitos y células mononucleares de sangre periférica humana.
5. Determinar la actividad inmunomoduladora de WB14_F sobre células inmunes sanguíneas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Obtención de las muestras bacterianas

Los aislados de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* fueron obtenidos de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Nuevo León, México. También se utilizaron las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *K. pneumoniae* ATCC 13883.

6.2. Cultivo e identificación de las bacterias

6.2.1. Cultivo

Se descongelaron las criopreservas y de cada suspensión bacteriana se tomaron 200 µL que se añadieron en microtubo con 1 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI). Se incubaron a 37°C por 24 horas y se realizó un segundo pase de 200 µL del primer microtubo a un nuevo microtubo con 1 mL de BHI y nuevamente se incubó a 37°C por 24 horas. Después *P. aeruginosa* se sembró en Agar *Pseudomonas* F, un medio para la detección de *P. aeruginosa* basado en la visualización de la pioverdina (también conocida como fluoresceína) y *K. pneumoniae* en agar MacConkey, y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

6.2.2. Tinción Gram

La tinción Gram se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Ramírez-Gama y colaboradores (2021). Primero se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos, se tomó una asada de cada aislado en placa de Agar *Pseudomonas* F, previamente incubada por 24 horas, y con el asa se dispersó la bacteria en la gota de agua. Luego se fijó con calor utilizando la flama del mechero Bunsen. Una vez que la bacteria fue fijada se agregó cristal violeta y después de 1 minuto se lavó con agua destilada. Posteriormente se añadió el lugol que también después de 1 minutos se lavó. Se agregaron de 5 a 10 gotas de alcohol acetona e inmediatamente se lavó, y por último se agregó la safranina que después de 30 a 60 segundos se lavó, y el portaobjetos se dejó secar al aire.

6.2.3. Pruebas bioquímicas

Se tomó una asada de un cultivo en placa previamente incubado por 24 horas de cada uno de los aislados y se sembró en cada uno de los tubos previamente preparados para realizar las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, SIM, ureasa, MIO, LIA, citrato y malonato. Todos los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. La prueba de la catalasa y

oxidasa (solo para *P. aeruginosa*) se realizaron en portaobjetos de vidrio y papel filtro respectivamente.

6.2.4. Cinética de crecimiento

A partir de un cultivo en placa incubado por 24 horas se ajustó una suspensión bacteriana en tubo con 15 mL de medio BHI a una absorbancia de 0.080 en una longitud de onda de 600 nm. Cada hora hasta la hora 12 y a las horas 23 y 24, se tomó 1 mL para colocarlo en una celda de medición y realizar la lectura de absorbancia a 600 nm. Para cada medición se realizaron 3 lecturas y se graficaron las medias para determinar la fase logarítmica y estacionaria de cada aislado bacteriano.

6.3. Clasificación de resistencia antimicrobiana

La susceptibilidad a antibióticos se realizó utilizando el sistema VITEK de bioMérieux empleando los antibióticos que se enlistan a continuación.

Panel para *P. aeruginosa*: Cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, meropenem, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacino, norfloxacino y amoxicilina.

Panel para *K. pneumoniae*: Ampicilina, ampicilina/Sulbactam, cefalotina, cefuroxima (oral), cefuroxima (otra), cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, ertapenem, meropenem, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacino, nitrofurantoina, trimetoprima/sulfametoxazol y amoxicilina.

Con base en los criterios publicados por Jiménez y colaboradores (2019) se seleccionaron 1 aislado MDR de cada bacteria. Para *P. aeruginosa* un aislado MDR se define como el aislado resistente a 3 de los 10 grupos de antibióticos mencionados previamente y para *K. pneumoniae* se define como el aislado resistente al menos a 3 de los 12 grupos de antibióticos. Se utilizó el término “Resistente” (R) para las resistencias completas y “Sensible” (S) para los aislados sensibles y con resistencia intermedia (Jiménez *et al.*, 2019).

6.4. Criopreserva de los aislados

De acuerdo con la metodología de LaBauve y Wargo (2012), modificada, los aislados clínicos y las cepas de referencia ATCC fueron criopreservados para su almacenamiento a largo plazo. Para ello se tomó una asada de cada aislado en agar y se inoculó un tubo

Eppendorf con caldo infusión cerebro-corazón. Se incubó durante 16-24 horas a 37°C. Se preparó glicerol al 50% diluido con agua destilada y se esterilizó. Se colocaron 400 µL del glicerol al 50% en un vial criogénico y se añadieron 600 µL del cultivo. La solución se mezcló bien utilizando un vórtex a velocidad media o mediante inversiones repetidas. Los crioviales se refrigeraron por 4 horas, luego se congelaron primero a -20°C por 2 horas y por último se colocaron en el ultracongelador a -80°C (Ramírez-Gama *et al.*, 2021).

6.5. Estandarización de inóculo

Se tomó un cultivo en placa con agar *Pseudomonas* F para *P. aeruginosa* ATCC y un cultivo en placa con agar MacConkey para *K. pneumoniae* ATCC de 24 horas de incubación. Se prepararon diferentes suspensiones bacterianas en tubos con 5 mL de solución salina al 0.85% y fueron medidas en el espectro ultravioleta-visible (UV-VIS) a 600 nm. Se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones, hasta 10^{-6} para *P. aeruginosa* y hasta 10^{-4} para *K. pneumoniae*, utilizando tubos con 4.5 mL de solución salina al 0.85% y agregando 500 µL del tubo anterior.

Para la siembra del inóculo se utilizó una asa calibrada de 1 µL (1/1000) y se sembró por duplicado la última dilución de cada bacteria en placas con agar MacConkey. Se estrío con líneas horizontales y una línea central vertical para asegurar una distribución uniforme de la muestra en el medio de cultivo. La estría horizontal permite una mejor dispersión de los microorganismos, mientras que la línea central guía la distribución del inóculo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y después se contaron las colonias en el medio para encontrar la concentración bacteriana que permitiera obtener crecimiento contable y utilizar dicha concentración para los ensayos antimicrobianos con gentamicina y el péptido WB14_F.

6.6. Preparación del péptido WB14_F

El péptido sintético liofilizado WB14_F fue donado por el Dr. Tonatiuh Melgarejo de la Universidad de California en Estados Unidos de América. Está conformado por 14 aminoácidos, su secuencia es GLARILLRWLFFRG y tiene una pureza del 95.36%. Unos viales fueron reconstituidos con ácido acético al 0.01% que a su vez fue diluido con agua destilada, otros solo con agua destilada estéril y otros con ácido acético al 0.1% diluido con solución salina al 0.85%. La concentración final de todos los viales fue 2 mg/mL y una vez reconstituidos fueron almacenados primero a -40 °C por 24 horas y luego a -70 °C hasta su

siguiente uso.

La secuencia de aminoácidos del péptido tiene un 85.7% de identidad con la catelicidina 4 del búfalo de agua, publicada con el número de acceso AIZ93880.1 en la base de datos National Library of Medicine del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Stephen *et al.*, 1997).

6.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de WB14_F

Ensayo de medición de densidad óptica

Primero se añadieron 100 µL de solución salina en los pocillos del perímetro del área de trabajo, para minimizar la evaporación del volumen de los pocillos de ensayo durante la incubación. Luego se agregaron 200 µL de BHI en los pocillos B a D y 100 µL en los pocillos B a D de las columnas 5 a 10. Luego se añadieron 50 µL de ácido acético al 0.01% en los pocillos B a D de la columna. Posteriormente se agregó el péptido WB14_F en su concentración inicial de 2 mg/mL, resuspendido en ácido acético al 0.01% que a su vez fue diluido con agua destilada, en los pocillos B a D de la columna 5 y a partir estos se realizaron diluciones seriadas dobles hasta 62.5 µg/mL.

El inóculo se preparó tomando bacteria de un cultivo de 24 horas para homogenizarlo en 5 mL de solución salina y ajustar su turbidez a un estándar de 4 en la escala de McFarland. Luego se tomó 1 mL de esa suspensión bacteriana y se agregó a otro tubo con 7 mL de caldo BHI para que de esta manera la bacteria se diluyera en 1:8 y la suspensión en BHI quedara en una concentración aproximada del estándar 0.5 de la escala de McFarland. Se añadieron 50 µL de la bacteria en los pocillos B a D de las columnas 5 a 10 como se ilustra en la **Figura 12**.

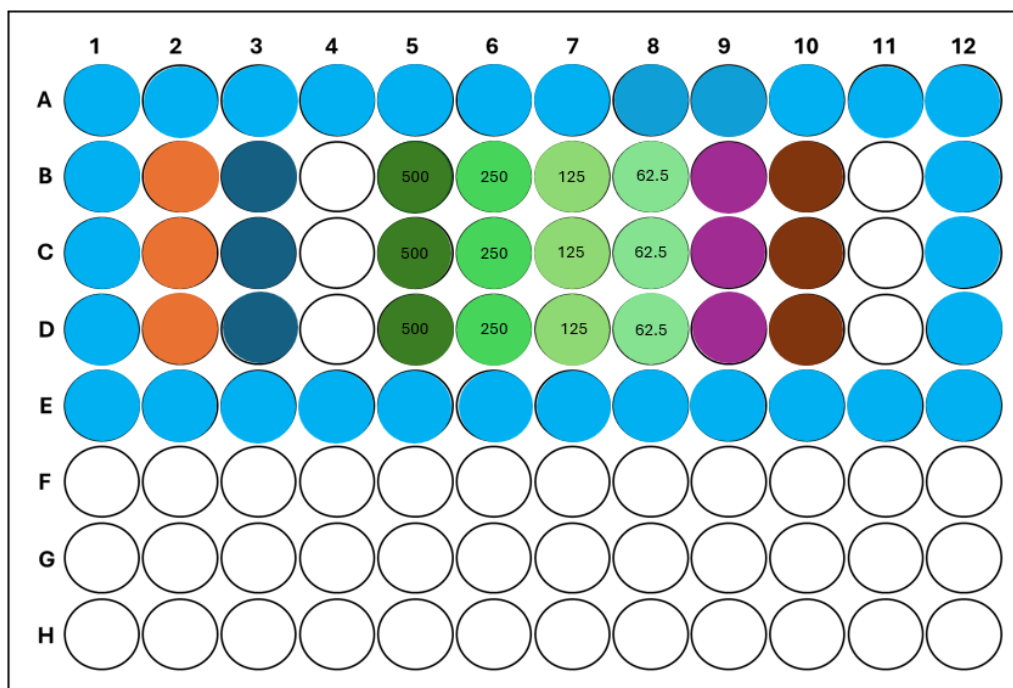


Figura 12. Representación de la placa de 96 pocillos para los ensayos de microdilución en caldo y espectrofotometría. Caldo BHI (color naranja, control de medio sin bacteria); caldo BHI + WB14_F (color azul oscuro, control de medio + WB14_F); WB14_F + bacteria (color verde); ácido acético al 0.01% + bacteria (color azul claro); caldo BHI + bacteria (color púrpura, control de bacteria sin tratar).

La placa se incubó a 37°C por 24 horas y se llevó al espectrofotómetro para medir la densidad óptica (DO) que se usó como medida indirecta del crecimiento bacteriano. Valores más bajos indican mayor eficacia antimicrobiana de WB14_F.

Ensayos de reducción de resazurina medida por espectrofotometría

Siguiendo el protocolo descrito por Barreras-Serrano y colaboradores 2014, con modificaciones, primero se agregaron 200 µL de agua destilada estéril en los pocillos del perímetro de la placa. La gentamicina y el péptido WB14_F se prepararon en soluciones de trabajo 2x en agua destilada estéril.

En los pocillos B a G de la columna 2 se agregaron 200 µL de caldo BHI como control de medio sin bacteria y en los pocillos B a G de las columnas 3 a 11 se agregaron 100 µL del mismo medio. Se añadieron 100 µL de la solución de trabajo 2x de gentamicina o péptido WB14_F en los pocillos B a G de la columna 3 (**Figura 13**) y a partir de estos pocillos se fueron transfiriendo 100 µL hasta la columna 10 y del último pocillo se descartaron 100 µL después de homogenizar con la micropipeta.

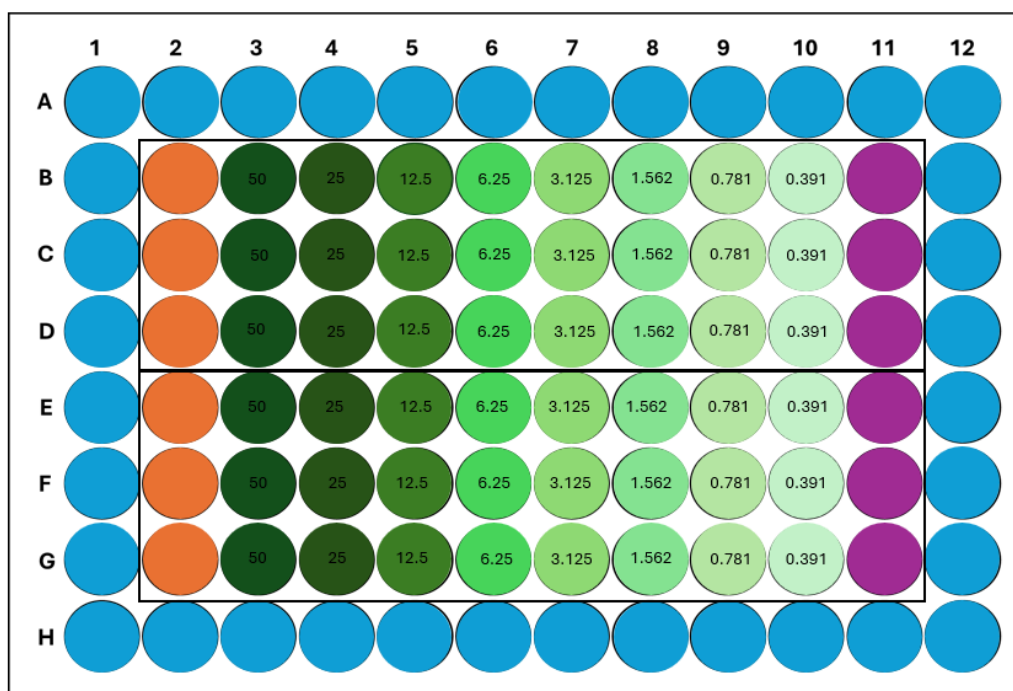


Figura 13. Representación de placa de 96 pocillos en los ensayos de reducción de resazurina por espectrofotometría. Con recuadros negros se delimitó el espacio para un aislado bacteriano. Agua destilada (color azul claro), caldo BHI (color naranja, control de medio sin bacteria); gentamicina (color verde); caldo BHI + bacteria (color púrpura, control de bacteria sin tratar).

Para la preparación del inóculo se tomó 1 colonia de un cultivo de 24 horas de *P. aeruginosa* y de *K. pneumoniae*. Las colonias de cada bacteria se colocaron en un tubo con 5 mL de solución salina al 0.85% estéril, se homogenizó y se ajustó a una absorbancia de 0.070 para *P. aeruginosa* y 0.092 para *K. pneumoniae*, a 600 nm.

Una vez que las absorbancias fueron ajustadas se tomaron 500 µL y se transfirieron a un tubo con 4.5 mL de solución salina al 0.85% estéril del cual nuevamente se tomaron 500 µL para realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} para *P. aeruginosa* y hasta 10^{-4} para *K. pneumoniae*.

Del último tubo se tomaron 100 µL para agregar a cada uno de los pocillos de B a G desde la columna 3 hasta la 11. El número de células que se depositaron en los 100 µL del inóculo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos fue de 8,600 células de *P. aeruginosa* y 200 células de *K. pneumoniae*.

Por último, se añadieron 30 µL de resazurina al 0.015% previamente filtrada, a todos los pocillos (B-G de las columnas 2-11). Las placas se cubrieron con parafilm y papel aluminio, y se incubaron a 37° C durante 18 horas. Cuando las placas se sacaron de la incubadora se

registró el color de todos los pocillos. El principio de la resazurina se basa en su reducción a resorufina por la actividad metabólica de bacterias viables. Un color azul se interpretó como inhibición del crecimiento bacteriano y un color rosa como crecimiento bacteriano.

Después de registrar la visualización del cambio de color, se usó un lector de microplacas para leer la absorbancia a 570 (pico de absorbancia para la resorufina) y 600 nm como valor de referencia para la corrección de turbidez y fondo óptico. Para el cálculo de reducción de resazurina se utilizó la siguiente fórmula (Mouville y Benaroudj, 2020):

$$\% \text{ Reduction of resazurin} = \frac{(E_{\text{oxi } 600} \times A_{570}) - (E_{\text{oxi } 570} \times A_{600})}{(E_{\text{red } 570} \times C_{600}) - (E_{\text{red } 600} \times C_{570})} \times 100$$

Esta fórmula se utiliza para calcular el porcentaje de reducción de resazurina con E oxi 600 representa al coeficiente de extinción molar de la resazurina oxidada a 600 nm (117216); E oxi 570 al coeficiente de extinción molar de la resazurina oxidada a 570 nm (80586); E red 570 al coeficiente de extinción molar de la resazurina reducida a 570 nm (155677); E red 600 al coeficiente de extinción molar de la resazurina reducida a 600 nm (14652); A 570 a la absorbancia del pocillo de tratamiento a 570 nm; A 600 a la absorbancia del pocillo de tratamiento a 600 nm; C 600 a la absorbancia del pocillo de control negativo a 600 nm y C 570 a la absorbancia del pocillo de control negativo a 570 nm.

Posterior a la visualización del color de los pocillos, se realizaron diluciones seriadas en un factor de 10 hasta 10^{-6} para *P. aeruginosa* y hasta 10^{-4} para *K. pneumoniae*, usando otra placa de 96 pocillos. Se tomaron 30 µL de los pocillos correspondientes a la última columna donde el color fue azul (CMI), de una columna antes (concentración de gentamicina mayor), de una columna después (concentración de gentamicina menor) y del control positivo de crecimiento de cada uno de los aislados para diluirlos con 270 µL de solución salina al 0.85% estéril, en una placa de 96 pocillos. Del sexto pocillo se tomó 1 µL con asa calibrada (1/1000) para sembrar en placa con agar MacConkey.

Las placas se incubaron por 18 a 24 horas y se visualizó la presencia o ausencia de colonias. La concentración por arriba de la CMI en la cual no se observó crecimiento de colonias en placa se consideró como la CMB. En la concentración por debajo de la CMI no debe observarse presencia de colonias. Se calculó la media de las colonias contadas en las placas de las 3 réplicas por concentración de tratamiento y del control positivo, y se hicieron los

cálculos correspondientes a los factores de dilución.

6.8. Evaluación de la actividad hemolítica de WB14_F

Para este ensayo se siguió el protocolo descrito por Zhou y colaboradores (2021) modificado. Se recolectó sangre de un individuo sano utilizando un tubo verde con anticoagulante de heparina sódica. Se centrifugó el tubo a 3000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con pipeta de transferencia. Utilizando otra pipeta de transferencia se agregó PBS estéril en un volumen total al doble del paquete globular, se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se descartó sobrenadante, todo esto se realizó 3 veces (3 lavados). Para preparar 5 mL de suspensión de eritrocitos al 8% se utilizó un tubo Falcon de 15 mL, en el cual se agregaron 400 µL del paquete globular y 4.6 mL de PBS. Se homogenizó por inversión.

El péptido WB14_F se preparó en una concentración de 200 µg/mL, por lo tanto, se tomaron 100 µL del péptido en su concentración inicial y se homogenizaron con 400 µL de ácido acético al 0.01% estéril para un volumen total de 500 µL. Se agregaron 100 µL de la suspensión de eritrocitos en 30 tubos Eppendorf (9 tubos para controles y 24 tubos para tratamiento). Del péptido preparado se transfirieron 100 µL por tubo en 3 tubos desde los cuáles se realizaron diluciones seriadas dobles hasta 1.56 µg/mL. Como control negativo se agregaron 100 µL de PBS y como control positivo 100 µL de agua destilada. También se realizó un control para el ácido acético al 0.01%. Todos los tubos se incubaron por 1 hora y después de este tiempo se centrifugaron a 13,000 rpm por 3 minutos.

En una placa de 96 pocillos estéril se colocaron 100 µL del sobrenadante de todos los tubos y para calcular el porcentaje de hemólisis basado en la hemoglobina liberada por las células, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, y se utilizó la formula:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{(\text{Abs de muestra} - \text{Abs de control negativo})}{(\text{Abs de control positivo} - \text{Abs de control negativo})} \times 100.$$

6.9. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humanas

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) se realizó mediante un proceso de centrifugación en medio de gradiente de densidad. Primero se tomó sangre de un individuo sano utilizando jeringa con heparina. La sangre se transfirió a un tubo Falcon y se diluyó con PBS estéril en una proporción v/v de 1:1. Se preparó otro tubo

de 50 mL con 15 mL de Histopaque y se colocó cuidadosamente la sangre diluida sobre el Histopaque usando una pipeta de transferencia. Para evitar mezclar las fases se sostuvo el tubo en un ángulo de 20 a 45 grados de manera que la sangre se dejó correr por la pared del tubo lentamente. Se deben obtener dos fases claramente separadas. Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se recogió con cuidado usando una micropipeta la fase de PBMC, que se puede identificar como una banda blanca situada entre las capas del Histopaque y el plasma. Las PBMC se colocaron en otro tubo Falcon de 50 mL y se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS + 0.5% albúmina sérica bovina) agregando el doble del volumen y centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos (Sudeep *et al.*, 2017; Zink *et al.*, 2023).

6.10. Evaluación de la actividad citotóxica de WB14_F

La actividad citotóxica se evaluó probando el péptido WB14_F (preparado con agua destilada) a diferentes concentraciones sobre PBMC humanas. Se utilizó azul de tripán para identificar y contar las células viables, las cuales se observaron por microscopia óptica de acuerdo con el protocolo descrito por Strober (2019), modificado. Las células vivas poseen membranas celulares intactas mientras que las células muertas no lo hacen y el azul tripán entra a la célula.

Se resuspendió el pellet celular obtenido en 1 mL de PBS y en 30 tubos Eppendorf se dispensaron 50 µL en cada uno. Luego se agregaron 50 µL del péptido WB14_F a diferentes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 y 0.390 µg/mL. Como control negativo se utilizaron 50 µL de PBS y como control positivo se utilizaron 50 µL de agua destilada. Finalmente se agregaron 50 µL de azul tripán al 0.4% a todos los tubos y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos. Todas las concentraciones y controles se probaron por triplicado.

Después del tiempo de incubación, se transfirieron 10 µL de cada pocillo en una cámara de recuento de un hemocitómetro y se observó en el microscopio. Se contaron las células vivas (no azules) y células muertas (azules). Para obtener el número total de células viables por mL de alícuota, se multiplicó el número total de células viables por 2 (el factor de dilución del azul tripán). Para obtener el número total de células por mL de alícuota, se sumó el número total de células viables y no viables y se multiplicó por 2. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{Número total de células viables por mL de alicuota}}{\text{Número total de células por mL de alicuota}} \times 100$$

6.11. Ensayo de modulación inmunológica de WB14_F

La modulación inmunológica se evaluó de manera indirecta utilizando células sanguíneas del sistema inmune. Primero se tomaron muestras de sangre en tubos heparinizados y la sangre se transfirió a tubos Eppendorf dispensando 1 mL a cada uno. En diferentes tubos se añadió 1 mL del péptido WB14_F preparado en una solución de trabajo 2X (50 µg/mL) utilizando RPMI 1640, 1 mL de RPMI 1640 como control negativo, y 1 mL de bacteria como control positivo. El inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se preparó a 8.6×10^{-4} UFC/mL en RPMI 1640 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 a 5.0×10^{-4} UFC/mL en RPMI 1640. Los tubos se incubaron por 24 horas y después se centrifugaron a 1800 rpm por 15 minutos. Se recolectó el plasma con los factores solubles secretados, se transfirió a nuevos tubos y se utilizó como tratamiento en un nuevo ensayo antimicrobiano.

El ensayo antimicrobiano consistió en agregar a una microplaca, 100 µL del plasma recolectado en 100 µL de caldo BHI. Luego se agregaron 20 µl de cada bacteria en pocillos diferentes. Se inoculó *P. aeruginosa* ATCC 27853 (8.6×10^{-4} UFC/mL), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (5.0×10^{-4} UFC/mL), P012 (8.6×10^{-4} UFC/mL) y K065 (5.0×10^{-4} UFC/mL), en fase logarítmica. Se agregaron 30 µL de resazurina y se leyó la absorbancia a 570 y 600 nm después de 18 horas de incubación a 37°C.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo e identificación de los aislados de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

En agar Pseudomonas F, los aislados de *P. aeruginosa* se observaron como colonias grandes de forma circular, convexas, irregulares y de consistencia viscosa. A lo largo del estriado y de forma dispersa en el medio se pudo visualizar la producción de pioverdina en todos los aislados. Mientras que los aislados de *K. pneumoniae* en agar MacConkey se observaron como colonias grandes circulares, lisas y de consistencia mucoide; las colonias y el medio exhibieron una pigmentación rosada, debido a la fermentación de la lactosa contenida en el medio.

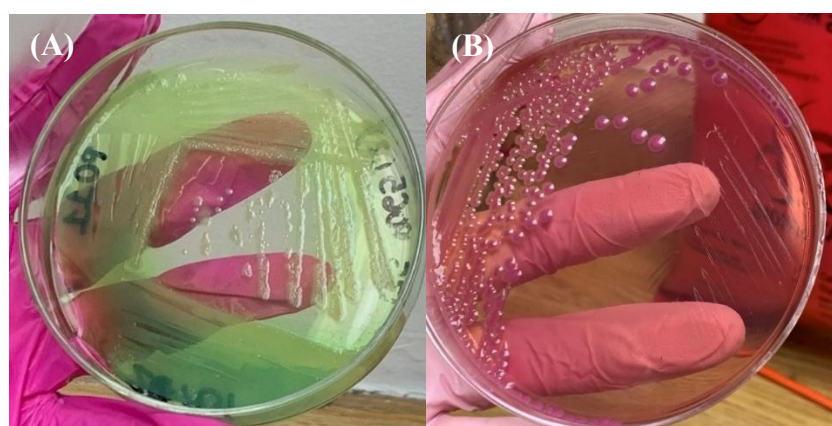


Figura 14. Aislados clínicos de *P. aeruginosa* en agar *Pseudomonas* F (A) y *K. pneumoniae* en agar MacConkey (B).

Los aislados crecidos en el agar Pseudomonas F se identificaron como bacilos Gram negativos y los aislados crecidos en agar MacConkey se identificaron como bacilos Gram negativos ureasa positivos.

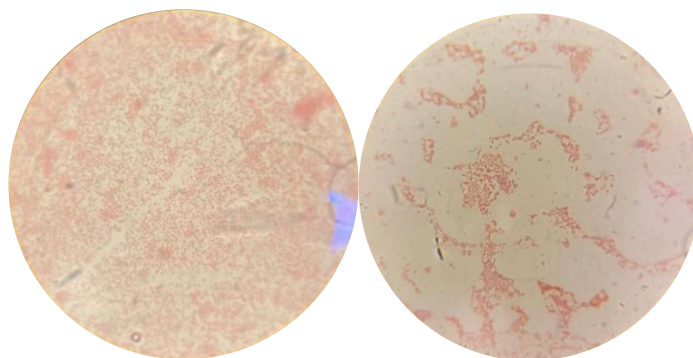


Figura 15. Morfología microscópica de los aislados de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Del lado izquierdo se observan bacilos Gram negativos de *P. aeruginosa* y del lado derecho se observan bacilos Gram negativos de *K. pneumoniae*.

En las **Figuras 16 y 17** se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas que permitieron la identificación de cada bacteria.

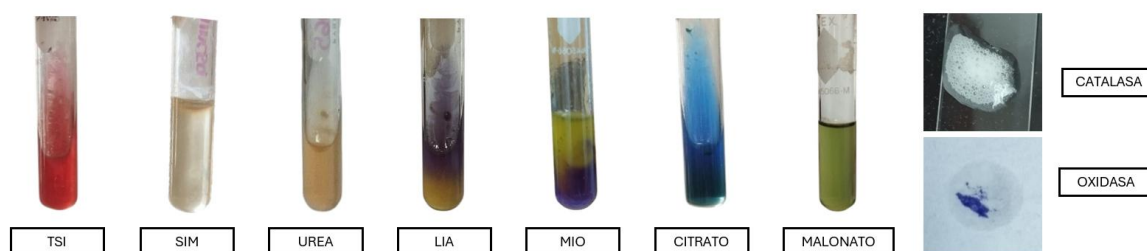


Figura 16. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados de *P. aeruginosa*. TSI: bisel: K, fondo: K, negativa para producción de CO_2 y producción de H_2S . SIM: negativa para producción de H_2S e indol y positiva para movilidad. Ureasa: negativa. LIA: negativa para la descarboxilación y desaminación de lisina y producción de H_2S . MIO: móvil, pero es negativa para la producción de indol y la actividad enzimática ornitina decarboxilasa. Citrato: puede utilizar citrato como única fuente de carbono y energía. Catalasa: positivo. Malonato: negativo. Oxidasa: positiva.

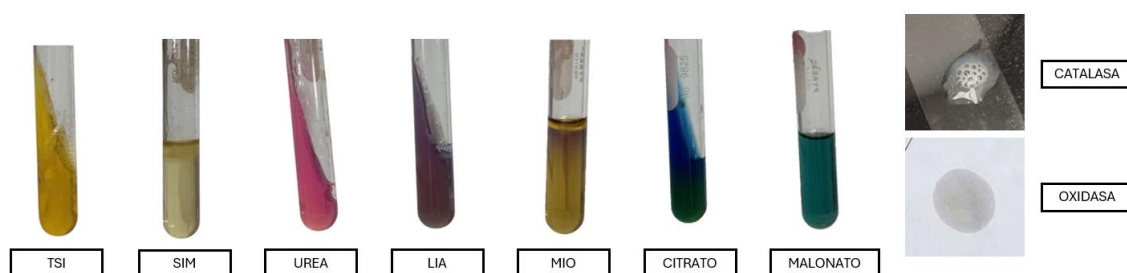


Figura 17. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados de *K. pneumoniae*. TSI: bisel: A, fondo: A, positiva para producción de CO_2 y negativa para producción de H_2S . SIM: negativa para producción de H_2S , indol y movilidad. Ureasa positiva. LIA: positiva para la descarboxilación de lisina y negativa para la desaminación de lisina y la producción de H_2S . MIO: negativa para movilidad, producción de indol y actividad enzimática ornitina decarboxilasa. Citrato: puede utilizar citrato como única fuente de carbono y energía. Catalasa: positivo. Malonato: positiva. Oxidasa: negativa

En cuanto a la cinética de crecimiento de los aislados, en la **Figura 18** se puede observar la densidad óptica registrada a través del tiempo, la cual refleja la densidad bacteriana. *P. aeruginosa* comenzó su fase exponencial a las 6 horas y *K. pneumoniae* a la hora 1.

Curva de crecimiento de los aislados bacterianos

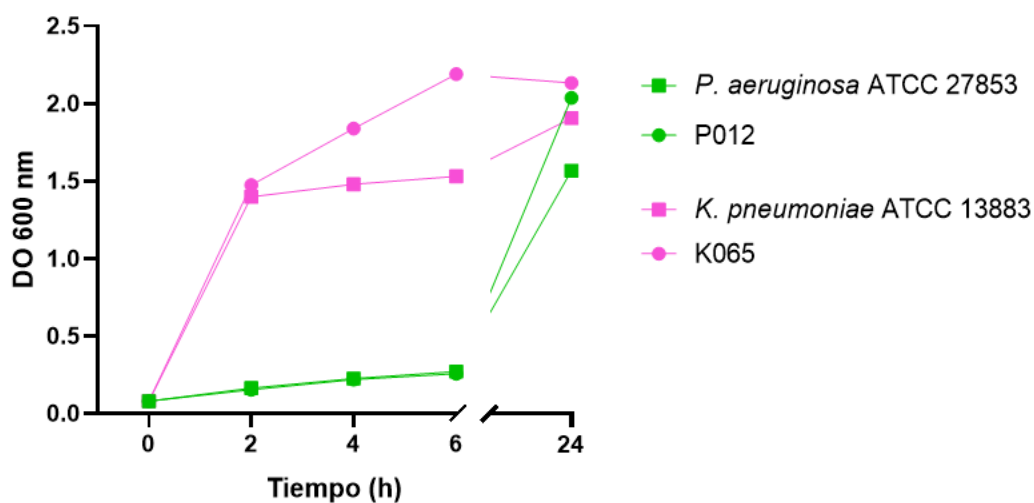


Figura 128. Curva de crecimiento de los aislados bacterianos.

7.2. Clasificación de resistencia antimicrobiana de los aislados

El aislado de P012 fue resistente a 7 de los 10 grupos de antibióticos para *P. aeruginosa* y el aislado K065 fue resistente a 4 de los 12 grupos de antibióticos para *K. pneumoniae*. De acuerdo con las definiciones de aislados MDR establecidos por Jiménez y colaboradores (2019), los aislados fueron clasificados como MDR.

Tabla 3. Resistencia de P012 a los grupos de antibióticos establecidos para la clasificación de resistencia.

P012	
Grupo de antibióticos	
Piperacilina/Tazobactam	ND
Ceftazidima	Resistente
Cefepima	Resistente
Aztreonam	ND
Imipenem	ND
Meropenem	Resistente
Gentamicina	Resistente
Amikacina	Resistente
Ciprofloxacino o levofloxacino	Resistente
Colistina	Resistente

ND: Grupo de antibiótico o antibiótico no documentado.

Tabla 4. Resistencia de K065 a los grupos de antibióticos establecidos para la clasificación de resistencia.

K065	
Grupo de antibióticos	
Amoxicilina-ácido clavulánico o ampicilina-sulbactam	Resistente
Piperacilina, tazobactam	ND
Ceftazidima o cefotaxima/ceftriaxona o cefepima	Resistente
Imipenem o meropenem	Sensible
Aztreonam	ND
Gentamicina	Resistente
Amikacina	Sensible
Ciprofloxacino	Intermedia
Trimetoprima-sulfametoxazol	Resistente
Fosfomicina	ND
Tigeciclina	ND
Colistina	ND

ND: Grupo de antibiótico o antibiótico no documentado. Resistencia intermedia (I): “Sensible” (S).

7.3. Estandarización del inóculo para cuenta en placa

La media de crecimiento bacteriano de la suspensión B de *P. aeruginosa* fue de 86 colonias y la de la suspensión bacteriana A de *K. pneumoniae* fue de 5 colonias (**Tabla 5**). Por lo que se seleccionaron las absorbancias de 0.070 y 0.092 respectivamente, como la concentraciones del inóculo inicial para el ensayo antimicrobiano con gentamicina y con el péptido WB14_F.

Tabla 5. Suspensiones bacterianas y su crecimiento en placa.

Bacteria	<i>P. aeruginosa</i>			<i>K. pneumoniae</i>		
Suspensión bacteriana	A	B	C	A	B	C
Absorbancia (600 nm)	0.040	0.070	0.150	0.092	0.134	0.197
UFC/mL en placa	0	86	>100	2	7	12
Densidad celular	Sin crecimiento	8.6×10^{10}	Incontable	2×10^7	7×10^7	1.2×10^8

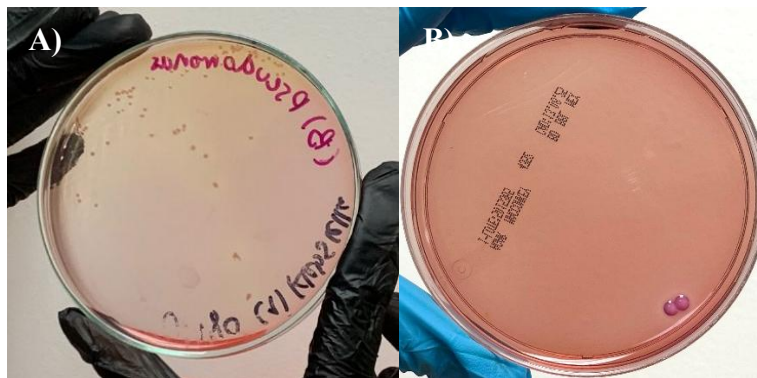


Figura 139. Siembra en placa de suspensiones bacterianas. A) Siembra de suspensión B de *P. aeruginosa*, la media fue de 86 UFC/mL. B) Siembra de suspensión A de *K. pneumoniae*, la media fue de 2 UFC/mL.

La densidad celular se calculó con la media de la siembra por duplicado de suspensión celular. La media de colonias de *P. aeruginosa* de una absorbancia de 0.070 fue de 86 y para *K. pneumoniae* de una absorbancia de 0.092 fue de 2. Estas medias se multiplicaron por el factor de dilución del asa utilizada (1:1,000) y luego por el factor de dilución en tubo (1:1,000,000 para *P. aeruginosa* y 1:10,000 para *K. pneumoniae*).

7.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de WB14_F

Ensayo de medición de densidad óptica

Se observó una diferencia significativa entre todas las concentraciones de WB14_F resuspendido en ácido acético al 0.01% diluido con agua destilada, sobre P012 y K065, en comparación con la bacteria no tratada. La eficacia de WB14_F depende significativamente tanto del aislado como de la concentración utilizada. No obstante, también hubo una diferencia significativa entre el ácido acético al 0.01% y el control de bacteria no tratada.

Actividad antimicrobiana de WB14_F sobre aislados MDR

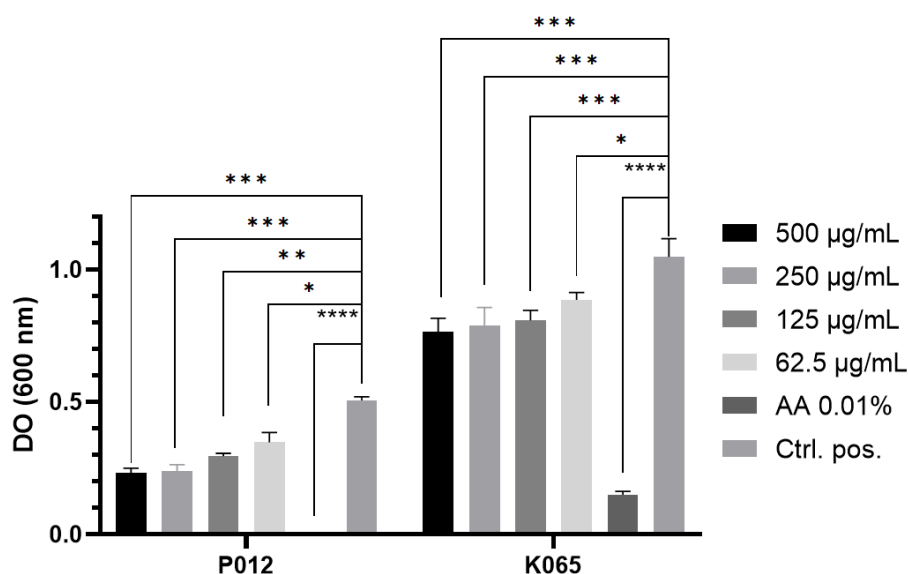


Figura 20. Efecto de WB14_F sobre aislados MDR de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. WB14_F reduce la DO de forma dosis-dependiente en ambos aislados. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías seguido de una Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett con una $\alpha=0.05$.

Ensayos de reducción de resazurina medida por espectrofotometría

En la placa de 96 pocillos la concentración de 3.125 µg/mL de gentamicina fue la CMI sobre la cepa de referencia ATCC de *P. aeruginosa*. Sin embargo, no hubo crecimiento de colonias en esta concentración pero sí en la concentración por debajo que fue de 1.562 µg/mL, habiendo crecido más de 100 colonias. Por lo tanto se reportó 3.125 µg/mL como la CMB y <3.125 µg/mL como la CMI. En la placa de 96 pocillos la CMI del péptido WB14_F resuspendido en agua destilada, fue de 50 µg/mL, pero en la siembra en placa 50 µg/mL se determinó como la CMB ya que no hubo crecimiento de colonias en esa placa, mientras que en 25 µg/mL sí hubo crecimiento y por eso la CMI fue de <50 µg/mL.

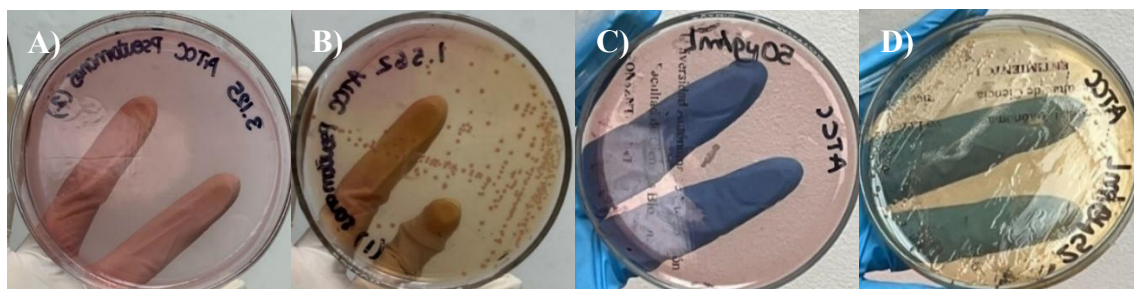


Figura 21. Siembra en placa de *P. aeruginosa* después del tratamiento con gentamicina y WB14_F. A) Ausencia de colonias en 3.125 µg/mL de gentamicina. B) >100 colonias con 1.562 µg/mL de gentamicina. C) Ausencia de colonias en 50 µg/mL de WB14_F. D) Crecimiento incontable bacteriano en 25 µg/mL de WB14_F.

Con una concentración de 3.125 µg/mL de gentamicina se observó una reducción de la resazurina del 38%, mientras que la del control no tratado fue del 77%. Se observan diferencias significativas ($p < 0.0001$) en las concentraciones de 3.125 a 50 µg/mL comparadas con el control positivo, indicando actividad inhibitoria significativa. Mientras que sólo la concentración de 50 µg/mL de WB14_F muestra inhibición significativa ($p < 0.0001$). El porcentaje de reducción de resazurina con esta concentración fue de 21% y la del control de bacteria sin tratar fue de 82%. Curiosamente, 25 µg/mL muestra un aumento significativo en la reducción de resazurina respecto al control positivo.

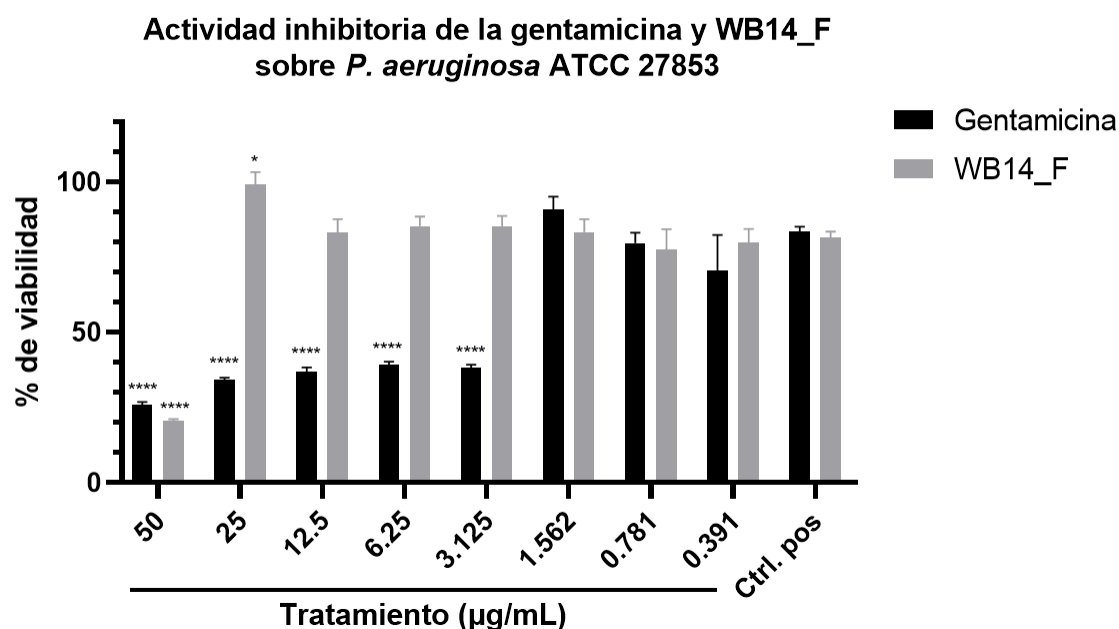


Figura 22. Efecto de la gentamicina y WB14_F sobre la actividad metabólica de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Porcentaje de reducción de resazurina metabolizada por *P. aeruginosa* viable. Existen diferencias significativas entre las concentraciones de 50 a 3.125 µg/mL de gentamicina en comparación con la reducción de resazurina por la bacteria no tratada. Sólo la concentración de 50 µg/mL de WB14_F mostró una inhibición significativa. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías seguido de una Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett con una $\alpha=0.05$.

La CMI de la gentamicina sobre *K. pneumoniae* que se observó en la placa de 96 pocillos fue de 3.125 µg/mL. Sin embargo, cuando se sembró esta concentración, se pudo observar que en 3.125 no creció nada y en 1.562 µg/mL crecieron 2 colonias. Por lo tanto se determinó que la CMB es 3.125 µg/mL y la CMI es <3.125 . Por otro lado, con el péptido WB14_F, resuspendido en agua destilada, no se observó una CMI, por lo que no se realizó siembra en placa y no se determinó una CMB.



Figura 23. Siembra en placa de *K. pneumoniae* ATCC 13883 después del tratamiento con gentamicina y WB14_F. A) Ausencia de colonias en 3.125 µg/mL. B) 2 colonias en 1.562 µg/mL.

Todas las concentraciones probadas de gentamicina sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883 tuvieron un efecto significativo en la reducción de resazurina. La CMB que se determinó (3.125 µg/mL) redujo en un 25% la resazurina y la bacteria sin tratar la redujo en un 81%, No se observó ninguna diferencia significativa entre la reducción de resazurina por ninguna concentración de WB14_F evaluada.

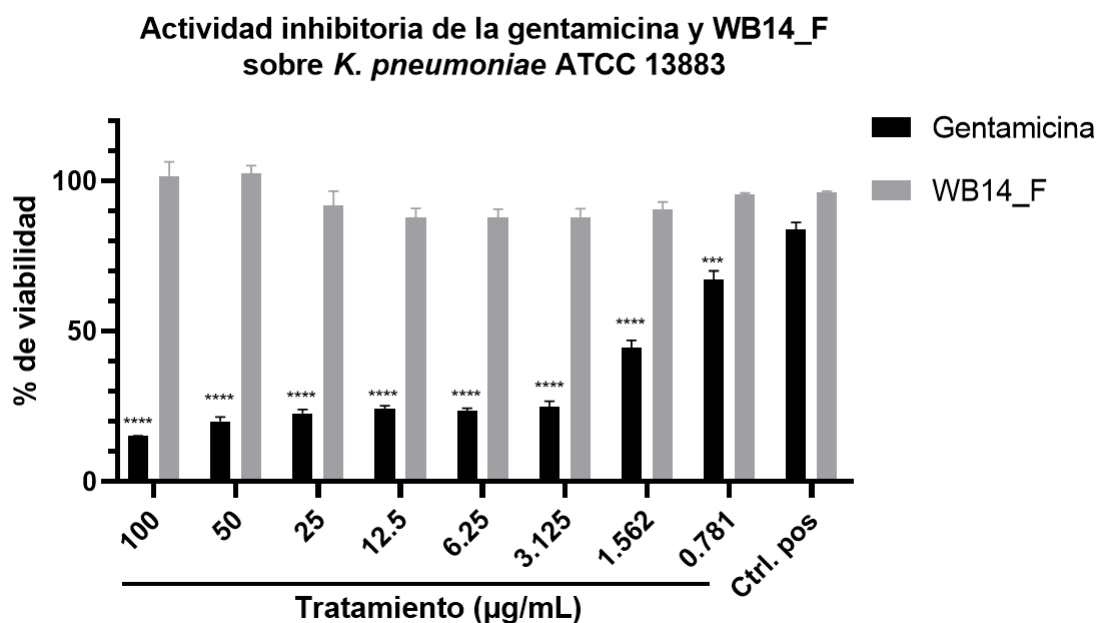


Figura 24. Efecto de la gentamicina y WB14_F sobre la actividad metabólica de *K. pneumoniae* ATCC 13883. Porcentaje de reducción de resazurina metabolizada por *K. pneumoniae* viable. Existen diferencias significativas entre todas las concentraciones de gentamicina en comparación con la reducción de resazurina por la bacteria no tratada, pero no hay diferencias significativas entre las concentraciones de WB14_F y el control. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías, seguido de una Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett con una $\alpha=0.05$.

El péptido WB14_F, resuspendido en agua destilada, no tuvo una CMI ni una CMB sobre los aislados P012 y K065 y solo con la concentración de 50 µg/mL se observó una reducción de resazurina significativa del aislado P012, la cual fue del 25%, en comparación con el control positivo donde se observó una reducción del 74%. Para el aislado K065, no se observaron reducciones significativas en ninguna de las concentraciones ensayadas. Los valores se mantuvieron en 45–60 %, lo que sugiere una menor sensibilidad al péptido.

Actividad antimicrobiana de WB14_F sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

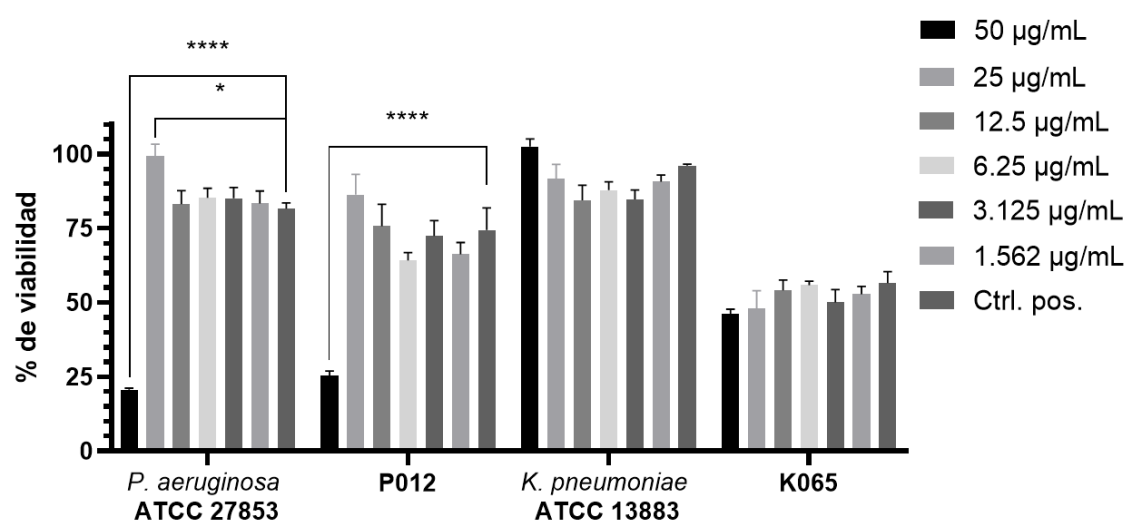


Figura 25. Efecto de WB14_F sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* drogossensibles y aislados MDR. Porcentaje de reducción de resazurina metabolizada por *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* viable. *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue la bacteria más susceptible, con una significativa reducción de resazurina y existe una diferencia significativa entre 50 µg/mL de WB14_F sobre P012, cuya reducción fue de 25% y el control de bacteria sin tratar. Ninguna concentración es significativamente efectiva sobre K065. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías seguido de una Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett con una $\alpha=0.05$.

Con el péptido WB14_F resuspendido en ácido acético al 0.1% en solución salina al 0.85% y en ácido acético al 0.01% en solución salina al 0.85%, no se observó una CMI y por lo tanto no se sembró en placa y no se observó una MBC. La concentración del péptido como el tipo de ácido acético influyeron en la reducción de resazurina. En AA al 0.1%, 200, 100 y 12.5 µg/mL mostraron una reducción significativa de la viabilidad bacteriana respecto al control positivo, lo que indica efecto antimicrobiano, mientras que, en AA al 0.01%, ninguna concentración del péptido fue significativamente diferente del control positivo. Sin embargo, también existe diferencia significativa entre el ácido acético en comparación con el control.

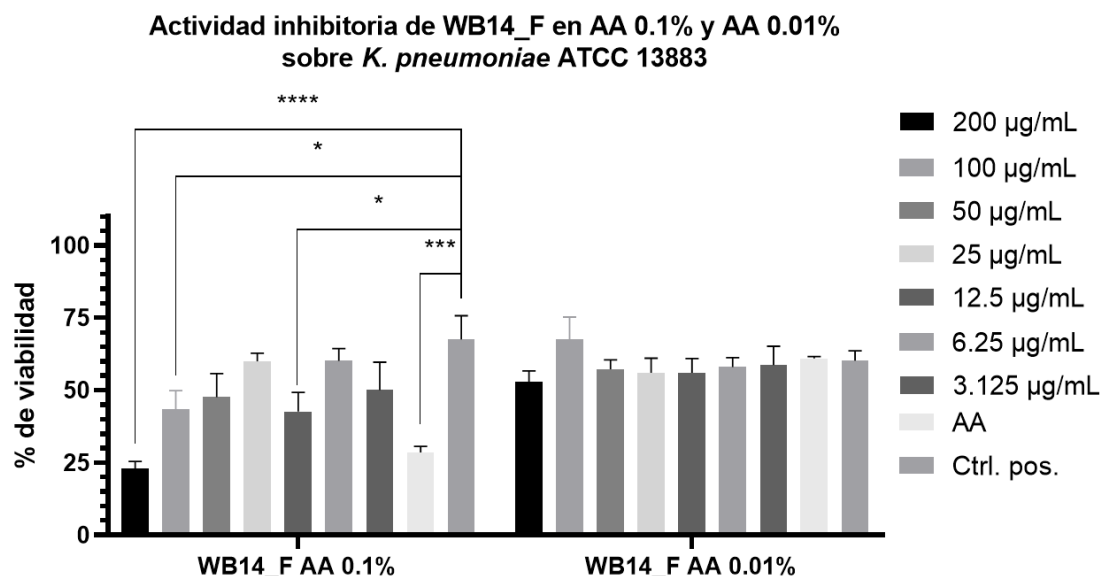


Figura 26. Actividad antimicrobiana del WB14_F frente a *K. pneumoniae* ATCC 13883. El péptido fue resuspendido en ácido acético (AA) al 0.1% o 0.01%, preparado en solución salina al 0.85%. Se observó un efecto dependiente de la concentración del péptido y de la concentración del AA (ANOVA de dos vías, $p < 0.05$). Las comparaciones múltiples (Dunnett) indicaron que sólo algunas concentraciones en AA 0.1% fueron significativamente diferentes del control positivo.

7.5. Evaluación de la actividad hemolítica de WB14_F

El péptido WBCATH se preparó con ácido acético al 0.1% previamente diluido con solución salina al 0.85% y se evaluó su actividad hemolítica a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL) frente a eritrocitos humanos. La actividad hemolítica observada fue de 11.66% en la concentración más alta probada y de 0.43% en la concentración más baja.

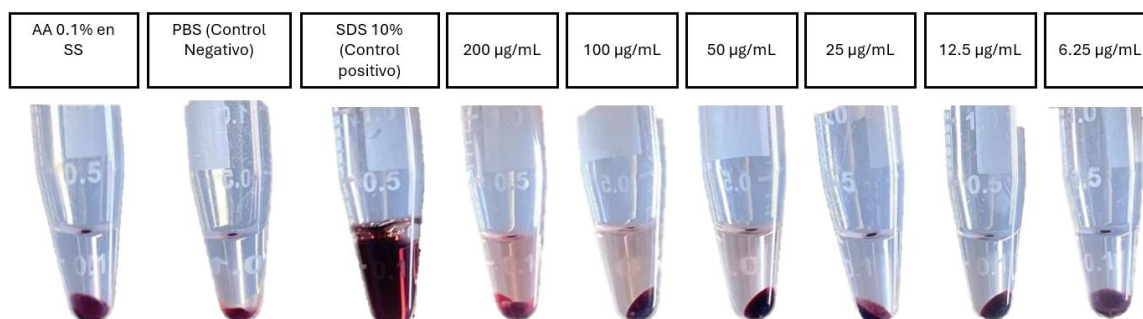


Figura 27. Evaluación visual de la hemólisis inducida por el péptido WB14_F sobre eritrocitos humanos. Se muestran los sobrenadantes de eritrocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del péptido WB14_F (200–6.25 µg/mL) y controles. Se observa una liberación de hemoglobina aparentemente proporcional a la concentración del péptido.

Tabla 6. Porcentaje de hemólisis inducida por el péptido WB14_F en eritrocitos humanos a diferentes concentraciones.

Concentración de WB14_F (µg/mL)	% de hemólisis
200	11.66 ± 0.45
100	6.71 ± 0.48
50	2.83 ± 0.19
25	4.89 ± 0.63
12.5	0.75 ± 0.21
6.25	0.43 ± 0.11
AA 0.1%	0.32 ± 0.05

Los datos son presentados como la media ± el error estándar de la media.

7.6. Evaluación de la actividad citotóxica de WB14_F

Se evaluó el porcentaje de viabilidad celular de células control y células tratadas con WB14_F en agua destilada, utilizando la técnica de exclusión del colorante azul de tripán. La viabilidad de las células tratadas con la mayor concentración probada (50 µg/mL) fue 25.00 %, pero con la menor concentración probada (0.391 µg/mL) se observó un 72.22% de células (**Tabla 7**). Existe una tendencia estadísticamente significativa en la relación entre la concentración del péptido y la viabilidad celular ($p < 0.05$).

Tabla 7. Porcentaje de PBMC viables y no viables tratadas con diferentes concentraciones de WB14_F.

Conc. de WB14_F (µg/mL)	% de células viables	% de células no viables
50	25.00	75.00
25	58.33	41.67
12.5	66.67	33.33
6.25	46.15	53.85
3.12	66.67	33.33
1.562	71.43	28.57
0.781	68.42	31.58
0.391	72.22	27.78

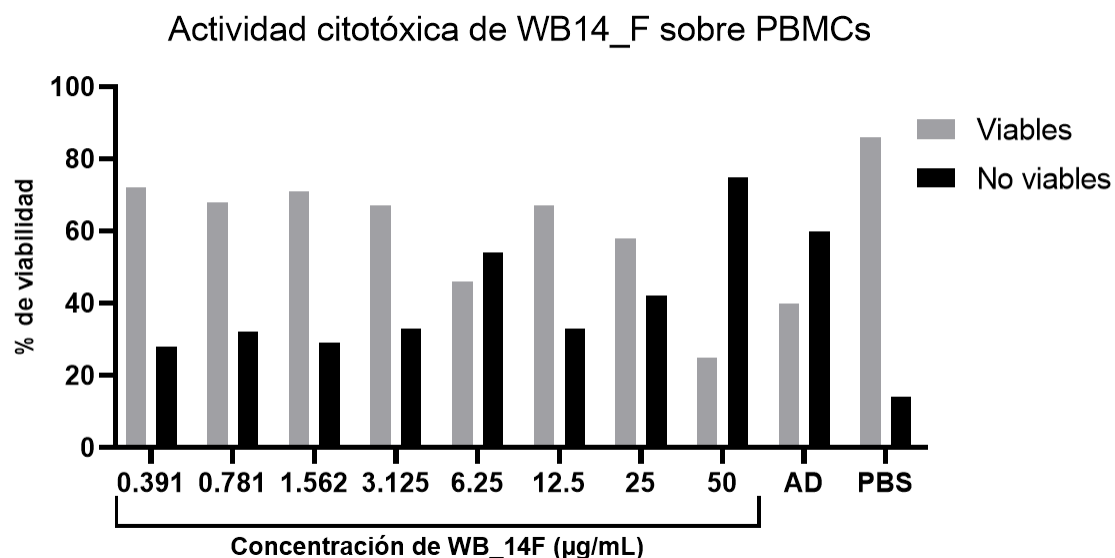


Figura 28. Porcentaje de viabilidad de PBMC tratadas con diferentes concentraciones de WB14_F. Técnica de exclusión del colorante azul de tripán. Prueba de Chi-cuadrada de tendencia de Cochran-Armitage ($p=0.0006$). AD: Agua destilada, como control positivo, PBS: Tampón de fosfatos, como control negativo.

7.7. Evaluación de la modulación inmunológica de WB14_F

Se evaluó si el plasma derivado de células inmunes sanguíneas, expuestas al péptido WB14_F presentan efecto antimicrobiano sobre las cepas drogossensibles y MDR de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. La reducción de resazurina fue menor con el plasma del control positivo que con el plasma del tratamiento con WB14_F. Las células inmunes activadas por la bacteria generaron un plasma con mayor capacidad de inhibir a esa misma bacteria. Sin embargo, sobre ninguna bacteria el plasma derivado de células tratadas con WB14_F no fue significativamente distinto al del control negativo. Por lo tanto, no se observó que el péptido activara a las células de manera funcional, al menos en términos de generar un plasma con efecto antimicrobiano detectable por el ensayo de reducción de resazurina.

**Efecto de plasma derivado de células sanguíneas
expuestas a WB14_F sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae***

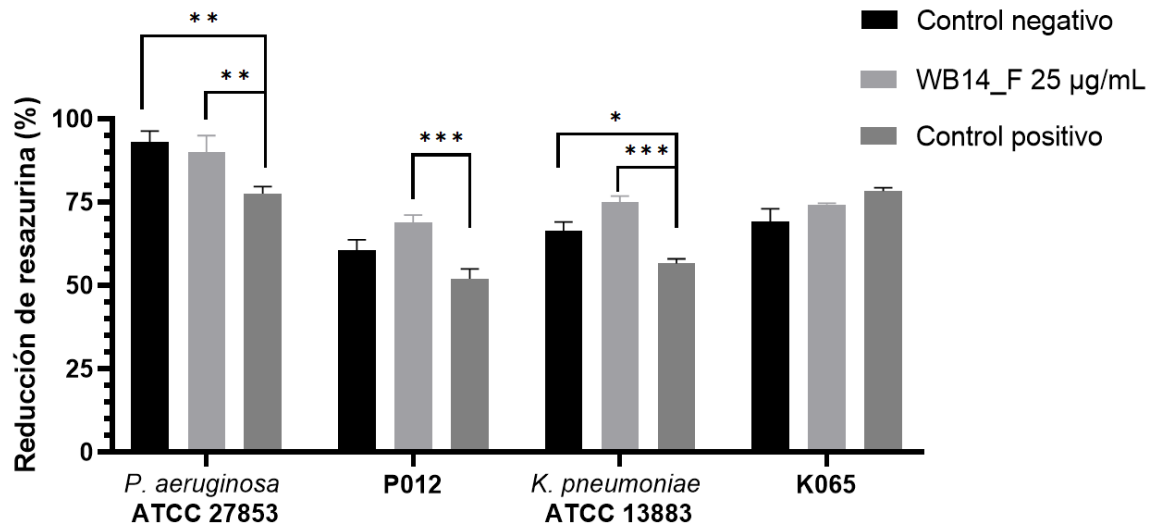


Figura 14. Evaluación del efecto antimicrobiano del plasma derivado de células inmunes sanguíneas humanas expuestas a WB14_F (25 µg/mL) sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. No hubo diferencias significativas entre el control negativo y el tratamiento con WB14_F en ninguna de las bacterias, aunque sí hubo diferencias con el control positivo. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías, seguido de una Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett con una $\alpha=0.05$.

8. DISCUSIÓN

El péptido WB14_F mostró un efecto antimicrobiano dosis-dependiente sobre aislados MDR de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* evaluado mediante la medición de densidad óptica. En ambos casos, la exposición a concentraciones crecientes de WB14_F, resuspendido en ácido acético al 0.01% diluido en agua destilada, resultó en una reducción significativa de la densidad bacteriana en comparación con las bacterias no tratadas. Palacios y colaboradores (2023) reportaron que con concentraciones de 32 y 64 µg/mL de WBCATH sobre *Mycobacterium tuberculosis*, hay una disminución significativa de la absorbancia, sin embargo se requiere una concentración notablemente mayor de WB14_F para obtener un efecto comparable sobre P012 y K065, bajo el ensayo realizado.

La comparación directa entre la gentamicina y el péptido WB14_F en cepas drogossensibles mostró que el péptido presentó una menor potencia antimicrobiana. En *P. aeruginosa* ATCC 27853, la concentración mínima bactericida (CMB) de gentamicina fue de 3.125 µg/mL, ya que no se observó crecimiento bacteriano en cuenta en placa a esta concentración, mientras que para observar el mismo efecto pero con WB14_F fue necesaria una concentración de 50 µg/mL. La reducción de resazurina fue del 38% con gentamicina, mientras que con WB14_F fue del 21%, comparado con un 82% de reducción en el control sin tratar. Ambos agentes lograron una inhibición bacteriana completa en términos de viabilidad en placa pero se observó una actividad metabólica que plantea la posibilidad de que el tratamiento haya inducido un estado viable pero no cultivable (VBNC). Este estado se caracteriza por una supresión del crecimiento en medios convencionales a pesar de la viabilidad metabólica, y ha sido descrito como un mecanismo de persistencia bacteriana frente a estrés antimicrobiano (Mangiaterra *et al.*, 2023). La capacidad de WB14_F para inducir esta condición debe evaluarse en estudios posteriores, ya que podría tener implicaciones importantes en el control de infecciones crónicas o recurrentes.

En el caso de *K. pneumoniae* ATCC 13883, todas las concentraciones evaluadas de gentamicina mostraron un efecto significativo en la reducción de resazurina. La concentración mínima bactericida (CMB) fue de 3.125 µg/mL, con una reducción de resazurina del 25%, mientras que la bacteria sin tratar redujo el colorante en un 81%. En contraste, ninguna de las concentraciones evaluadas de WB14_F mostró un efecto significativo. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Sermkaew y colaboradores (2024), quienes evaluaron la eficacia de un péptido antimicrobiano derivado de

Paenibacillus thiaminolyticus NNS5-6 sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* reportando una mayor susceptibilidad de *P. aeruginosa* al AMP, ya que se determinó una MBC menor para esta bacteria. Es posible que factores como una estructura de envoltura celular más compleja y los mecanismos de resistencia intrínsecos de *K. pneumoniae* la hicieran menos susceptible.

De todas las concentraciones evaluadas, únicamente 50 µg/mL logró actuar como concentración mínima bactericida (CMB), y esto fue exclusivamente sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853, ya que no se observó crecimiento bacteriano en la siembra en placa. En el resto de los ensayos antimicrobianos no se identificaron concentraciones bactericidas, observándose únicamente una reducción en la actividad metabólica medida por resazurina. Es importante destacar que esta reducción no necesariamente refleja una disminución en el número de bacterias viables, sino únicamente una menor actividad metabólica de las células presentes. No puede descartarse que las bacterias hayan persistido en igual número pero en un estado fisiológico menos activo, posiblemente como mecanismo de tolerancia al péptido.

La concentración de 25 µg/mL de WB14_F provocó un aumento significativo en la reducción de resazurina respecto al control positivo en *P. aeruginosa* ATCC 27853, lo cual podría reflejar una estimulación del metabolismo bacteriano a concentraciones subinhibitorias. Gorr y colaboradores (2022), evaluaron el péptido DGL13K derivado de la proteína salival humana BPIFA2 y observaron que concentraciones subinhibitorias estimularon el crecimiento y la actividad metabólica de bacterias gramnegativas resistentes, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, sin inducir resistencia adquirida tras exposiciones repetidas.

En *P. aeruginosa* MDR (P012), solamente la concentración de 50 µg/mL tuvo un efecto significativo, reduciendo la resazurina en un 25%, mientras que la bacteria sin tratar presentó una reducción del 74%. En *K. pneumoniae* MDR (K065), no se observaron reducciones significativas con ninguna de las concentraciones probadas. Estos datos sugieran que WB14_F solo tiene un efecto significativo sobre *P. aeruginosa* drogosenible y multirresistente pero presenta una eficacia limitada, porque este efecto es bacteriostático o inhibidor del metabolismo y no bactericida.

El análisis de los solventes empleados para la resuspensión del péptido reveló que la

actividad del WB14_F está altamente influenciada por las condiciones físico-químicas del medio. El péptido fue evaluado en cuatro formulaciones distintas: (1) agua destilada, (2) ácido acético (AA) al 0.01% con agua destilada, (3) AA al 0.1% en solución salina al 0.85%, y (4) AA al 0.01% en solución salina al 0.85%. La formulación que produjo el efecto antimicrobiano más significativo fue la correspondiente a AA al 0.1% en solución salina sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, donde las concentraciones de 200 y 100 µg/mL redujeron significativamente la viabilidad bacteriana. En cambio, con AA al 0.01% en solución salina, no se detectaron efectos significativos.

Al resuspender WB14_F en agua destilada (un medio con pH neutro), es probable que haya adoptado una conformación desordenada o no estructurada como se describe por Guerra y colaboradores (2024) y esto haya afectado su estabilidad, actividad biológica y capacidad de interactuar con membranas bacterianas. Para conservar su estructura activa se recomienda resuspender este péptido en soluciones con sales o ácidos débiles como el ácido acético a concentraciones de 0.01–0.1%, y de acuerdo con los resultados, el péptido presenta una mejor actividad con una concentración de 0.1%.

En términos de seguridad, el péptido presentó baja actividad hemolítica. A 200 µg/mL, la hemólisis fue de 8.10%, y a 6.25 µg/mL fue de solo 0.40%, lo que indica que WB14_F tiene un perfil aceptable de toxicidad hemática. Palacios y colaboradores (2023) reportaron que WBCATH a una concentración de 10–20 µg/mL produjo una actividad hemolítica baja y que se encontró un mayor porcentaje de hemólisis con un aumento en la concentración del péptido. Sin embargo, WB14_F presentó un porcentaje de hemólisis similar con 200 µg/mL a las hemólisis reportada con 10 µg/mL de WBCATH. Aunque en PBMCs, se observó una toxicidad dosis-dependiente: la viabilidad celular fue desde 25% a 50 µg/mL hasta un 72.22% a 0.391 µg/mL.

A pesar de que los péptidos antimicrobianos pueden tener efectos inmunomoduladores sobre células humanas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que WB14_F no indujo una activación funcional detectable de células inmunes sanguíneas en términos de liberación de factores solubles con actividad antimicrobiana. El plasma derivado del tratamiento con WB14_F no difirió significativamente del control, lo que cuestiona su potencial inmunomodulador bajo las condiciones evaluadas. Esto contrasta con estudios como el de Pane y colaboradores (2016), donde se observaron efectos inmunomoduladores

marcados en células humanas tras la exposición a péptidos catiónicos derivados de proteínas endógenas. La ausencia de efecto en este caso puede atribuirse a una concentración subóptima o la falta de señales coestimuladoras necesarias para una activación funcional. Por tanto, aunque WB14_F posee actividad antimicrobiana directa, su capacidad para modular respuestas inmunes requiere una evaluación más profunda y posiblemente el rediseño experimental para incluir condiciones que simulen mejor un microambiente inflamatorio, por lo que se recomienda evaluar su impacto con análisis complementarios como cuantificación de citocinas o activación fenotípica por citometría de flujo.

9. CONCLUSIONES

- El péptido WB14_F muestra actividad antibacteriana a significativa, contra los aislados P012 y K065, cuando es preparado con ácido acético al 0.01% y la densidad óptica (DO) se usa como medida indirecta del crecimiento bacteriano.
- WB14_F resuspendido en agua destilada no presenta una actividad antibacteriana mejor que la de la gentamicina sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 ni *K. pneumoniae* ATCC 13883.
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue el aislado más susceptible, con reducciones significativas de resazurina a 50 µg/mL de WB14_F resuspendido en agua destilada, y se observó una aparente actividad bactericida.
- *P. aeruginosa* P012 mostró inhibición solo a 50 µg/mL de WB14_F resuspendido en agua destilada, sin diferencias significativas a concentraciones menores.
- *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. pneumoniae* K065 no presentaron diferencias significativas frente al control positivo en ninguna concentración evaluada de WB14_F.
- Una concentración de 25 µg/mL de péptido WB14_F no induce una activación de células inmunes sanguíneas suficiente para generar factores solubles con efecto antimicrobiano. La activación puede existir pero no se refleja en el ensayo realizado o con la concentración de WB14_F empleada.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis complementarios como cuantificación de citocinas o activación fenotípica por citometría de flujo para la evaluar la modulación inmunológica.
- Determinar eficacia terapéutica y seguridad del péptido en un modelo in vivo.
- Sintetizar y evaluar sistemas de liberación como nanopartículas para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad del péptido.
- Determinar si el uso prolongado de WB14_F induce o no el desarrollo de resistencia bacteriana.

11. ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN, USO Y/O ALMACENAMIENTO DE MUESTRA BIOLÓGICA

Título del Proyecto	Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora del péptido WB14-F frente a <i>Bacillus aeruginosa</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Nombre de Programa	Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología
Nombre de Tesista	Ara Cecilia Espinosa Ríos
Teléfono de Contacto	811 215 9716

Por este medio se solicita la autorización para obtener, usar y/o almacenar sus muestras biológicas originales y/o sus remanentes que serán empleadas para el desarrollo de este proyecto de investigación que se llevará a cabo en Laboratorio de Inmunología y Virología, FEB, UANL, en el periodo de agosto 2023 - junio 2025.

Su participación consiste en la donación de una muestra de sangre venosa, que será utilizada exclusivamente para realizar ensayos in vitro de hemólisis y verificación de la seguridad de un péptido antimicrobiano de interés terapéutico.

SI	NO	OPCIÓN
☒	☐	Acepto que se me realice el procedimiento para la obtención de muestras biológicas y su uso en el proyecto.
☒	☐	Acepto que se guarden mis muestras biológicas el tiempo necesario para el desarrollo del proyecto.

He leído y comprendido la información anterior. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Acepto participar de forma voluntaria.

Nombre del participante: David Humberto Suárez Garza

Firma: [Firma] Fecha: 16 de enero de 2025

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad-Restrepo J, Díaz-Díaz A, Osorio-Cadavid N. 2018. Ventriculitis post-quirúrgica por *Pseudomonas aeruginosa* extensamente resistente tratada con colistina intratecal. Comunicación de un caso pediátrico y revisión de la literatura científica. Revista Chilena De Infectología 35(3):321-325.
2. Al Adwani S, Padhi A, Karadottir H, Mörmann C, Gräslund A, Végvári Á, Johansson J, Rising A, Agerberth B, Bergman P. 2021. Citrullination Alters the Antibacterial and Anti-Inflammatory Functions of the Host Defense Peptide Canine Cathelicidin K9_21 *In Vitro*. Journal of immunology 207(3):974–984.
3. Alford MA, Baquir B, Santana FL, Haney EF, Hancock REW. 2020. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance. Frontiers in Microbiology 11.
4. AL-Khikani F. 2023. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: The arms race between bacteria and humans 4(1):94-96.
5. Álvarez Bustamante JA, Sthanlly Tandioy L, Zapata Ocampo PA. 2023. Potencial actividad antimicrobiana del péptido btm-p1 en alimentos. Revista Facultad De Ciencias Básicas 17(2):39-53.
6. Barreras-Serrano A, Tamayo-Sosa AR, del Villar-Pérez VM, Castellanos-Félix AA, Tinoco-Gracia L, Melgarejo T. 2014. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the K9CATH Peptide (38 Amino Acids) Against a Mastitis Isolated Strain of *Staphylococcus aureus* by the Resazurin microtiter Method. International Journal of Animal and Veterinary Advances 6(2):58-60.
7. Camacho-Silvas L, Portillo-Gallo J, Rivera-Cisneros A, Sánchez-González J, Franco-Santillán R, Duque-Rodríguez J, Velo-Méndez G, Ishida-Gutiérrez C. 2021. Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. Cirugía y cirujanos, 89(4):426-434.
8. Cavagnero KJ and Gallo RL. 2022. Essential immune functions of fibroblasts in innate host defense. Front. Immunol 13:1058862.

9. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. 2021. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Front. Microbiol.* 12:750662.
10. Chávez-Jacobo Víctor M. 2020. La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas 23, e20200202.
11. Chávez-Solórzano N, Alcívar-Molina I, Chavarría-González MF, Pinto-Mejía Y, Pinos-Gavilanes M, Miño-León G. 2020. Colistina intraventricular en infección postoperatoria por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: reporte de un caso. *Revista Pediátrica De Panamá* 12-18.
12. Coleman SR, Blimkie T, Falsafi R, Hancock REW. 2020. Multidrug Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 64:10.
13. Cuenca-Riascos EB, Riascos-Jaramillo HD, Tejedor JGO. 2023. Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas de secreciones bronquiales en una unidad de cuidados intensivos. *Kasmera* 51.
14. De la Maza LM, Pezzlo MT, Bittencourt CE, Peterson EM. 2020. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Third Edition. American Society for Microbiology: USA, pp. 147-149.
15. Espinoza Pesantez DI, Esparza Sánchez GF. 2021. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista chilena de infectología* 38(1):69-80.
16. Gaete ME, Valenzuela M, Bachero AW, Vega CC, Marín NV, Labarca J, Cañete PG. 2020. Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos después de una década, desde VIM a KPC. *Revista Chilena De Infectología* 37(4):389-394.
17. Garza-González E, Morfín-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Flores-

- Treviño S, Rodríguez-Noriega E, Ponce-de-León A, Sánchez-Francia D, Franco-Cendejas R, Arroyo-Escalante S, Velázquez-Acosta C, Rojas-Larios F, Quintanilla LJ, Maldonado-Anicacio JY, Martínez-Miranda R, Ostos-Cantú HL, Gómez-Choel A, Jaime-Sánchez JL, Avilés-Benítez LK, Feliciano-Guzmán JM, Peña-López CD, Couoh-May CA, Molina-Jaimes A, Vázquez-Narváez EG, Rincón-Zuno J, Rivera-Garay R, Galindo-Espinoza A, Martínez-Ramírez A, Mora JP, Corte-Rojas RE, López-Ovilla I, Monroy-Colin VA, Barajas-Magallón JM, Morales-De-la-Peña CT, Aguirre-Burciaga E, Coronado-Ramírez M, Rosales-García AA, Ayala-Tarín MD, Sida-Rodríguez S, Pérez-Vega BA, Navarro-Rodríguez A, Juárez-Velázquez GE, Cetina-Umaña CM, Mena-Ramírez JP, Canizales-Oviedo J, Moreno-Angarita-Angarita-Méndez MI, Romero-Romero D, Arévalo-Mejía A, Cobos-Canul DI, Aguilar-Orozco G, Silva-Sánchez J, Camacho-Ortiz A. 2019. A snapshot of antimicrobial resistance in México. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. PLoS One 26, 14(3).
18. Gayathiri E, Bharathi B, Priya K. 2018. STUDY OF THE ENUMERATION OF TWELVE CLINICAL IMPORTANT BACTERIAL POPULATIONS AT 0.5 MCFARLAND STANDARD. International Journal of Creative Research Thoughts 6(2):880-893.
 19. Gondal AJ, Choudhry N, Niaz A, Yasmin N. 2024. Molecular Analysis of Carbapenem and Aminoglycoside Resistance Genes in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: A Challenge for Tertiary Care Hospitals. Antibiotics 13, 191.
 20. Guerra MES, Vieira B, Calazans APCT, Destro GV, Melo K, Rodrigues E, Waz NT, Girardello R, Darrieux M, Converso TR. 2024. Recent advances in the therapeutic potential of cathelicidins. Frontiers in Microbiology 15:1405760.
 21. Guzmán-Beltrán S, Luna-Villagómez HA, Páez-Cisneros CA, Santos-Méndez MA, Reyes-Lazcano, ME. 2023. Importancia de la proteína antimicrobiana bactericida que aumenta la permeabilidad en enfermedades respiratorias. NCT Neumología Y Cirugía De Tórax, 82(1):29-35.
 22. Hameed RK. 2022. The Effect of *Hibiscus sabdariffa* Extracts on *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Wounds and Pus. International Journal for Research in

23. Ho CS, Wong CTH, Aung TT, Lakshminarayanan R, Mehta JS, Rauz S, McNally A, Kintses B, Peacock SJ, de la Fuente-Nunez C, Hancock REW, Ting DSJ. 2025. Antimicrobial resistance: a concise update. *The Lancet. Microbe* 6(1):100947.
24. Huang LC, Petkova TD, Reins RY, Proske RJ, McDermott AM. 2006. Multifunctional roles of human cathelicidin (LL-37) at the ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(6):2369-2380.
25. Huang L, Reins R, Gallo R, McDermott A. 2007. Cathelicidin-deficient (Cnlp ^{-/-}) mice show increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science* 48(10):4498–4508.
26. Idris FN, Nadzir MM. 2023. Multi-drug resistant ESKAPE pathogens and the uses of plants as their antimicrobial agents. *Arch Microbiol* 205(4):115.
27. Jiang L, Greene M, Insua JL, Pessoa JS, Small DM, Smyth P, McCann AP, Cogo F, Bengoechea JA, Taggart CC, Scott CJ. 2018. Clearance of intracellular *Klebsiella pneumoniae* infection using gentamicin-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 279:316–325.
28. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, Ramón-Pardo P, Melano RG. 2019. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica* 43:e65.
29. Joseph B, Mathew M, Rachel R, Mathew J, Radhakrishnan EK. 2024. *Klebsiella pneumoniae* Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function, and Inhibitors. In:) ESKAPE Pathogens, Busi S, Prasad R (eds). Singapore: Springer.
30. Kang D, Revtovich AV, Chen Q, Shah KN, Cannon CL, Kirienko NV. 2019. Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients. *Frontiers in microbiology* 10, 2048.

31. Kumate J, Gutiérrez G, Solórzano F, Miranda M, Muñoz O, Santos J. 2016. Infectología clínica. 18a Edición. Méndez Editores: México, pp. 541-542.
32. LaBauve AE, Wargo MJ. 2012. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. Current protocols in microbiology, Chapter 6, Unit-6E.1.
33. Ledermann W. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: una bella oportunista. Revista chilena de infectología 40(5):546-552.
34. Liang Z, Wang Y, Lai Y, Zhang J, Yin L, Yu X, Zhou Y, Li X, Song Y. 2022. Host defense against the infection of *Klebsiella pneumoniae*: New strategy to kill the bacterium in the era of antibiotics? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12:1050396.
35. Liu S, Huang Z, Kong J, Zhao, Y, Xu M, Zhou B, Zheng X, Ye D, Zhou T, Cao J, Zhou C. 2022. Effects of aerobactin-encoding gene iucB and regulator of mucoid phenotype rmpA on the virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12.
36. López-García B, Lee PHA, Gallo RL. 2006. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(5), 877-882.
37. Lucas-Parrales EN, Solórzano-Vera EY, Samaniego-Solís NI. 2024. Infecciones de vías urinarias causadas por *Klebsiella pneumoniae* y sus mecanismos de resistencia en Latinoamérica. MQRInvestigar 8(1):2142-2161.
38. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268-281.
39. Maheswaranathan M, Ngo T, Rockey DC. 2018. Identification and Management of the

- Hypervirulent Invasive *Klebsiella pneumoniae* Syndrome: A Unique and Distinct Clinical Entity. *Journal of investigative medicine high impact case reports* 6, 2324709618806552.
40. Mangiaterra, G., Cedraro, N., Vaiasicca, S., Citterio, B., Frangipani, E., Biavasco, F., & Vignaroli, C. 2023. Involvement of Acquired Tobramycin Resistance in the Shift to the Viable but Non-Culturable State in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(14):11618.
 41. Matsumoto T, Fujita M, Hirano R, Uchino J, Tajiri Y, Fukuyama S, Morimoto Y, Watanabe K. 2016. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection-induced chronic bronchitis and emphysematous changes in CCSP-deficient mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 11(1):2321-2327.
 42. Matsumoto T y Fujita M. 2018. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection as the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. InTech.
 43. Melgarejo T, Blecha F, Sang Y, Ortega MT. 2007. Antimicrobial cathelicidin peptides. Patente CA2632782A1 (Ejemplo 4).
 44. Miranda MA, Lucas LEN. 2023. Prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasa en pacientes de cuidados intensivos en hospitales de latinoamérica. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS* 5(3):343-357.
 45. Mohan MS, Salim SA, Forgia N, Busi S. 2024. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function and Inhibitors. In: ESKAPE Pathogens, Busi S, Prasad R (eds). Singapore: Springer.
 46. Mookherjee N, Brown KL, Hancock REW. 2013. Cathelicidins. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*, Second Edition, Kastin AJ (eds). USA: Elsevier.
 47. Morales F, Cuesta S, Proaño-Bolaños C, Meneses L. 2021. Modelamiento molecular de la cruzioseptina cc-16 extraída de la rana *cruziophyla calcarifer*. *infoANALÍTICA*, 9(2).
 48. Moreno-Angarita A, Aragón, CC, Tobón GJ. 2020. Cathelicidin LL-37: A new

- important molecule in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Journal of translational autoimmunity* 3, 100029.
49. Mouville C, Benaroudj N. 2020. Survival Tests for *Leptospira* spp. *Methods in molecular biology* 2134:215–228.
 50. Murray P, Rosenthal K y Pfaller M. 2021. *Microbiología Médica*. 9na Edición. Elsevier: España, pp. 357-361.
 51. Muñoz SM, Rodríguez LS. 2016. Las células dendríticas generadas en presencia de vitamina d3 y activadas con lipopolisacáridos incrementan la producción de il-1 β , il-8 e il-10 y disminuyen su capacidad de inducir LT cd4+cd25hiFoxp3+. *Biomédica* 36(2):239.
 52. Mwangi J, Yin Y, Wang G, Yang M, Li Y, Zhang Z, Lai, R. 2019. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(52):26516–26522.
 53. Nour I., Fattouh F, El-Adawi H. 2014. Chemically Defined Medium for Opimization of Proteolitic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* 761N. *International Journal of Life Science and Medical Research* 4(4):46-56.
 54. Ortiz Brizuela E, Ordinola Navarro A y López Luis BA. 2023. ¿Un mundo sin antibióticos? Conoce la resistencia antimicrobiana. *Revista Digital Universitaria* 24(3).
 55. Ortiz, C. 2019. Diseño, síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales* 43(169):614-627.
 56. Palacios JB, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Lara-Espinosa JV, León-Contreras J.C, Lushington GH, Melgarejo T, Hernández-Pando R. 2023. *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico* Assessment of the Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of a Water Buffalo Cathelicidin (WBCATH) in Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Antibiotics* 12, 75.

57. Pada SS, Singh K, Pati S, Singh R, Kant R, Dwivedi GR. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenic Adapter Bacteria. In: Antimicrobial Resistance, Kumar V, Shriram V, Paul A, Thakur M (eds). Singapur: Springer Nature Singapore.
58. Pane K, Sgambati V, Zanfardino A, Smaldone G, Cafaro V, Angrisano T, Pedone E, Di Gaetano S, Capasso D, Haney EF, Izzo V, Varcamonti M, Notomista E, Hancock REW, Di Donato A, Pizzo E. 2016. A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells. *FEBS Journal* 283(11):2115–2131.
59. Pastroián MB. 2018. Estrategias para combatir enfermedades producidas por la emergencia de resistencia a antibióticos. *Divulgatio. Perfiles Académicos De Posgrado* 2(05):17-22.
60. Paterson DL, Kim BN. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Antimicrobial Drug Resistance, Mayers DL (eds). Australia: Humana Press.
61. Patrón-Ordóñez G, Chacón Alania J, Anticona-Sayán MI, Resurrección-Delgado CP, Cucho-Espinoza C. 2023. Otitis externa maligna con diseminación hematogena de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos. *Anales De La Facultad De Medicina* 84(2):196-200.
62. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez S, Vázquez-López R. 2019. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología* 36(2):180-189.
63. Qin S, Xiao W, Zhou C. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 7, 199.
64. Ramírez-Gama RM, Urzúa Hernández M del C, Camacho Cruz A, Tsuzuki Reyes MA, Esquivel-Cote R. 2021. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. 2da Edición. Editorial Trillas: México, pp. 179.

65. Ramos-Cevallos JF, Tomás-Cordero LA, Tomás-Fernández AO, Fiallos-Mayorga TJ. 2022. Infecciones Asociadas Atención en Salud. Dominio De Las Ciencias 8(2): 811–823.
66. Rivera C, Flores L, Pantigoso C, Escobar, E. 2011. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. Revista Peruana De Biología 17(1).
67. Rossi D, Rechenchoski DZ, Vivan ACP, Polano AC, Lopes AM, Biasi RP, Gomes GL, Borsato RM, Carrara-Marroni FE, Pelisson M, Eches MR, Vespero E .2015. Evolução da resistência de *Klebsiella pneumoniae* no hospital universitário de londrina no período de 2000 a 2011. Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde 36(1Supl):267-274.
68. Santacruz Carpio DA, Tenesaca Otavalo PF, Ortiz Tejedor JG. 2023. Infecciones vaginales y mecanismos de resistencia bacteriana en américa latina y el caribe (2013-2023). Anatomía Digital 6(3.2):57-69.
69. Samael Olascoaga-Del AK, Sánchez-Evangelista G, Carmona-Navarrete I, Galicia-Sánchez MDC, Gómez-Luna A, Islas-Arrollo SJ, Castañeda-Sánchez JI. 2018. Gaceta medica de México 154(6), 681–688.
70. Secretaría de Salud. 2023. Boletín de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. Cierre de Información 2023. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/926669/BoletinIAAScierre2023.pdf>
71. Sermkaew N, Santativongchai P, Harnyuttanakorn P. 2024. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Paenibacillus thiaminolyticus* NNS5-6 active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Antibiotics 13(9), 846.
72. Salim SA, Mohan MS, Forgia N, Busi S. 2024. Medical Importance of ESKAPE Pathogens. In: ESKAPE Pathogens, Busi, S and Prasad R (eds). Springer: Singapore, pp. 1-32.

73. Santoro, D. Maddox, CW. 2014. Canine antimicrobial peptides are effective against resistant bacteria and yeasts. *Veterinary Dermatology* 25(1):35–e12.
74. Santos Zonta F, Roque M, Soares da Silva RG, Ritter AG, Jacobsen FT. 2020. Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enfermería Global* 19(59):214-254.
75. Segura Cano S, Brenes Madrigal MY. 2014. Actualidades en terapéutica: nuevos antibacterianos. *Revista Médica De La Universidad De Costa Rica* 8(1):49–69.
76. Sianipar O, Asmara W, Dwiprahasto I, Mulyono B. 2019. Mortality risk of bloodstream infection caused by either *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase: a prospective cohort study. *BMC Research Notes*, 12(1).
77. Stephen F, Altschul TL, Madden AA, Schäffer, JZ, Zheng Z, Webb M, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
78. Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, Andersen PS, Driebe EM, Keim P, Krogfelt, KA. 2015. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio* 6(4).
79. Sudeep N, Nithya MN, Kiranmayee P. 2017. Evaluation of In Vitro Cytotoxic Effects of Three Medicinal Plants on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 9(7):18-26.
80. Tamayo AR, del Villar VM, Barreras A, Hernández R, Olivas JA, Melgarejo T. 2012. Evaluation of the K9CATH peptide in the treatment of experimental pulmonary tuberculosis. *African Journal of Microbiology Research* 3(38):6726-6729.
81. Thaden JT, Pogue JM, Kaye KS. 2017. Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence* 8(4):403–416.
82. Valderrama SL, González PF, Caro MA, Ardila N, Ariza B, Gil F, Álvarez C. 2016.

Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. Biomed 36(Sup1):69-77.

83. Venkateswaran P, Vasudevan S, David H, Shaktivel A, Shanmugam K, Neelakantan P, Solomon AP. 2023. Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 13:1159798.
84. Villalobos AP, Diaz MH, Barrero LI, Rivera SM, Henríquez DE, Villegas MV, Robledo CG, Leal AL. 2011. Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia. *Revista Panamericana De Salud Pública* 30(6):627-633.
85. Strober W. 2019. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology* 111, A3.B.1–A3.B.3.
86. Wieland CW, Lieshout MHPv, Hoogendijk AJ, Poll Tvd. 2010. Host defence during *Klebsiella pneumoniae* relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2. *European Respiratory Journal* 37(4):848-857.
87. Zhang Y, Zhao C, Wang Q, Wang X, Chen H, Li H, Zhang F, Li S, Wang R, Wang H. 2016. High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 60.
88. Zhou J, Zhang L, He Y, Liu K, Zhang F, Zhang H, Lu Y, Yang C, Wang Z, Fareed MS, Liang X, Yan W, Wang K. 2021. An optimized analog of antimicrobial peptide Jelleine-1 shows enhanced antimicrobial activity against multidrug resistant *P. aeruginosa* and negligible toxicity *in vitro* and *in vivo*. *European journal of medicinal chemistry* 219, 113433.