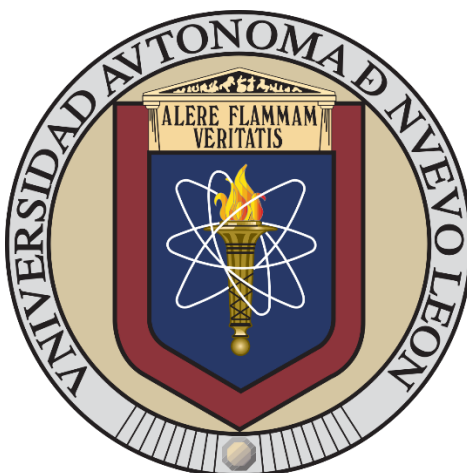


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO HÍBRIDO
LL-37_RENALEXIN RECOMBINANTE CONTRA CEPAS RESISTENTES DE
Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii***

**Por
CLAUDIA ARIEL CÁRDENAS BALDERAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Orientación en Microbiología Aplicada**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO HÍBRIDO
LL-37_RENALEXIN RECOMBINANTE CONTRA CEPAS RESISTENTES DE
Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii***

Revisión de la tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de Tesis

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó
Comité tutorial

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Comité tutorial

Dr. Néstor G. Casillas Vega
Comité tutorial

Dr. Javier Rivera de la Rosa
Subdirector de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO HÍBRIDO
LL-37_RENALEXIN RECOMBINANTE CONTRA CEPAS RESISTENTES DE
Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii***

Aprobación de la tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de Tesis

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó
Comité tutorial

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Comité tutorial

Dr. Néstor G. Casillas Vega
Comité tutorial

Dr. Javier Rivera de la Rosa
Subdirector de Posgrado

DEDICATORIA

A Yahweh, quien sostiene mi vida en sus manos.

A mis padres, Claudia Balderas Renteria y Julio Cárdenas Mendoza, quienes siempre me han acompañado y sé que siempre lo harán creyendo en mí, formando mi carácter para alcanzar mis sueños, enseñándome siempre a vivir la vida con amor.

A mi hermano, Eduardo, por su compañía y apoyo, por ser mi confidente y amigo.

A toda mi familia, quienes, con su cariño, presencia y palabras de aliento han formado parte de mi caminar.

¹⁷ Si no me ayudara Jehová,
Pronto moraría mi alma en el silencio.

¹⁸ Cuando yo decía: Mi pie resbala,
Tu misericordia, oh Jehová, me sustentaba.

Salmos 94:17-18

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que ha sido la mano que me ha sostenido, y como buen padre su bondad siempre ha llegado. Porque mi vida es testimonio de su gracia y fidelidad. Permíteme cantar siempre de tu bondad.

A mi mamá, Claudia, gracias mami porque detrás de cada logro siempre ha estado tu amor, por aplaudirme fuerte y por enseñarme a vivir. Gracias por cada consejo, por tu paciencia, por confiar en mí y recordarme que soy capaz de lograr mis sueños, gracias por estar presente en cada momento de mi vida.

A mi papá, Julio, gracias por enseñarme que el esfuerzo silencioso también construye sueños, y con tu ejemplo que la disciplina y el trabajo siempre abren caminos.

A Eduardo, mi hermano, porque crecer contigo ha sido de las experiencias más valiosas que atesoro en mi corazón.

A mi abue, Lidia, por el amor y el cariño que solo usted me sabe dar, por su ternura y su presencia que me transmite paz.

A mi tío, Isaías, gracias por todo tu apoyo, por amarme, por ser inspiración y mi ejemplo de que se puede vivir con pasión y con generosidad hacia los demás. Por enseñarme que la vida se vive mejor cuando se comparte con amor.

A mis tías, Esther y Dalila, gracias por enseñarme otra manera de ver la vida, gracias por todo su cariño, por cada alegría y por siempre hacerme sentir acompañada.

A mis hermanos, Anakaren, Sebastián y Santiago, gracias por cada momento compartido, por cada risa, y por ser parte de las raíces que hoy me sostienen.

A todos mis amigos y compañeros, gracias por cada risa, cada abrazo y cada momento compartido, gracias por fortalecer mi alma con su amistad. Gracias por enseñarme que los resultados más significativos no siempre son datos experimentales, si no las amistades que se forman a lo largo del camino.

Gracias a SECIHTI, por la beca otorgada durante mis estudios, a la Facultad de Ciencias Químicas y la Universidad Autónoma de Nuevo León por recibirme y permitirme trabajar en sus instalaciones.

A mi comité tutorial, la Dra. Alma, el Dr. Néstor y el Dr. Julio Adrián, gracias cada observación, cada cuestionamiento y por su tiempo que enriqueció este trabajo con su experiencia y conocimiento.

A mi asesor, el Dr. Xristo Zárate, gracias por darme la oportunidad trabajar con usted, por su guía académica y por la confianza depositada en mí durante el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción	1
1.1 Resistencia a antimicrobianos como problema de salud global	1
1.2 Origen y factores asociados al desarrollo de la resistencia bacteriana	2
1.3 Patógenos prioritarios y crisis terapéutica actual	2
1.4 Mecanismos de resistencia bacteriana (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>).....	5
1.5 Péptidos antimicrobianos como alternativa terapéutica	6
1.6 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	7
1.7 Limitaciones de los péptidos antimicrobianos.....	9
1.8 Familias de péptidos antimicrobianos de interés	10
1.9 Producción de péptidos recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	13
1.10 Estrategias para mejorar la expresión y purificación de proteínas	14
CAPÍTULO 2.....	16
2. Antecedentes	16
CAPÍTULO 3.....	25
3. Hipótesis y objetivos.....	25
3.1 Hipótesis	25
3.2 Objetivo general:	25
3.3 Objetivos específicos:.....	25
CAPÍTULO 4.....	26
4. Metodología	26
4.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> SHuffle T7(DE3) con la construcción pET30a-CusF3H+_LL37_Renalexin.	26
4.2 Expresión a pequeña escala del péptido.	27
4.3 Lisis celular.....	28
4.4 Análisis por SDS-PAGE de expresión a pequeña escala.	28
4.5 Expresión a gran escala de proteínas a 1 L de medio de cultivo.	29
4.7 Análisis por SDS-PAGE de expresión a 1 litro.....	31

4.8 Diálisis para la remoción de imidazol y sales.....	31
4.9 Cuantificación por el método de Bradford.	32
4.10 Ensayos antimicrobianos CusF3H+_LL-37_Renalexin: Dilución en microplaca. ..	32
4.11 Ensayos antimicrobianos CusF3H+_LL-37_Renalexin: Recuento en placa.....	33
CAPÍTULO 5.....	35
5. Resultados	35
5.1 Expresión a pequeña escala del péptido y análisis por SDS-PAGE.....	35
5.1 Expresión a gran escala de proteínas a 1 L de medio de cultivo y purificación por IMAC.....	36
5.2 Análisis de purificación IMAC por SDS-PAGE	38
5.3 Diálisis para la remoción de imidazol y sales, y cuantificación mediante el método de Bradford.....	40
5.4 Ensayos antimicrobianos de CusF3H+_LL-37_Renalexin: Dilución en microplaca. 42	
5.5 Ensayos antimicrobianos de CusF3H+_LL-37_Renalexin: Recuento en placa.	44
CAPÍTULO 6.....	47
6. Discusión.....	47
CAPÍTULO 7.....	63
7. Conclusiones	63
CAPÍTULO 8.....	64
8. Perspectivas a futuro	64
CAPÍTULO 9.....	65
9. Disposición de residuos generados	65
CAPÍTULO 10.....	66
10. Referencias.....	66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Datos de la curva de calibración estándar de BSA.	41
Tabla 2. Actividad antimicrobiana del péptido híbrido CusF3H+_LL-37_Renalexin.	45
Tabla 3. Tabla de disposición de los residuos generados en el laboratorio.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Representación del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.	9
Figura 2. Estructura tridimensional de LL-37, con una disposición α -helicoidal anfipática.	12
Figura 3. Secuencia de aminoácidos del casete de expresión que codifica los péptidos de fusión recombinantes.	23
Figura 4. Diseño del péptido antimicrobiano híbrido LL-37_Renalexin.	24
Figura 5. Vector pET-30a+ utilizado para la transformación.	27
Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de la expresión del péptido CusF3H ⁺ -LL-37-Renalexin en <i>E. coli</i> SHuffle T7(DE3) (17kDa).	36
Figura 7. Cromatograma de la purificación por IMAC de CusF3H ⁺ _LL-37_Renalexin (17 kDa) expresado en <i>E. coli</i> SHuffle T7(DE3).	37
Figura 8. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación por IMAC de CusF3H ⁺ _LL-37_Renalexin (17 kDa) expresado en <i>E. coli</i> SHuffle T7(DE3).	39
Figura 9. Curva de calibración estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Lecturas a 595 nm.	41
Figura 10. Actividad antimicrobiana de CusF3H ⁺ _LL-37_Renalexin contra <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos.	43
Figura 11. Actividad antimicrobiana de CusF3H ⁺ _LL-37_Renalexin contra <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenémicos.	44
Figura 12. Actividad antimicrobiana (%) del péptido híbrido CusF3H ⁺ -LL37_Renalexin frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes determinada mediante el método de recuento en placa.	46

NOMENCLATURA

RAM	Resistencia bacteriana
OMS	Organización Mundial de la Salud
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos
CRPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos
XDRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> ampliamente resistente a antibióticos
AMP	Péptido antimicrobiano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
hCAP-18	Catelicidina humana
LL-37	Péptido antimicrobiano
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
MBP	Proteína de unión a maltosa
TrxA	Trioxidorreductasa
C°	Centígrados
mg/L	Miligramos por litro
mM	Milimolar
mg	Miligramos
g/L	Gramos por litro
Ni	Níquel
%	Porcentaje
CMI	Concentración mínima Inhibitoria
MIC ₅₀	Concentración mínima que inhibe al 50% de la población
MDR-PA	<i>P. aeruginosa</i> multirresistente
μ g/mL	Microgramo por mililitro
SmbP	Pequeña proteína de unión a metales
μ M	Micromolar
GS	Linker de glicina y serina
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
h	Horas
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
M	Molar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
g	Gramo
L	Litro
Kan	Kanamicina
mL/min	Mililitros por minuto
MPa	Megapascal
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

BSA	Albumina sérica bovina
nm	Nanómetros
TBS	Medio Soja Trypticase
MH	Medio Mueller-Hinton
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacáridos
His-tag	Etiqueta de histidina
CusCBFA	Sistema de eflujo de cobre y plata en bacterias Gram negativas perteneciente a la familia RND
CusF	Proteína periplásmica de unión a cobre del sistema de resistencia al cobre
<i>CusCFBA</i>	
GFP	Proteína verde fluorescente
T7	Promotor T7 del bacteriófago T7
log UFC/mL	Logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por mililitro
TAE	Tris-acetato-EDTA
TGS	Tris-glicina-SDS
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
blaOXA-23	Gen que codifica la β -lactamasa OXA-23 asociada a resistencia a carbapenémicos.
blaOXA-66	Gen que codifica la β -lactamasa OXA-66, variante de oxacilinas relacionada con resistencia a β -lactámicos.
<i>pmrB</i>	Gen que codifica la proteína reguladora PmrB del sistema de dos componentes
PmrA/PmrB	
<i>lasI</i>	Gen que codifica una sintasa de autoinductores
Mex-A	Componente periplásmico del sistema de eflujo MexAB-OprM en bacterias Gram negativas.
MexB	Proteína transportadora de membrana interna del sistema de eflujo MexAB-OprM.
OprM	Proteína de membrana externa que forma parte del sistema de eflujo MexAB-OprM.
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido
OprD	Porina de membrana externa asociada a la entrada de carbapenémicos
OXA-23	β -lactamasa tipo oxacilinas con actividad carbapenemasa
OXA-24	β -lactamasa tipo oxacilinas con actividad carbapenemasa
OXA-58	β -lactamasa tipo oxacilinas con actividad carbapenemasa

RESUMEN

Claudia Ariel Cárdenas Balderas

Fecha de graduación: Julio 2026

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas**

Título de la tesis: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO HÍBRIDO LL-37_RENALEXIN RECOMBINANTE CONTRA CEPAS RESISTENTES DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*

Número de páginas: 79

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: Expresar, purificar y evaluar la actividad antimicrobiana del péptido híbrido LL-37_Renalexin utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión y CusF3H⁺ como etiqueta de afinidad, con el objetivo de analizar su efecto sobre bacterias patógenas resistentes a carbapenémicos asociadas a infecciones hospitalarias. La metodología consiste en la transformación de *E. coli* con un plásmido recombinante que contiene al híbrido, seguida de la inducción de la expresión con IPTG. Purificar el péptido mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos y diálisis para eliminar el imidazol de las fracciones de elución. Evaluar la actividad antimicrobiana mediante el ensayo de dilución en microplaca (CIM) y el recuento en placa para determinar su impacto en la viabilidad de células bacterianas. Los datos recolectados se analizaron estadísticamente mediante la prueba *t* de Student.

Contribuciones y conclusiones

- Se logró la producción recombinante del péptido híbrido CusF3H⁺_LL-37_Renalexin en *E. coli*.
- Se estableció un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC).
- Se implementó un proceso de diálisis para eliminar el imidazol y permitir los ensayos de evaluación antimicrobiana.
- Se proporcionaron datos cuantitativos sobre la actividad antimicrobiana del péptido frente a bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos mediante el método de dilución en microplaca y el recuento en placa.
- El péptido mostró actividad inhibitoria frente a ambas cepas resistentes.
- A la concentración evaluada (21 μ M) se observó una reducción mayor al 45% de la viabilidad celular en el recuento en placa, en comparación con el control de crecimiento.

FIRMA DEL ASESOR: _____
Dr. Xristo Zárate Kalfópulos.

CAPÍTULO 1

1. Introducción

1.1 Resistencia a antimicrobianos como problema de salud global

La resistencia bacteriana (RAM) representa uno de los mayores retos que el ser humano ha tenido que enfrentar a lo largo de los años, y afecta en mayor medida a la práctica clínica. Es un problema que se vuelve más común día con día en centros de salud y hospitales, lo que lleva a la complicación e incluso al fracaso de los tratamientos debido al desarrollo de infecciones o cuadros sépticos que ya no pueden ser tratados con antibióticos (Lirola-Andreu *et al.*, 2022). Incluso, Alexander Fleming advirtió sobre este fenómeno cuando recibió el Premio Nobel por el descubrimiento de la penicilina; él expresó en su discurso: “Existe el peligro de que un hombre ignorante pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de antibiótico y, al exponer a los microbios a una dosis no letal del medicamento, los haga resistentes” (Villalobo Polo, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la resistencia microbiana como el cambio fisiológico, intrínseco o adquirido, que surge en los microorganismos como un proceso evolutivo, y es ese cambio lo que provoca el cese de la respuesta de dichos microorganismos a medicamentos (como los antibióticos) que previamente ya mostraban un efecto terapéutico; lo que finalmente hace más difícil poder manejar un tratamiento más eficaz que alcance la recuperación del paciente, y a su vez incrementa el riesgo de propagación de infecciones, mutaciones y de muerte, siendo esto una grave amenaza a la salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2021).

1.2 Origen y factores asociados al desarrollo de la resistencia bacteriana

Uno de los principales factores causantes de la aparición de bacterias patógenas farmacorresistentes es el uso indiscriminado de antibióticos que la población humana erróneamente ha manejado por muchos años; aunque es importante mencionar que la resistencia bacteriana es un fenómeno que incluso puede aparecer de forma natural con el paso del tiempo, esto debido principalmente a las modificaciones genéticas que puede sufrir un microorganismo, es decir, un cambio adquirido, o uno propio de la especie cuando es un cambio intrínseco (Organización Mundial de la Salud, 2021).

1.3 Patógenos prioritarios y crisis terapéutica actual

Debido a que la resistencia bacteriana se ha convertido en un problema de suma importancia, la OMS en el año 2017 publicó la primera lista de bacterias para las que son necesarios de manera urgente nuevos antibióticos debido a la creciente aparición de cepas resistentes (Organización Mundial de la Salud, 2017), la cual fue actualizada en mayo del 2024, en la que aparecen 15 familias de bacterias resistentes. Entre los patógenos de prioridad crítica publicados en dicha lista se encuentran *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB), que ocupa el puesto número 1, seguido de Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de tercera generación y de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina, y de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (CRPA), clasificado como prioridad alta (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Modelos estadísticos han estimado que en el año 2019 aproximadamente 4.95 millones de muertes estuvieron relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos, de las cuales 1.7 millones fueron directamente atribuibles a esta causa. Los estudios estimaron que la tasa de

mortalidad por resistencia a los antimicrobianos, considerando todas las edades, es mayor en África subsahariana occidental, donde se registran 27.3 muertes por cada 100,000 habitantes, mientras que la tasa más baja se observa en Australasia, con 6.5 muertes por cada 100,000 habitantes.

Los seis principales patógenos asociados con la resistencia a fármacos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*) en 2019 fueron responsables de 92.900 muertes atribuibles a la resistencia y de 3,57 millones de muertes asociadas (Murray *et al.*, 2022).

Factores como el uso excesivo de antibióticos en el auge de producción y venta de estos, selección natural o mecanismos de resistencia desarrollados por los microorganismos y otros factores ambientales y sociales se han presentado como iniciadores de esta problemática. La desinformación sobre el uso adecuado de estos fármacos, la automedicación, así como la mala praxis de la prescripción excesiva y la dispensación de antibióticos sin receta, participan de forma directa en el desarrollo de bacterias resistentes, aunque no necesariamente con una relación lineal, ya que cada factor participa activamente en la aparición de bacterias resistentes. Aunado a la problemática, utilizar antibióticos de amplio espectro puede también suprimir la microbiota del cuerpo humano, favoreciendo la aparición de la RAM, debido a que la eliminación de las bacterias que representan un beneficio al ser humano crea un ambiente favorable para el desarrollo de bacterias resistentes ya que no estarían compitiendo por nutrientes, y eso les proporciona la oportunidad de propagarse y desarrollarse (Ahmed *et al.*, 2024) (Endale *et al.*, 2023).

Existen diversos factores ambientales que también participan de forma activa, principalmente la falta de higiene y saneamiento, y actúan como mediadores para la propagación de cepas que

ya presentan genes de resistencia. La relevancia clínica de este proyecto tiene bases en la creciente demanda de los hospitales como principales reservorios de cepas resistentes, esto por la alta demanda de fármacos, específicamente de antibióticos para llevar a cabo sus actividades, la cercanía que existe entre pacientes y algunos otros factores sociales como la liberación incorrecta de efluentes de estas instituciones, indirectamente crea la oportunidad perfecta para la propagación de más cepas resistentes (Endale *et al.*, 2023).

La RAM aumenta la necesidad de utilizar fármacos de segunda y tercera línea para tratar enfermedades que un tiempo atrás podían ser erradicadas con más facilidad, esto representa el uso de opciones menos estudiadas, con mayor costo de aplicación y con más riesgos de efectos adversos, por ende, agotan de forma directa recursos hospitalarios debido a la necesidad de recurrir a un tratamiento menos efectivo y al mismo tiempo más largo (Ahmed *et al.*, 2024).

Los primeros casos asociados a la RAM se suscitaron poco después del descubrimiento de la penicilina en el siglo XX; en el año 1942 se reportaron los primeros casos de *S. aureus* resistente a la penicilina y, más tarde, en 1953, a la tetraciclina. En 1961 se reportó el primer caso de resistencia a la meticilina (MRSA); posteriormente, en los años 80, la humanidad vivió la pandemia por tuberculosis y en los 90 se observó resistencia en microorganismos como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Ahmed *et al.*, 2024); todos estos eventos solo evidencian la creciente demanda de nuevos tratamientos debido a la escasez de aquellos que ya erradicaban enfermedades de forma efectiva.

Actualmente, el área clínica padece esta problemática de forma sostenida, frecuentemente se aíslan bacterias resistentes en instalaciones de atención terciaria, incluyendo también unidades de cuidados intensivos. La neumonía causada por Gram negativos está directamente asociada con altas tasas de mortalidad y morbilidad, especialmente en pacientes ubicados en cuidados

intensivos, y de igual manera se asocia con infecciones graves relacionadas con la hospitalización, particularmente Gram negativos como *Acinetobacter* sp., *P. aeruginosa* o *Klebsiella* sp. (Garvey, 2023). La colistina representa a uno de los antibióticos de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes, particularmente aquellas resistentes a carbapenémicos, debido a que interactúa con los lipopolisacáridos de la membrana externa y altera su integridad celular. No obstante, el incremento global de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), así como de cepas resistentes a carbapenémicos, ha favorecido un mayor uso clínico de este antimicrobiano, lo que a su vez ha impulsado la emergencia de mecanismos de resistencia a colistina. Esta situación representa una amenaza terapéutica importante, ya que limita aún más las opciones disponibles frente a patógenos críticos (Abavisani *et al.*, 2023; Mondal *et al.*, 2024).

1.4 Mecanismos de resistencia bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*)

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa, aislada por primera vez en 1882, es conocida por su importancia intrahospitalaria debido a su capacidad de causar infecciones nosocomiales. *P. aeruginosa* es capaz de poseer bombas de eflujo, que le permiten adquirir la capacidad de exportar antibióticos y así presentar mayor posibilidad de sobrevivir bajo una elección inadecuada de antibiótico, en otras palabras, las bombas de eflujo le permiten presentar resistencia intrínseca. Esto lo hacen bombeando sustratos, incluyendo algunos antibióticos y otro tipo de moléculas tóxicas con la capacidad de atravesar la membrana bacteriana; al expulsar a estos sustratos, disminuye la concentración intracelular, lo que imposibilita que puedan llegar a sus sitios de unión. La baja permeabilidad de la membrana de *P. aeruginosa* también contribuye al desarrollo de RAM, ya que las bacterias Gram negativas poseen una

membrana celular más grande, eso le impide al antibiótico penetrar la membrana para actuar sobre el objetivo (Hu & Chua, 2025).

Por su parte, *A. baumannii* comparte características con *P. aeruginosa*, también es Gram negativo y representa uno de los patógenos mayormente asociados a infecciones hospitalarias, gracias a la capacidad que posee de sobrevivir a ambientes hostiles. Incluso la OMS lo clasifica como una prioridad crítica en la lista de patógenos farmacorresistentes más peligrosos para la salud humana (Organización Mundial de la Salud, 2021). *A. baumannii* ya se clasifica como ampliamente resistente a antibióticos (XDR-AB), identificando la presencia de genes blaOXA-23 y blaOXA-66, quienes representan un determinante en la resistencia a carbapenémicos (Shi *et al.*, 2025) Los genes *pmrB* y *lasI* participan también de forma activa en la aparición de resistencia; *pmrB* participa mediando modificaciones en la membrana celular que le conferirá la resistencia, mientras que *lasI* participa en la formación de biopelículas (Hosseini *et al.*, 2025).

1.5 Péptidos antimicrobianos como alternativa terapéutica

En los últimos años, los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés, *Antimicrobial Peptides*) surgieron como una prometedora alternativa a los tratamientos convencionales con antibióticos o terapias combinadas debido a la capacidad de evasión de mecanismos de resistencia que poseen y a su baja probabilidad de desarrollar mecanismos de resistencia bacteriana.

Los AMP son moléculas muy pequeñas; contienen entre 12 y 100 aminoácidos y participan mediando la respuesta primaria hacia diversos patógenos, como bacterias, virus, parásitos o infecciones fúngicas. Básicamente, forman parte de la respuesta de defensa de algunos organismos y especies, dañando la membrana celular del patógeno, alterando el metabolismo o interrumpiendo las funciones del ADN y de las proteínas (Olascoaga Del Ángel *et al.*, 2018).

Los péptidos antimicrobianos se han convertido en prometedoras alternativas debido a sus atractivas propiedades terapéuticas. Los AMP son muy diversos; a lo largo de los últimos años, los estudios y publicaciones de estos han ido incrementándose, teniendo así numerosas formas de clasificación, desde su organismo productor hasta su mecanismo de acción (González García *et al.*, 2017).

Desde el año 1885, fluidos humanos eran conocidos por sus propiedades antimicrobianas, fue hasta el año 1981 cuando Hans Boman, microbiólogo danés, quien, además de desarrollar la técnica de clasificación bacteriana por el Gram, reportó que la hemolinfa de *Hyalophora cecropia* (polilla de seda) contenía un péptido que hoy conocemos como cecropina (Kumar *et al.*, 2018)

1.6 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

El mecanismo de acción principal de un péptido se basa en su interacción con la membrana microbiana. Esta interacción está mediada por su carga positiva y la atracción electrostática hacia las paredes celulares polianiónicas, ya sean ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas, o por los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas; los AMP provocan inestabilidad en la membrana y esto les permite atravesar la bicapa externa. Esta interacción produce un daño estructural en la membrana y provoca inestabilidad y un aumento de su permeabilidad; de esta manera, el AMP puede inducir la formación de poros, el daño interno o incluso su translocación al interior (Yang *et al.*, 2024).

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad ya se han descrito diversos mecanismos de acción, una vez que el péptido interactuó con la membrana y alcanzó un nivel crítico, los AMP se orientan de forma perpendicular con sus cadenas laterales hidrofóbicas de frente al centro

hidrofóbico de la membrana junto a sus cadenas polares, todo esto para crear un polo hidrofílico, el cual genera una pérdida de equilibrio osmótico y de potencial de membrana (Téllez, G., Castaño, J. 2010).

Un tercer mecanismo se basa en la unión del AMP a la membrana hasta alcanzar una concentración límite que permite a los péptidos doblarse, formando una especie de canal marcado por la parte superior de los grupos lipídicos asociados a los AMP, a diferencia del mecanismo anterior, que forma un canal mixto; la magainina y la mellitina son péptidos de ejemplo de este mecanismo (Téllez, G., Castaño, J. 2010).

En el mecanismo “de alfombra”, los péptidos permanecen en la capa exterior y, al alcanzar un punto crítico, forman una especie de alfombra que puede debilitar la membrana y, además, provocar un colapso en una configuración de micelio, y eventualmente se produce la muerte celular por la pérdida de citoplasma. Este tipo de mecanismos se ha encontrado en péptidos como latarcín Ltc2a, derivado del veneno de la araña *Lachesana tarabaevi* (Téllez, G., Castaño, J. 2010).

El último mecanismo asemeja la acción de un detergente, el péptido se adhiere a la membrana hasta alcanzar una concentración suficiente y cambia de orientación, esto facilita la formación de estructuras parecidas a micelios formando un complejo péptido-lipídico por el que se liberan iones y causan muerte celular o pérdida de citoplasma, o bien, pueden desintegrarse lo que resulta en una translocación del péptido hacia el citoplasma en donde le permite afectar otros blancos de manera interna (Téllez, G., Castaño, J. 2010).

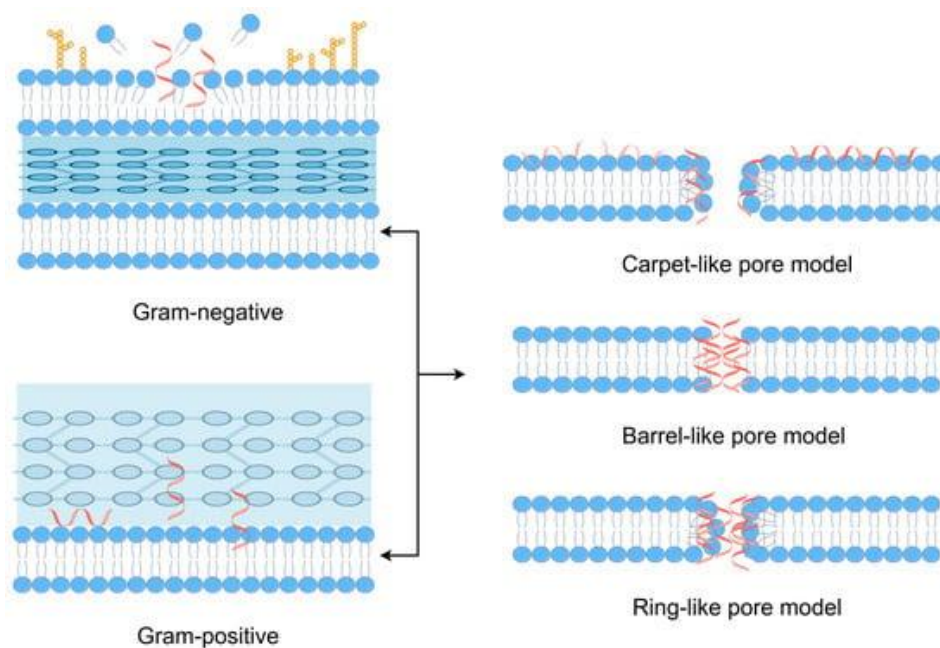


Figura 1. Representación del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las Gram negativas interactúan con los lipopolisacáridos de la membrana, mientras que las Gram positivas se unen principalmente a ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Una vez unidos a la membrana, los AMP pueden inducir diferentes mecanismos de acción, incluidos los modelos tipo “carpet”, tipo “barril” y toroidal, lo que conduce a la desestabilización de la bicapa lipídica e inevitablemente a la muerte celular. *Nota.* Adaptado de (Yang *et al.*, 2024).

1.7 Limitaciones de los péptidos antimicrobianos

Uno de los mayores retos de los péptidos antimicrobianos es su biocompatibilidad. Tienen mayor afinidad por células procariotas que por eucariotas; esto se debe a la presencia de una membrana celular, ya sea por ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o por lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas. Los péptidos se han vendido como una prometedora alternativa a tratamientos convencionales, sin embargo, es importante conocer cuáles pueden ser las limitaciones de estos. Otro obstáculo para el uso de un AMP es la inmunogenicidad; esto quiere decir que algunos AMP pueden causar reacciones alérgicas, debido a la desgranulación de mastocitos y la liberación de histamina, provocando, además de

inflamación, algunos otros síntomas de alergias (Guryanova & Ovchinnikova, 2022). Un último aspecto que habría que considerar en el uso de péptidos es la toxicidad y citotoxicidad; existen estudios que reportan que el uso de AMP en dosis altas inducen toxicidad en células eucariotas, o incluso que lo que en ocasiones puede considerarse como ventaja, que es la afinidad del péptido por la membrana celular procariota puede interferir con los fosfolípidos neutros y el colesterol presente en membranas de células eucariotas lo que provocaría hemólisis no deseada o citotoxicidad (Chen & Jiang, 2023).

1.8 Familias de péptidos antimicrobianos de interés

Los péptidos son clasificados por sus diferentes características, por su origen, estructura o si son ricos en aminoácidos. Entre las principales familias de péptidos pertenecientes al sistema inmune innato se encuentran las catelicidinas y las defensinas. Hoy en día, solo se ha identificado una catelicidina de origen humano, LL-37. Dado que las catelicidinas pertenecen al sistema inmune innato, están presentes en los neutrófilos. Esta familia de proteínas se encuentra inactivada dentro de la célula y se activa solo cuando es necesario.

Como fue mencionado anteriormente, los humanos solo tienen una catelicidina, la hCAP-18, descubierta en 1995; existen estudios que muestran que se almacena en gránulos de neutrófilos, y hablando estructuralmente se caracteriza por tener dos partes, un dominio protector en el extremo terminal N y uno antimicrobiano en el extremo C. El nombre “LL-37” se adoptó después de que el estudio de Gudmundsson en 1996 reportara su secuencia de 37 aminoácidos que comprendía su dominio antimicrobiano y el inicio de la secuencia con dos residuos de leucina, que denominaron LL, más los 37 aminoácidos, y fue como así se le denominó LL-37 (Gudmundsson *et al.*, 1996). En el año 2000 se reportó que células implicadas en la inmunidad

innata (células B, T, Natural Killer) activan el gen que codifica LL-37, mientras que células implicadas en la inmunidad adaptativa no lo inducen (células T $\alpha\beta$) (Agerberth *et al.*, 2000).

LL-37 posee carga en 16 de los 37 aminoácidos, eso le proporciona una carga neta positiva de +6. Dicha característica es la que le permite interactuar con las membranas celulares bacterianas, las cuales están cargadas negativamente (figura 2). Dos aspectos fundamentales que dependen de las condiciones del entorno, el pH del medio, la fuerza iónica, la presencia o ausencia de detergentes, etc., son su conformación secundaria y el grado de oligomerización; cualquier factor mencionado anteriormente impacta de forma directa en su dominio antimicrobiano. Estando en una solución acuosa, LL-37 se encuentra como una molécula monomérica con estructura definida escasa, sin embargo, cuando cambian dichas condiciones, es decir, se aumentan las concentraciones de sales, detergentes o del péptido mismo, por ejemplo, LL-37 sufre una transición hacia su estructura α -helicoidal.

Aunado a esto, también presenta versatilidad estructural, lo que quiere decir, que en ambientes similares a los de la membrana se puede reorganizar en dímeros helicoidales antiparalelos, tetrameros y complejos oligoméricos de mayor tamaño. Cuando esto sucede, las regiones hidrofóbicas y agrupamientos de residuos aromáticos sirven como un punto de anclaje para moléculas lipídicas, y así facilitan la formación de complejos péptido-lípido y ensamblajes supramoleculares, los cuales pueden corresponder al estado funcional activo que está asociado con la membrana (Voronko *et al.*, 2025).

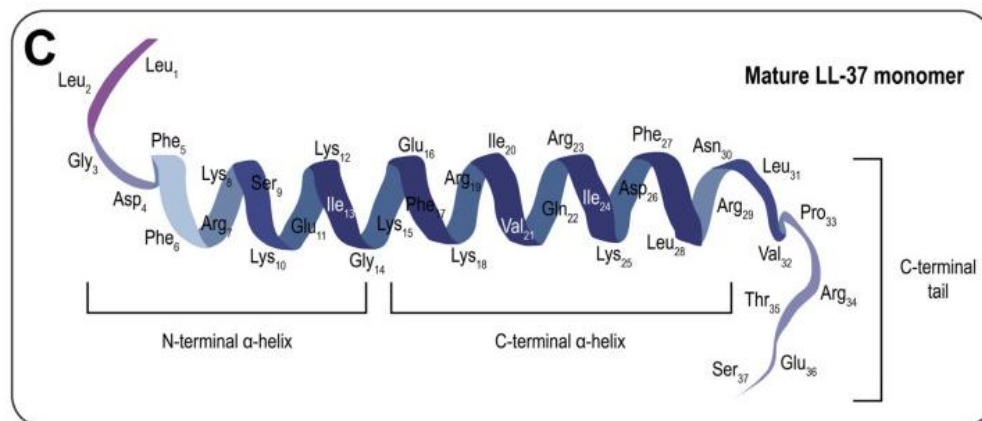


Figura 2. Estructura tridimensional de LL-37, con una disposición α -helicoidal anfipática. Se indican los extremos N-terminal y C-terminal, así como las regiones de α -hélice N-terminal y C-terminal. La numeración y disposición de los residuos aminoacídicos clave (Leu₁, Leu₂, Phe₅, Gly₃, Asp₄, Phe₆, Arg₇, Ser₉, Lys₁₀, Lys₁₂, Glu₁₄, Ile₁₅, Ala₁₆, Pro₁₇, Lys₁₈, Val₂₁, Asn₃₀, Val₃₂, Pro₃₃, Thr₃₅, Ser₃₇) ilustra la organización lineal de la cadena polipeptídica, incluyendo residuos de la cola C-terminal. Esta disposición refleja la estructura secundaria de tipo helicoidal característica del péptido antimicrobiano LL-37 en su forma activa, la cual es relevante para su función en la inmunidad innata y su interacción con membranas biológicas. *Nota.* Adaptado de (Voronko *et al.*, 2025).

La segunda familia de péptidos son las defensinas, específicamente las β -defensinas; esta familia se obtiene a partir de la secuencia de defensinas humanas, con modificaciones sintéticas con la finalidad de mejorar su actividad antimicrobiana. Renalexin, un péptido perteneciente a la familia de las defensinas fue aislado de la piel de la rana toro (*Rana catesbeiana*) y contiene 20 aminoácidos, dos de ellos con residuos ricos en cisteína en las posiciones 14 y 20, unidos por un puente disulfuro. De acuerdo con los estudios reportados, las defensinas se pueden dividir en dos clases, péptidos lineales (maiganinas y cecropinas) y péptidos cíclicos con uno a tres enlaces disulfuro (defensinas de mamíferos). La mayoría posee la capacidad de ser altamente básica y de formar estructuras anfipáticas. Se han reportado similitudes estructurales de renalexin con otros péptidos como la polimixina A, específicamente en un macrociclo heptapeptídico, en el caso de renalexin debido a su enlace disulfuro, y para la polimixina A por un enlace amida (Vignal *et al.*, 1998)

1.9 Producción de péptidos recombinantes en *Escherichia coli*

Podría obviarse la clara necesidad de mecanismos que sean capaces de producir proteínas recombinantes y, de esta forma, emplear sus llamativos usos. Los organismos vivos son una excelente opción como sistema de expresión. Hoy en día, el número de opciones ha aumentado; sin embargo, *E. coli* sigue siendo la primera opción gracias a su uso relativamente sencillo y de bajo costo. Pero, aunque *E. coli* tiene múltiples ventajas, como su fácil crecimiento o la facilidad de modificar genes, no significa que esté exento de limitaciones.

Diversos estudios han evaluado la capacidad de este microorganismo para expresar genes heterólogos mediante el uso de vectores de expresión, los cuales contienen promotores regulables que controlan la transcripción del gen de interés y facilitan su clonación para la producción recombinante en la célula hospedera (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023).

Uno de los mecanismos más utilizados para llevar a cabo la expresión de proteínas es la transformación genética y vectores de expresión; a menudo se utilizan plásmidos como vectores que se insertan en las células de *E. coli* por medio de la transformación. Existen diversos métodos de transformación, desde métodos más sencillos y económicos, como un choque térmico, hasta métodos más sofisticados que requieren de equipo especial, como la electroporación. El fundamento de cualquier método es el mismo: lograr que el plásmido, que contiene el gen de interés, logre entrar al interior de las células bacterianas a través de una alteración en las mismas. Los plásmidos poseen características que los hacen útiles en el proceso, poseen un origen de replicación, esto quiere decir que esta parte de la secuencia nucleotídica es capaz de replicarse de forma independiente al DNA de la célula huésped, de igual manera contienen un marcador, por lo general se trata de un gen de resistencia a antibióticos, el cual es útil para seleccionar colonias específicas que, si hayan absorbido al plásmido y por supuesto, el gen de interés. Aunado a estas características, los plásmidos

también contienen un promotor y un sitio de unión al ribosoma, que auxilia en el inicio de la traducción (Mohite *et al.*, 2026).

Siguiendo con lo anterior, seleccionar un promotor adecuado para iniciar la transcripción es uno de los pasos más importantes; cada uno puede tener usos y beneficios específicos, y esa decisión se tomará cuidadosamente, ya que puede activarse bajo condiciones específicas, lo que permite que el gen de interés se exprese de manera controlada. Uno de los promotores más utilizados en la investigación es el promotor *Lac*, y se activa mediante la adición de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Utilizar este promotor permitiría evitar una sobreexpresión génica, sin embargo, es normal encontrar ciertas limitaciones, como es el caso con IPTG, ya que cuando es necesaria una producción grande de proteínas puede ejercer presión metabólica sobre las células y finalmente reducir la producción y eficiencia del método (Mohite *et al.*, 2026).

Como fue mencionado anteriormente, es común que el gen de interés pueda ser modificado o se le puedan añadir elementos adicionales, como lo son las etiquetas de afinidad, útiles para resolver limitaciones con los sistemas de expresión de proteínas recombinantes; específicamente, en *E. coli* existen estudios sobre la facilidad que tiene para formar cuerpos de inclusión. Por esta razón se utilizan etiquetas de afinidad, ya que pueden aumentar la solubilidad y la capacidad de plegamiento de la proteína de interés. Las etiquetas de fusión funcionan al unirse al extremo C- o al extremo N-terminal.

1.10 Estrategias para mejorar la expresión y purificación de proteínas

Las etiquetas de afinidad resultan especialmente útiles en pasos posteriores a la producción, como lo es la purificación; dependiendo de las características de estas, podrán tener la capacidad de unirse a un ligando específico. En una purificación con cromatografía de afinidad,

resultará útil si la etiqueta posee afinidad por el material de la columna; de esta forma, el constructo completo se unirá de forma más eficiente y se podría obtener un mayor grado de pureza proteica.

Hoy en día se ha diseñado e implementado el uso de diversas etiquetas, incluyendo la proteína de unión a maltosa (MBP), tiorredoxina (Trx), o la His-tag, caracterizada por tener 6 residuos de histidina insertados en el extremo N o C de la proteína; esta etiqueta se une de forma específica a iones metálicos utilizados en las resinas de columnas cromatográficas.

CusF es una proteína de fusión utilizada en la producción de proteínas recombinantes utilizando sistemas de expresión como *E. coli*, Tiene un peso pequeño, de 10 kDa, y forma parte del complejo de expulsión CusCBFA de *E. coli*. CusF3H⁺ es una variante de CusF en la que se agregaron 3 residuos de histidina en el extremo N-terminal, que le confieren mayor afinidad por iones Ni(II) (Vargas-Cortez *et al.*, 2017).

CAPÍTULO 2

2. Antecedentes

El uso de *E. coli* como sistema de expresión ha sido ampliamente utilizado en estudios de producción de proteínas recombinantes, como enzimas, anticuerpos u hormonas, gracias a las evidentes ventajas que presenta, desde su tiempo relativamente bajo de crecimiento hasta su costo bajo de producción. Hartwell *et al* reportaron rendimientos mayores de GFP en *E. coli* de 420 ± 35 mg/L bajo condiciones óptimas de 25°C y utilizando una concentración de 0.5 mM de IPTG, comprándolo con *P. pastoris*, cuyo rendimiento reportado fue de 180 ± 22 mg/L (Hartwell *et al.*, 2024). Agrawal *et al* en 2024 investigo la expresión de la proteína SpCas9-His, utilizada en el sistema CRISPR-Cas9 para edición genómica en diversas cepas de *E. coli* (Rosetta2, BL21(DE3), BL21(DE3)-pLysS y BL21(DE3)-Star) y reportaron una producción de entre 35 y 40 mg de proteína pura y activa (Agrawal *et al.*, 2024). Trabajos de Travé-Asensio *et al* reportan también rendimientos mayores de producción de péptidos de defensa del huésped (HDP) en *E. coli* que en comparación con *L. lactis* y *L. plantarum*, obteniendo para LL-37_GFP un rendimiento de 17.54 mg/L en *E. coli*, mientras que en *L. lactis* se obtuvo uno de 3.74 mg/L, lo que señala una evidente ventaja de producción y purificación (Travé-Asensio *et al.*, 2025). Finalmente, esto sigue presentando a *E. coli* como una opción óptima y estable como sistema de expresión.

Integrar etiquetas en el casete de expresión permite mitigar algunas limitaciones de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Gibisch *et al.* establecieron un sistema de expresión óptimo específico para péptidos ligados a disulfuros en *E. coli*, expresando hormona paratiroidea 1-84 (PTH), somatostatina 1-28 (SST), plectasina (PLEC) e inhibidor de tripsina

pancreática bovina (BPTI/aprotinina); cada péptido fue expresado con y sin la etiqueta CASPON en el carbono N-terminal, con el objetivo de evidenciar la necesidad de una etiqueta para una expresión óptima. Los autores reportaron rendimientos de 1.2 g/L, 3.2 g/L, 0.64 g/L, 0.66 g/L de los constructos CASPON-PTH, CASPON-SST, CASPON-PLEC y CASPON-BPTI, respectivamente utilizando la cepa BL21(DE3) de *E. coli*; aunque no reportan de forma cuantitativa la concentración de proteína sin etiqueta, si reportan de forma cualitativa mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE que la expresión sin etiqueta fue débil e indetectable, mientras que el constructo con la etiqueta fue claramente visible y mucho mayor (Gibisch *et al.*, 2024).

Vargas-Cortez *et al.*, en su trabajo “*Production of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with the fusion protein CusF3H+*”, presentan la variante CusF3H+, a la que agregaron 3 residuos de histidina en el extremo N. Estos residuos le confieren la capacidad de unirse a iones metálicos, específicamente a iones Ni(II), que por lo general están presentes en las resinas de columnas tipo IMAC. Reportan que la adición de CusF3H+ no alteró la expresión de la proteína verde fluorescente, pero sí mejoró considerablemente su purificación por medio de cromatografía de afinidad a iones metálicos, tal como fue previsto; también reportan una mejora en la solubilidad de la proteína debido a la poca formación de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Realizan una comparación del nivel de purificación del constructo con CusF y del constructo con la variante CusF3H+, reportando un porcentaje de pureza posterior a la elución de 28% y 74%, respectivamente, obteniendo una concentración de 16.3 mg/L, en comparación con estudios previos en los que se utilizó la proteína de tipo salvaje, obteniendo únicamente 8 mg/L, o incluso utilizando la etiqueta His-tag, donde se obtuvo solo 3.5 mg/L. La nueva variante presenta ventajas claras sobre la purificación de proteínas recombinantes, cuyo paso

es una limitante en la aplicación de péptidos antimicrobianos (baja pureza y poca solubilidad) (Vargas-Cortez *et al.*, 2017)

En el año 2025, Huertas *et al.*, diseñaron un péptido basado en la secuencia 115 – 129 de la miotoxina II de la serpiente *Bothrops asper*; el veneno representa moléculas bioactivas de gran atención. La miotoxina es una proteína citotóxica proveniente de la fosfolipasa A2 (PLA2); anteriormente se ha reportado que el veneno de la serpiente *Bothrops asper* presentaba actividad antimicrobiana, la región que potencia ese efecto antimicrobiano es un tramo de aminoácidos cerca del extremo C terminal, ya que contiene una alta concentración de aminoácidos catiónicos, los cuales le permiten interactuar con la membrana celular bacteriana, los autores diseñaron el péptido debido a la toxicidad que presenta de forma natural. Los resultados de los ensayos antimicrobianos mostraron lo siguiente, frente a las cepas sensibles de *E. coli* y *P. aeruginosa* obtuvieron una MIC₅₀ a concentraciones de 0.27 mg/mL y 2.93 mg/mL; sin embargo, no se reportó actividad contra cepas resistentes (*K. pneumoniae* NDM-1 positiva y un aislado ESBL *E. coli*), aunque los autores lo atribuyen a las variaciones presentes en la membrana celular, específicamente en las estructuras de lipopolisacáridos (Huertas *et al.*, 2025).

Gracias al uso generalizado de antibióticos, infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente (MDR-PA) han presentado un auge en los últimos años, y representa una de las infecciones más frecuentes en espacios hospitalarios, siendo el responsable de aproximadamente entre el 7.1 y el 7.3% de las infecciones asociadas a la atención a la salud, y alcanzando hasta en 16.2% en unidad de cuidados intensivos (Reynolds & Kollef, 2021), e incluso en infecciones como neumonía asociada ventilación oscila entre un 32% a un 58.8% (Reynolds & Kollef, 2021).

Los carbapenémicos son antibióticos considerados como de última línea; por lo que específicamente las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos adquieren especial atención, ya que directamente limitan las opciones reales de tratamiento. Ya se ha reportado que esta cepa presenta una resistencia superior al 30% (Reynolds & Kollef, 2021). Aislamientos de diferentes hospitales han mostrado alta resistencia a antibióticos, destacando a imipenem, meropenem, ticarcilina/ácido clavulánico y aztreonam, obteniendo frecuencias de hasta 90% (Wei *et al.*, 2024), de las cepas aisladas, el 40.74% portaban genes de carbapenemasas, y reportaron la expresión de MexA de 2.47 ± 2.30 en los grupos resistentes, quien actúa como un adaptador que se ensambla con MexB y OprM y forman una estructura que atraviesa la membrana celular (Wei *et al.*, 2024).

Estudios sobre la actividad antimicrobiana ejercida sobre cepas de *P. aeruginosa* han mostrado la necesidad de probar nuevas alternativas, el péptido rACD expresado en *Komagataella phaffii* reveló una reducción dependiente de la concentración, ya que a una concentración de 150 µg/mL de rACD redujo únicamente un 58% a una cepa sensible de *P. aeruginosa*, y posteriormente se necesitó de un rango de concentración de 143.04 µg/mL y 320.64 µg/mL para inhibir al 50% y al 90% respectivamente (Akbari *et al.*, 2025). Péptidos derivados de LL-37, como LL-37_GFP o el β D3 β D1LAPBac5 expresados en *E. coli*, también han mostrado actividad antimicrobiana mejorada en comparación con otros sistemas de expresión como *L. lactis* (Travé-Asensio *et al.*, 2025).

Para *A. baumannii* no es muy diferente, Hosseini *et al.* reportan la evaluación de un péptido nuevo sintetizado de 20 aminoácidos *in vitro* contra cepas de *A. baumannii*; este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir bajo presión farmacológica y de poder adaptarse a ese ambiente hostil. Los autores reportan una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 64 µg/mL, reportando una actividad antimicrobiana sustancial (Hosseini *et al.*, 2025)

P. aeruginosa presenta resistencia de forma natural a antibióticos de uso común en la práctica clínica, tales como penicilinas, rifampicina, cefalosporinas de primera y segunda generación, cloranfenicol o clotrimazol (Casal *et al.*, 2012). Inicialmente, la primera alternativa a este problema fue tratar a los pacientes mediante terapias combinadas, es decir, con dos tratamientos simultáneos. Por ejemplo, tratamientos como piperacilina/tazobactam + tobramicina para *P. aeruginosa* (Ruiz-Aragón *et al.*, 2019), o colistina/tigeciclina para otro tipo de bacterias resistentes (Peck *et al.*, 2012). Sin embargo, este tipo de terapias simultáneas presenta los mismos efectos que el tratamiento con un solo antibiótico, lo que finalmente nos hace regresar al problema inicial, convirtiendo a las cepas en multirresistentes, convirtiendo estos tratamientos en una solución temporal.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) han cobrado gran interés en los últimos años debido a su potencial para enfrentar la crisis global derivada de la resistencia microbiana. Como consecuencia, se han desarrollado numerosos estudios orientados a identificar nuevos AMP y optimizar su actividad antimicrobiana mediante distintas estrategias biotecnológicas.

Un ejemplo de ello es el péptido antimicrobiano Bin1b, expresado en *E. coli* mediante el uso de las proteínas de fusión SmbP y CusFH⁺. Bin1b es una β -defensina compuesta por aproximadamente 45 aminoácidos, originalmente aislada del epidídimo de ratón, donde participa como primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas. Estas características han despertado interés por sus propiedades antimicrobianas y su posible aplicación terapéutica. En dicho estudio, el objetivo principal fue evaluar una metodología alternativa de expresión recombinante utilizando SmbP y CusFH⁺ como etiquetas de fusión, con la finalidad de obtener una molécula biológicamente activa. Asimismo, los autores destacaron que esta estrategia permitió reducir costos, disminuir el tiempo de procesamiento y facilitar la purificación del péptido obtenido (Montfort-Gardeazabal *et al.*, 2021).

Con el paso del tiempo, la búsqueda de nuevas formas de producción de péptidos antimicrobianos ha aumentado, con la intención de disminuir cualquier tipo de limitación que pueda presentarse en la producción de nuevos AMP. Una de las estrategias utilizadas para mejorar su producción es la dimerización de péptidos, ya que promete aumentar su eficacia. La dimerización de péptidos busca aumentar su estabilidad frente a proteasas, lo que en algunas ocasiones puede representar un problema, un ejemplo es el péptido A3-APO. Generalmente, los péptidos dimerizados se sintetizan mediante enlaces disulfuro, colocando residuos de cisteína en alguna posición del péptido, y mediante enlaces de amida, colocando residuos de lisina o de glutamato, pero ahora en la posición C- o N-terminal, respectivamente. Sin embargo, una limitación presente en esta forma de producción para AMP, es que la dimerización da como resultado una disminución de la actividad antimicrobiana, totalmente contrario a lo que se busca, como ejemplo de este fenómeno encontramos al péptido Ctx-Ha, que contra bacterias Gram positivas, disminuye su actividad antimicrobiana, reportando para *S. aureus* una concentración de 1.7 μM , 8.9 μM , 3.2 μM y 12.9 μM para el péptido como monómero, el dímero DSE, el dímero DEP y el dímero DEA, respectivamente; para *E. coli* reportaron 3.4 μM , 3.3 μM , 1.6 μM y 6.5 μM para el monómero, DSE, DEP y DEA respectivamente y finalmente 54.6 μM , 53.3 μM , 51.7 μM y 100 μM . Aunque no se observó una mejora en la actividad bacteriostática, si se observó que los dímeros mostraron mayor tendencia a tomar una estructura α -helicoidal en la mimetación de membranas, lo que sugiere una estabilización de la estructura secundaria activa de Ctx-Ha fenómeno (Lorenzón *et al.*, 2012, 2019) y aunque no se reportan ensayos de estabilidad proteolítica, si existen diversos estudios sobre este fenómeno; tal es el caso de Sandín *et al.*, quienes reportaron que el péptido RN3(1-45) (derivado del dominio N-terminal de RNase 3) tenía vida media de 12 minutos en suero, mientras que el análogo modificado alcanzo una vida media mayor a 6 horas de estabilidad; y en cuanto a su actividad antimicrobiana no mostró mejoría pero tampoco disminuyo, lo que quiere decir que

modificaciones estructurales que dificulten el acceso de proteasas pueden aumentar la estabilidad (Sandín *et al.*, 2021).

LL-37 es uno de los péptidos antimicrobianos más atractivos gracias a su multifuncionalidad, es un AMP catiónico con una estructura α -helicoidal y es producido naturalmente en células humanas. En un estudio realizado en 2019, se evaluó el perfil antimicrobiano del péptido LL-37, mostrando resultados relevantes, demostrando que es capaz de eliminar a una amplia gama de bacterias patógenas, entre las cuales destacan *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp* y *E. coli*, sin embargo, en el mismo estudio destacan que la diferencia entre la actividad antimicrobiana del péptido no es lo suficientemente significativa entre la cepa de *A. baumannii* resistente y la cepa sensible a antimicrobianos. (Neshani *et al.*, 2019). Esta es una de las razones por las que se ha buscado desarrollar péptidos antimicrobianos híbridos, capaces de proporcionar una actividad antimicrobiana aún mayor que la de un AMP por sí solo. Un péptido antimicrobiano híbrido no es más que la unión de dos AMP ya conocidos. Esta unión busca incrementar su actividad antimicrobiana, mejorar la selectividad e incluso reducir la citotoxicidad (Wade *et al.*, 2019). En 2017 se desarrollaron 3 nuevos péptidos híbridos mediante la unión de FV7 a los AMP LL-37 (LL), cecropin A (CE) y magainina II (MA) en el extremo N-. Los tres péptidos resultantes, FV-LL, FV-CE y FV-MA, mostraron actividad antimicrobiana superior en un panel de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, en comparación con la de los péptidos iniciales. Se utilizaron *E. coli* y *S. aureus* para la evaluación, los tres péptidos híbridos alteraron las membranas de dichas bacterias y se demostró a través de microscopía electrónica. Entre otros resultados, FV-LL mostró una CMI más baja que la del resto, así como la tasa de hemólisis más baja, y fue el permeabilizador más potente (Gan *et al.*, 2021).

El novedoso enfoque de unir dos péptidos y potenciar su actividad antimicrobiana ha cobrado atención en los últimos años. En 2022, Ajish *et al.* publicaron el diseño de un nuevo híbrido compuesto por LfcinB, un péptido catiónico de 25 residuos producido por la digestión con pepsina de la lactoferrina bovina, y el análogo KR-12-a4. Los resultados de los ensayos antimicrobianos del híbrido mostraron resultados mejorados (4-8 μM) en comparación a los péptidos individuales (1 hasta $> 64 \mu\text{M}$) (Ajish *et al.*, 2022).

En el año 2024, Narh *et al.* publicaron el artículo sobre el diseño de un nuevo péptido antimicrobiano híbrido llamado LL-37_Renalexin.

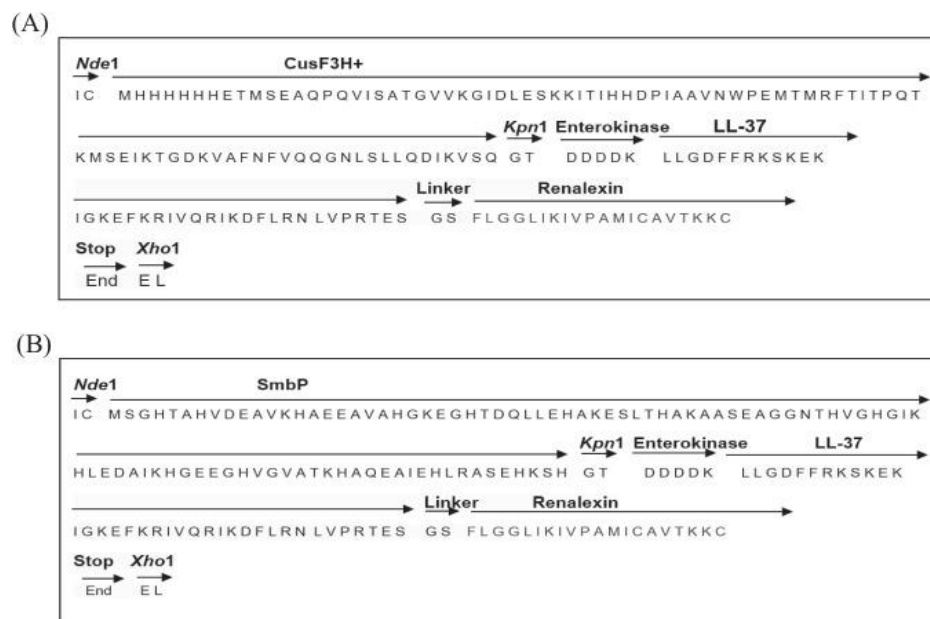


Figura 3. Secuencia de aminoácidos del casete de expresión que codifica los péptidos de fusión recombinantes. A. Construcción que emplea la proteína de fusión CusF3H⁺ como etiqueta N-terminal. Se indican los sitios de restricción *NdeI*, *KpnI* y *XhoI*, el sitio de reconocimiento para la enteroquinasa (DDDDK) y la secuencia del péptido LL-37 (LLGDFFRKSKEK) seguido de un conector (*linker*) y renalexin (FLGGLIKIVPAMICAVTKKC). B. Construcción que utiliza la proteína SmbP como etiqueta de fusión N-terminal. Se mantienen los mismos sitios de restricción, el sitio de enteroquinasa, el conector y las secuencias de LL-37 y renalexin. *Nota.* Adaptado de (Narh *et al.*, 2024).

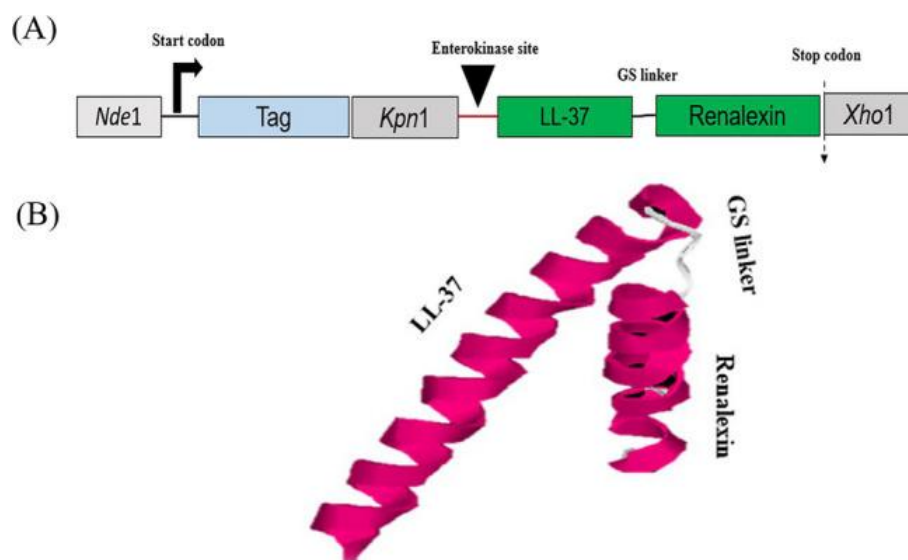


Figura 4. Diseño del péptido antimicrobiano híbrido LL-37_Renalexin. **A** Representación del mapa genético del casete de expresión para la expresión de LL-37_Renalexin en *E. coli*. **B** Estructura secundaria molecular de Riben en 3D predicha para el péptido híbrido LL-37_Renalexin que muestra los componentes que incluyen LL-37, el enlace peptídico GS flexible y Renalexin. Nota. Adaptado de (Narh *et al.*, 2024).

Utilizaron un linker de glicina-serina (GS) y expresaron las proteínas de fusión SmbP y CusFH+. Se evaluó la expresión de ambas proteínas de fusión recombinantes, SmbP_LL-37_Renalexin y CusFH+_LL-37_Renalexin, en dos cepas de *E. coli*: *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* SHuffle T7. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria con el objetivo de medir su actividad antimicrobiana, se evaluó contra aislados clínicos de *S. aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *K. pneumoniae* y *E. coli*. Se obtuvo una CMI de 10-27 μM , valores más bajos que las CMI reportadas de los péptidos únicos LL-37 y Renalexin (50-100 μM), lo que nos indica que el AMP híbrido requiere una menor cantidad para inhibir a dichas bacterias patógenas. Finalmente, se clasifica como un péptido antimicrobiano que no tiene efectos tóxicos sobre células humanas normales, gracias a los hallazgos de un bioensayo antibacteriano realizado. Expresan el péptido híbrido con éxito, cuidando de mantener intacta su bioactividad y demostrando el aumento y la potencialización de su actividad antimicrobiana mediante la unión (Narh *et al.*, 2024).

CAPÍTULO 3

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

El péptido híbrido LL-37_Renalexin posee actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (CRPA) y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) a una concentración mínima inhibitoria alrededor de 25 μ M.

3.2 Objetivo general:

Cuantificar la actividad antimicrobiana del péptido híbrido LL-37_Renalexin mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria requerida para inhibir las bacterias resistentes *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (CRPA) y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB).

3.3 Objetivos específicos:

1. Expresar, purificar y caracterizar el péptido híbrido LL-37_Renalexin en *E. coli* SHuffle T7(DE3)
2. Cuantificar la actividad antimicrobiana de LL-37_Renalexin mediante el método de dilución en microplaca contra CRPA y CRAB.
3. Cuantificar la actividad antimicrobiana de LL-37_Renalexin por el método de recuento en placa contra CRPA y CRAB.

CAPÍTULO 4

4. Metodología

4.1 Transformación de *Escherichia coli* SHuffle T7(DE3) con la construcción pET30a-CusF3H+_LL37_Renalexin.

Se mezclaron 30 μ L de células de *E. coli* SHuffle calcio competentes y se mezclaron con 10 ng de la construcción pET30a_CusF3H+_LL37_Renalexin en un microtubo de 1.5 mL. Se dejó incubando en hielo por 30 minutos y después se realizó un choque térmico a 42°C por 1 minuto, al terminar se colocó la reacción en hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregaron 800 μ L de caldo Luria Bertani (LB) y se mezcló suavemente. Se dejó incubando 1 hora a 37°C/150 rpm.

Luego del tiempo de incubación el microtubo fue centrifugado a 13,000 rpm por 10 minutos y después se decantó el sobrenadante, dejando un aproximado de 50 μ L de caldo LB. Las células del microtubo fueron resuspendidas y se transfirieron a placas de agar LB con kanamicina a una concentración final de 30 μ g/mL y se esparció por extensión con varilla. Por último, las placas se dejaron incubando por 16 h a 37°C.

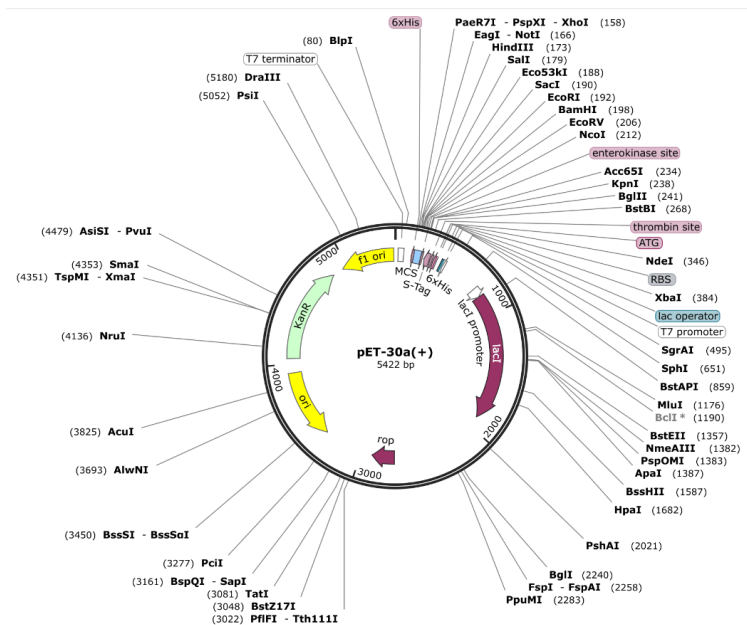


Figura 5. Vector pET-30a+ utilizado para la transformación. Se indican las regiones del múltiple sitio de clonamiento (MCS I y MCS II), las secuencias de la cola de histidinas (6xHis) en ambos extremos del MCS, y el sitio de reconocimiento para la enteroquinasa. El mapa también incluye el origen de replicación, el gen de resistencia a kanamicina y la región del terminador T7. Obtenido de Snapgene.

4.2 Expresión a pequeña escala del péptido.

Las células transformadas se inocularon en 4 mL de caldo LB con kanamicina (30 µg/mL) y se dejaron incubando a 37°C a 150 rpm por 16 h. Pasado el tiempo de incubación se tomaron 200 µL del cultivo y se inocularon en 4 mL de caldo LB con kanamicina (30 µg/mL). Los cultivos se llevaron a incubación 37°C a 150rpm por 3-4 h, hasta que alcanzo una densidad óptica₆₀₀ nm alrededor de 0.4 y 0.6.

Una vez alcanzada la DO₆₀₀ nm, se detuvo la incubación y se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión del péptido. Después de la inducción se regresaron a incubación a 25°C/150 rpm por 16 horas.

4.3 Lisis celular.

La biomasa se recolectó mediante centrifugación a 13,000 rpm por 4 minutos y se descartó el sobrenadante. Se llevó a cabo una lisis alcalina utilizando sample buffer 6x (2.4 mL Tris-HCl 1M pH 6.08, 4 mL glicerol 100%, 0.8 g SDS, 4 mg azul de bromofenol, 0.5 mL β -mercaptoetanol, 3.1 mL agua destilada). El pellet fue resuspendido en 100 μ L de agua estéril y 20 μ L de buffer a una concentración final de 1x. Finalmente se llevó a incubar en baño de agua a 80°C por 10 minutos para desnaturalizar la estructura secundaria de la proteína.

4.4 Análisis por SDS-PAGE de expresión a pequeña escala.

Se llevó a cabo un análisis en una electroforesis en gel de poliacrilamida a una resolución del 15% (1.775 mL agua destilada, 1.875 mL de acrilamida 40%, 1.250 mL de resolving buffer pH 8.8, 50 μ L de SDS 10%, 2.5 μ L de TEMED, 25 μ L de persulfato de amonio 10%) y un gel de apilamiento de 4% (3.8 mL agua destilada, 0.5 mL de acrilamida 40%, 1.250 mL de resolving buffer pH 8.8, 50 μ L de SDS 10%, 2.5 μ L de TEMED, 25 μ L de persulfato de amonio 10%). Como solución amortiguadora se utilizó buffer de electrodos (3 g Tris base, 14 g de glicina, 10 mL SDS 10%, pH 8.3). El gel de resolución se vertió entre dos placas de vidrio y se agregaron 200 μ L de butanol para evitar la formación de burbujas y se dejó solidificar 30 minutos. Después del tiempo de solidificación se retiró el butanol y se enjuagó 3 veces con agua destilada para después verter el gel de apilamiento al 4% dejándolo solidificar 25 minutos.

Se cargó un total de 3 μ L de muestra en cada pocillo y 3 μ L de proteína estándar de 120 kDa (PAGE-MÁSTER estándar de proteína plus) como marcador de peso molecular para

caracterizar al péptido según su tamaño. La corrida se inició con 80 voltios por 10 minutos y después a 110 voltios por 1.3 horas.

Terminada la electroforesis el gel se tiñó con 100 mL de solución teñidora (1 g de azul de comassie brillante R-250, 400 mL de metanol 40%, 100 mL de ácido acético glacial 10%, 1 L de agua destilada) en una plancha de agitación a 60 rpm por 15 minutos. Después de la tinción el gel se destiñó en 100 mL de solución desteñidora (150 mL de metanol 30%, 50 mL de ácido acético glacial, 300 mL de agua destilada) toda la noche y posteriormente se observaron las bandas correspondientes.

4.5 Expresión a gran escala de proteínas a 1 L de medio de cultivo.

Para la expresión del constructo CusF3H+_LL37_Renalexin se inoculó 200 µL de células transformadas de *E. coli* SHuffle en 10 mL de caldo LB/kan (30 µg/mL) y se incubó a 37°C a 150 rpm 16 horas.

La expresión se llevó a cabo en 5 matraces deflectores de 250 mL, cada matraz con caldo LB/kan (30 µg/mL) obteniendo un volumen final de 1 L. Cada matraz fue inoculado con el cultivo preparado anteriormente con las células transformadas y se dejaron incubando a 37°C a 150 rpm por 3-4 horas hasta alcanzar una DO₆₀₀ nm de entre 0.4-0.6. Una vez ajustada la DO₆₀₀ la incubación se detuvo y la expresión fue inducida con 200 µL de IPTG con una concentración final de 1 mM. Los cultivos inducidos se llevaron a incubar a 25°C a 150 rpm por 16 horas.

Los pellets celulares se recolectaron mediante centrifugación refrigerada a 4°C por 15 minutos a 12,000 rpm en tubos de 500 mL. Los pellets fueron resuspendidos en una solución amortiguadora (50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 8.08), se agregaron también 22 g de perlas de vidrio de 0.1 mm, 10 µL de cóctel inhibidor de proteasas y 10 µL de antifoam para

evitar la formación de burbujas. Los tubos se llevaron a agitación en vórtex por 10 minutos, intercalando vortex e incubación en hielo para cuidar la temperatura del lisado. Posteriormente el lisado se llevó a centrifugación refrigerada a 4°C por 20 minutos a 12,000 rpm. El clarificado obtenido fue transferido a un tubo falcón de 50 mL nuevo.

4.6 Purificación de proteína híbrida recombinante por cromatografía de iones inmovilizados (IMAC).

Para la purificación del constructo CusF3H+_LL37_Renalexin se empleó el sistema ÄKTA Prime Plus (sistemas GE Healthcare) mediante cromatografía de afinidad gracias a las histidinas unidas en nuestra proteína de fusión que les confiere afinidad a iones metales como níquel, cobre y zinc.

Se utilizó una columna de 1 mL HisTrap FF cargada con iones Ni (II). Dicha columna fue equilibrada con 5 volúmenes con solución amortiguadora (50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 8.08) en condiciones de flujo de 0.7 mL/min y 0.5 MPa. Posteriormente se cargó la columna con la muestra, adicionalmente recolectando el percolado (fracción no unida a la columna) y la columna fue lavada con 10 volúmenes solución amortiguadora (50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 8.08) hasta que la absorbancia descendiera a 0.09. Se llevó a cabo una elución en gradiente utilizando una solución amortiguadora que contenía imidazol (Tris 50 mM, 500 mM NaCl y 200 mM imidazol, pH 8.0), recolectando 40 fracciones de 1 mL cada una, manteniendo un flujo constante de 0.7 mL/min y una presión no mayor a 0.5 MPa.

4.7 Análisis por SDS-PAGE de expresión a 1 litro.

Posterior a la purificación mediante IMAC se llevó a cabo un análisis por SDS-PAGE 15% de las fracciones correspondientes al pico de elución. El gel de resolución al 15% (1.775 mL agua destilada, 1.875 mL de acrilamida 40%, 1.250 mL de resolving buffer pH 8.8, 50 µL de SDS 10%, 2.5 µL de TEMED, 25 µL de persulfato de amonio 10%) y el gel de apilamiento al 4% (3.8 mL agua destilada, 0.5 mL de acrilamida 40%, 1.250 mL de resolving buffer pH 8.8, 50 µL de SDS 10%, 2.5 µL de TEMED, 25 µL de persulfato de amonio 10%).

La pureza de las fracciones obtenidas tras la purificación por cromatografía de afinidad (IMAC) fue evaluada mediante análisis densitométrico de geles de SDS-PAGE utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

Las imágenes digitales de los geles fueron importadas al software y procesadas siguiendo un protocolo estándar. La pureza relativa de la proteína del constructo CusF3H⁺_LL-37_Renalexin fue calculada como el porcentaje del área correspondiente a la banda de 17 kDa respecto al área total de todos los picos detectados en el carril.

4.8 Diálisis para la remoción de imidazol y sales.

Las fracciones más limpias se introdujeron en una membrana de diálisis SnakeSkinTM (10,000 MWCO) de 7 cm y fueron dializadas para retirar el exceso de imidazol y sales utilizando una solución amortiguadora (50 mM de Tris, 1mM de CaCl₂, pH 7.4). Se llevaron a cabo dos diálisis de 1 hora cada una en agitación con un agitador magnético a temperatura ambiente.

4.9 Cuantificación por el método de Bradford.

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones (0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.4 µg/mL, 0.6 µg/mL, 0.8 µg/mL, 1.0 µg/mL y 1.3 µg/mL). En cada celda se agregaron 20 µL de cada dilución y 1 mL de reactivo de Bradford al 1x. Las lecturas se llevaron a cabo a 595 nm.

4.10 Ensayos antimicrobianos CusF3H+_LL-37_Renalexin: Dilución en microplaca.

Los aislamientos de bacterias patógenas fueron proporcionados por el Departamento de Patología Clínica ubicado en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey, Nuevo León.

Se realizó la actividad antimicrobiana del constructo CusF3H+_LL-37_Renalexin frente a las cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *A. baumannii* resistente a carbapenémicos utilizando el método de dilución en microplaca para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Cultivos jóvenes de los aislados clínicos se cultivaron en agar Mueller-hinton e incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, se seleccionaron de tres a cuatro colonias aisladas de cada cepa y se suspendieron en solución salina estéril hasta ajustar la turbidez al estándar 0.5 de la escala de McFarland.

Una vez estandarizada la suspensión bacteriana, se realizó una dilución 1:100 en el medio correspondiente: caldo Mueller-Hinton para *P. aeruginosa* y caldo TSB para *A. baumannii*. Para ello, se mezclaron 100 µL de la suspensión celular con 9.9 mL de medio estéril, con el fin de obtener un inóculo final a una concentración de 5×10^5 UFC/mL.

La concentración mayor del constructo se preparó a 21 μM y se llevaron a cabo una serie de diluciones en agua estéril a concentraciones de 21 μM , 10.5 μM , 5.5 μM , 2.63 μM , 1.31 μM , 0.66 μM y 0.33 μM para su posterior evaluación.

El inóculo preparado se empleó en el ensayo estándar de CMI por microdilución en placa de 96 pozos. En cada pozo se colocó previamente el volumen correspondiente de medio de cultivo y de cada dilución del tratamiento evaluado a las concentraciones establecidas. Después, se adicionó el volumen requerido del inóculo bacteriano para alcanzar la concentración celular final de 5×10^5 UFC/mL. Asimismo, se incluyeron controles de crecimiento (medio con inóculo sin tratamiento) y controles de esterilidad (medio sin inóculo). Finalmente, las microplacas se incubaron a 37 °C durante 18–24 h en condiciones aerobias, y posteriormente se evaluó mediante lectura de absorbancia el crecimiento bacteriano para determinar la menor concentración capaz de inhibirlo.

4.11 Ensayos antimicrobianos CusF3H+_LL-37_Renalexin: Recuento en placa

La actividad antimicrobiana del péptido híbrido CusF3H+-LL37_Renalexin se determinó mediante el método de recuento en placa, siguiendo una estrategia basada en lo reportado por Perez-Perez *et al.* (2021), quienes describen la actividad antimicrobiana como el porcentaje de población bacteriana inhibida después de la incubación.

Se llevó a cabo la resiembra de las cepas resistentes en placas de agar Mueller-hinton y se llevaron a incubar a 37°C por 24 h; posterior al tiempo de incubación, se tomaron 3-4 colonias aisladas para suspenderlas en 3 mL de solución salina estéril y se ajustó al 0.5 en la escala de McFarland utilizando un espectrofotómetro midiendo a 600 nm alcanzando una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente en caldo MH se realizó una dilución 1:100, agregando 9.9 mL de medio y 100 μL de células para alcanzar una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

A partir de este inóculo, se prepararon los tratamientos correspondientes, un grupo control sin péptido y un grupo tratado con el péptido a una concentración de 21 μM . Las muestras se incubaron a 37°C por 3 horas.

Posteriormente se realizaron diluciones (10^{-1} a 10^{-6}), tomando una alícuota de 0.1 mL, las cuales se esparcieron en placas con agar MH por triplicado y se incubaron durante 16 horas.

El conteo se realizó de forma manual, reportando el promedio de colonias en las placas que presentaron de 25-300 colonias, y el porcentaje de reducción bacteriana. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar.

CAPÍTULO 5

5. Resultados

5.1 Expresión a pequeña escala del péptido y análisis por SDS-PAGE

Las colonias transformadas portadoras del vector plasmídico pET30a+ y cultivadas bajo condiciones óptimas de expresión fueron sometidas a una lisis celular alcalina, y las fracciones proteicas obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% (Figura 6). Esta técnica permitió visualizar el perfil de proteínas expresadas y comparar las muestras inducidas con sus respectivos controles.

En los controles se observaron múltiples bandas correspondientes a proteínas endógenas producidas por el sistema de expresión bacteriano. No obstante, en las muestras transformadas e inducidas se presentó un patrón similar acompañado de una banda adicional con un peso molecular aproximado de 17.0 kDa.

El tamaño estimado de dicha banda coincide con el peso molecular esperado para el constructo recombinante LL-37_Renalexin unido a CusF3H+, integrado por 7.0 kDa correspondientes al péptido híbrido y 10.0 kDa de la proteína de fusión. La presencia de esta banda exclusivamente en las muestras inducidas sugiere la expresión de la proteína de interés bajo las condiciones evaluadas.

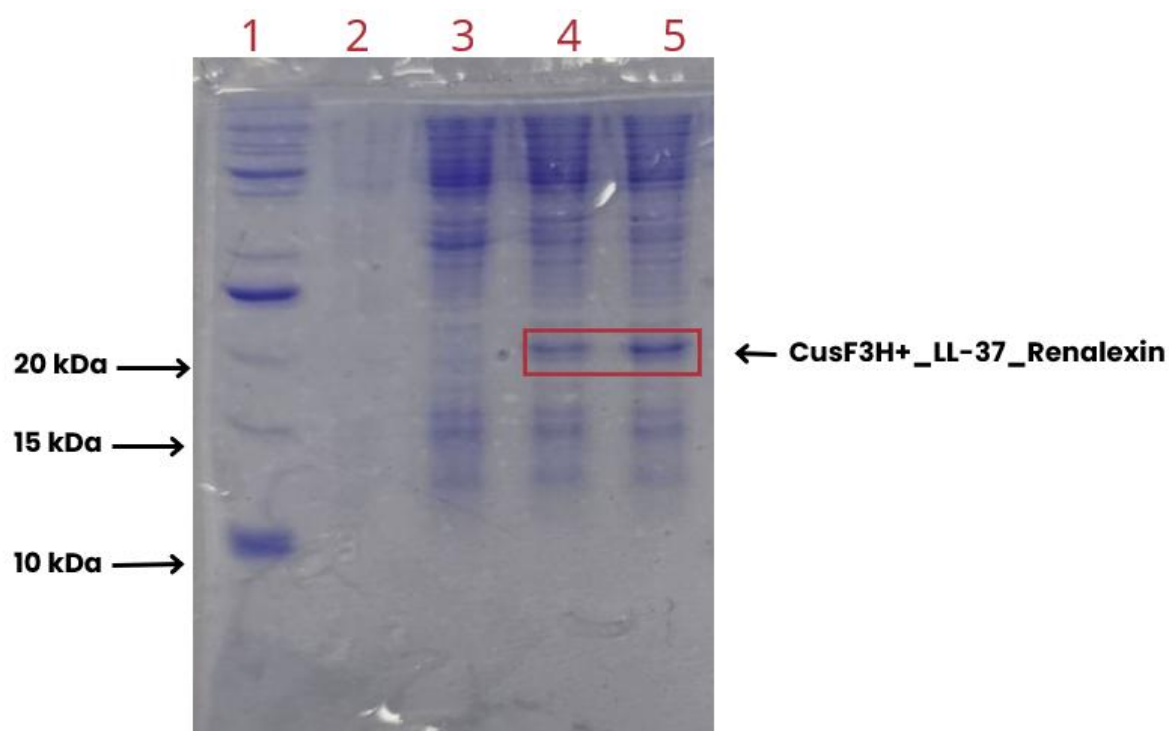


Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de la expresión del péptido CusF3H⁺-LL-37-Renalexin en *E. coli* SHuffle T7(DE3) (17kDa). 15% SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de proteínas, Carril 2-3: Control negativo (células transformadas, pero no inducidas), Carriles 4-5: Colonias evaluadas (células transformadas e inducidas).

5.1 Expresión a gran escala de proteínas a 1 L de medio de cultivo y purificación por IMAC

La purificación del péptido híbrido CusF3H⁺-LL-37-Renalexin se llevó a cabo mediante cromatografía IMAC utilizando el sistema ÄKTA Prime Plus. En la figura 7 se muestra el cromatograma obtenido durante el proceso de purificación.

Inicialmente se observa una señal elevada de absorbancia a 254 nm entre los 25 y 150 mL, lo que corresponde principalmente al paso de proteínas no retenidas o unidas débilmente a la columna durante las etapas de carga y lavado. Posteriormente, la absorbancia disminuye de forma pronunciada hasta alcanzar la línea base, lo que indica la remoción de compuestos no retenidos en la columna.

Finalmente, entre los 210 y 245 mL y coincidiendo con el incremento progresivo del porcentaje de buffer B (con imidazol como agente eluyente) se detecta un pico de elución de menor intensidad, el cual corresponde a las fracciones recuperadas durante el gradiente. Este comportamiento es característico de proteínas retenidas en la columna cargada con resina y posteriormente liberadas por el aumento en la concentración del buffer de elución, lo que sugiere que la recuperación del constructo recombinante marcado con CusF3H⁺. Se colectaron 40 fracciones de 1 mL para su posterior análisis e identificación de aquellas que contenían a la proteína de interés.

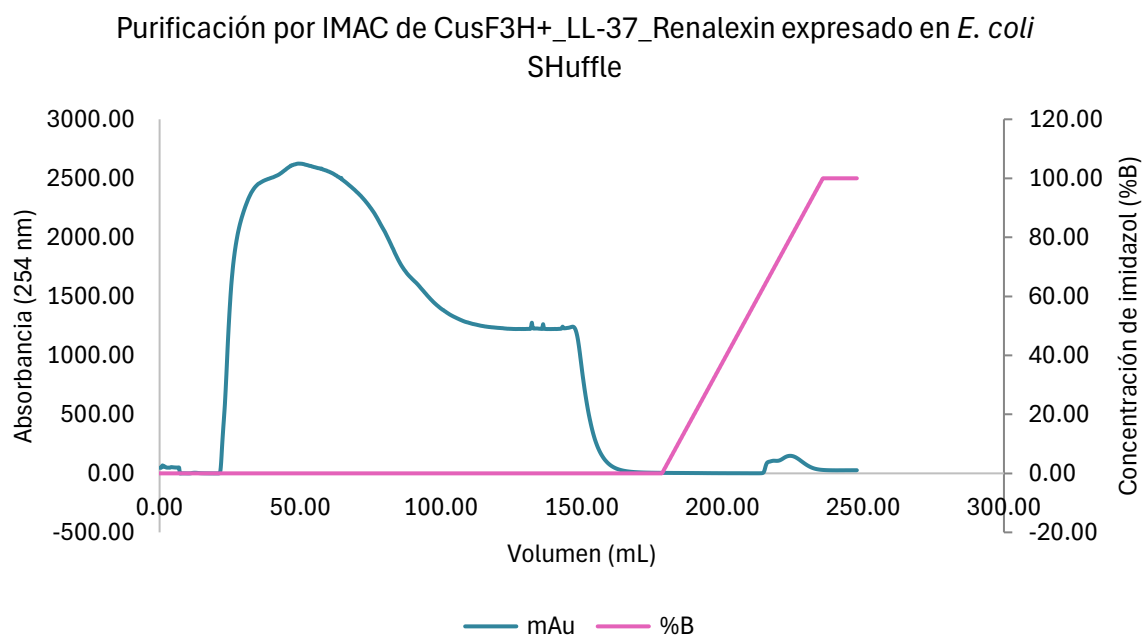


Figura 7. Cromatograma de la purificación por IMAC de CusF3H⁺_LL-37_Renalexin (17 kDa) expresado en *E. coli* SHuffle T7(DE3). Elución en gradiente (40 fracciones de 1 mL) con una solución amortiguadora con imidazol a 200 mM. Se muestra el cromatograma de elución con la absorbancia monitorizada a 254 nm (mAu) y el gradiente de elución (%B) en función del volumen (mL). El pico principal de elución, indicado por el aumento de absorbancia, corresponde a la proteína recombinante CusF3H⁺-LL-37-Renalexin.

5.2 Análisis de purificación IMAC por SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas en la purificación por IMAC se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% (figura 8). En el gel se observa que las muestras correspondientes a las fracciones de elución presentan de manera consistente una banda intensa con un peso molecular de 17.0 kDa, valor que concuerda con el tamaño esperado para el constructo completo. La detección de esta banda en múltiples fracciones confirma que el proceso de cromatografía permitió la recuperación exitosa del híbrido CusF3H⁺_LL-37_Renalexin.

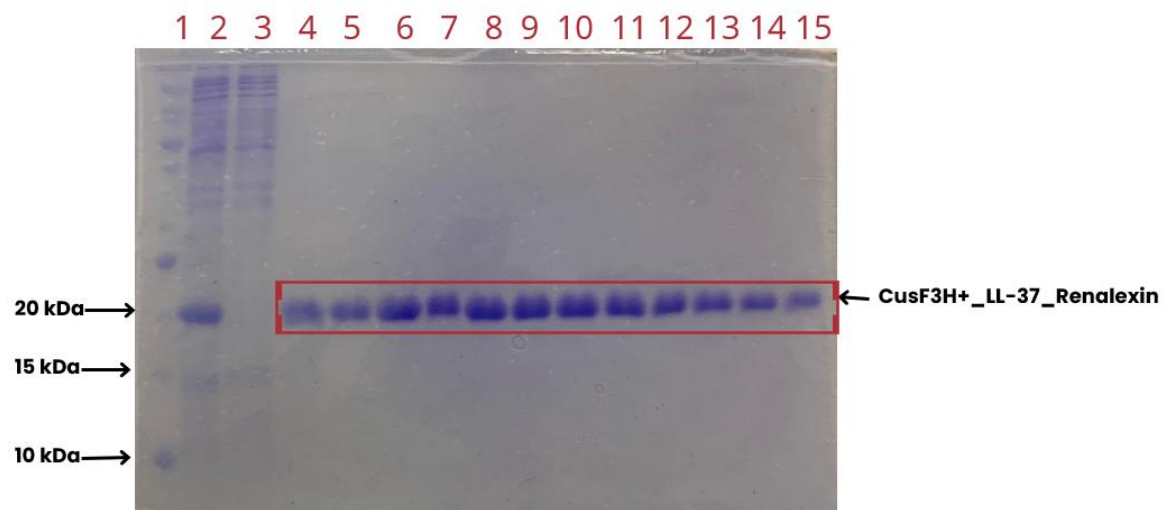
Asimismo, en comparación con las muestras control, las fracciones eluidas muestran una disminución de bandas inespecíficas y de otras proteínas endógenas. La presencia de una sola banda sugiere un grado alto de pureza relativa en las fracciones recolectadas.

Además, se aprecia una intensidad similar entre varias fracciones consecutivas, lo que indica que la elución del péptido ocurrió de forma distribuida a lo largo de distintas fracciones del gradiente, lo que permite seleccionar aquellas con mayor concentración para etapas posteriores. El análisis densitométrico de las fracciones seleccionadas mostró un perfil caracterizado por un pico predominante correspondiente a la banda de 17 kDa, atribuida al constructo CusF3H⁺_LL-37_Renalexin, acompañado de picos secundarios de baja intensidad.

Los valores de área obtenidos indicaron que la banda de interés presentó un área de 34,251.238 unidades arbitrarias, mientras que las bandas secundarias presentaron valores significativamente menores (1,808.326; 392.870; 4,005.037 y 823.255 unidades). La suma total de las áreas correspondió a 41,280.726 unidades.

A partir de estos datos, se determinó que la pureza de la proteína de interés fue de aproximadamente 96.8%, lo que indica que la mayor proporción del péptido en el carril analizado corresponde al constructo purificado.

a)



b)

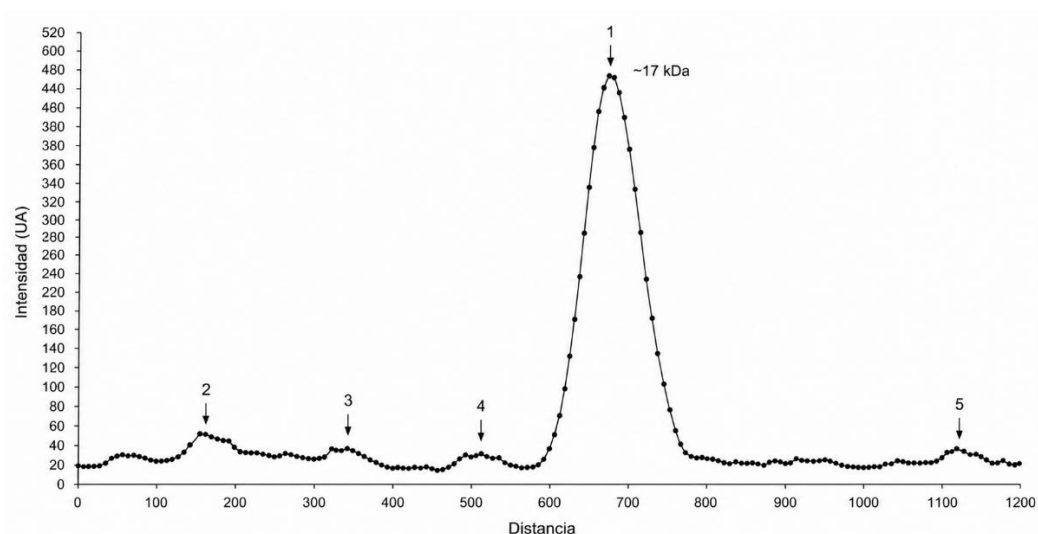


Figura 8. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación por IMAC de CusF3H+_LL-37_Renalexin (17 kDa) expresado en *E. coli* SHuffle T7(DE3). A. Carril 1: Marcador de proteínas; Carril 2: Lisis total; Carril 3: Percolado (fracción no unida a la columna); Carriles 4-15: Fracciones de elución, la presencia de esta banda a lo largo de los carriles permite evaluar la eficiencia de unión a la resina de afinidad, la eliminación de contaminantes durante los lavados y la recuperación de la proteína en las fracciones de elución. **B.** Perfil densitométrico obtenido a partir del análisis de las fracciones de elución de CusF3H+_LL-37_Renalexin mediante SDS-PAGE al 15% y posterior procesamiento en ImageJ. La intensidad de las bandas se representa en unidades arbitrarias (UA) en función de la distancia de migración electroforética. El pico principal (1), correspondiente al constructo recombinante CusF3H+_LL-37_Renalexin (17 kDa), presentó la mayor

intensidad relativa. Los picos secundarios (2–5) corresponden a proteínas residuales de baja abundancia o señales de fondo presentes tras la purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). El análisis densitométrico mostró que el área correspondiente al pico principal representó aproximadamente >90% de la intensidad total detectada en el carril

5.3 Diálisis para la remoción de imidazol y sales, y cuantificación mediante el método de Bradford.

A las fracciones que contenían el péptido híbrido se les realizó una diálisis para eliminar el imidazol. Para determinar la concentración total de proteína recuperada se elaboró una curva de calibración estándar de BSA en el rango de concentraciones mostradas en la tabla 1. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron y mostraron una relación lineal entre la concentración de proteína y la señal espectrofotométrica (figura 9). El análisis de regresión lineal generó la ecuación $y = 1.1766x - 0.1297$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9822$, lo que indica un grado alto de ajuste lineal.

A partir de esta ecuación y de las lecturas de absorbancia registradas para la muestra, se calculó la concentración de proteína producida, obteniendo un rendimiento final de 4.442 mg/L de cultivo.

Tabla 1. Datos de la curva de calibración estándar de BSA. Se presentan las concentraciones de los estándares de BSA (expresadas en mg/mL) y los valores de absorbancia promedio correspondientes, medidos a una longitud de onda de 595 nm, acompañados de su respectiva desviación estándar (DE).

	Concentraciones estándar (mg/mL)	<u>Absorbancia promedio±DE</u> (595 nm)
Estándar 1	0.5	0.525±0.000
Estándar 2	0.6	0.678±0.000
Estándar 3	0.7	0.697±0.002
Estándar 4	0.8	0.799±0.003
Estándar 5	0.9	0.826±0.000
Estándar 6	1.15	1.055±0.002
Estándar 7	1.25	1.214±0.000
Estándar 8	1.35	1.248±0.000

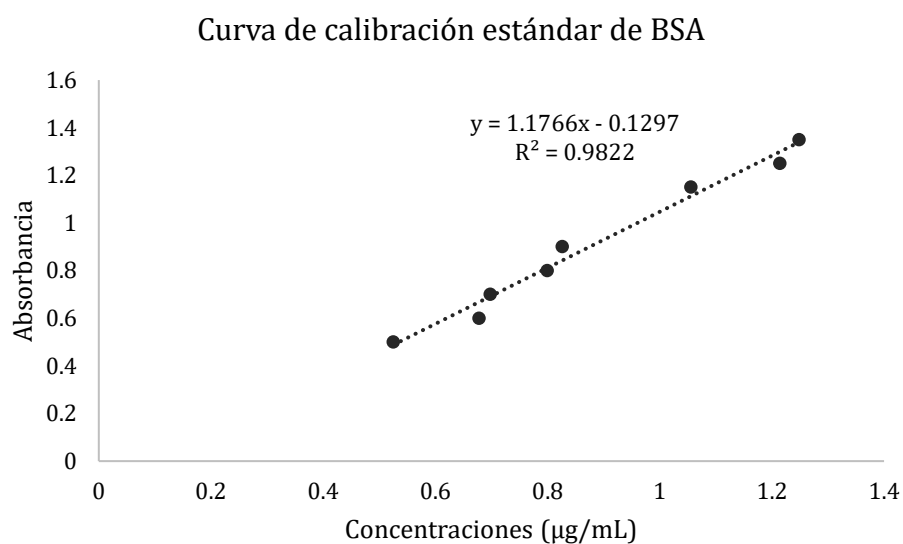


Figura 9. Curva de calibración estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Lecturas a 595 nm. Se representa la relación entre la absorbancia medida a 595 nm y las concentraciones crecientes de BSA (expresadas en µg/mL).

Los puntos experimentales se ajustaron mediante regresión lineal, obteniéndose la ecuación $y = 1.1766x - 0.1297$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9822$. Las barras de error no son apreciables debido a la baja desviación estándar entre réplicas.

5.4 Ensayos antimicrobianos de CusF3H+_LL-37_Renalexin: Dilución en microplaca.

La actividad antimicrobiana del constructo completo se evaluó mediante el método de dilución en microplaca en un rango de concentraciones de 0.33 a 21 μM , determinando el porcentaje de crecimiento bacteriano con respecto al control sin tratamiento. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración en ambas cepas, acompañado de diferencias estadísticamente significativas respecto al control (figura 10 y 11).

Para *P. aeruginosa*, el tratamiento generó una reducción progresiva del crecimiento bacteriano conforme aumentó la concentración del péptido. A 0.33 μM se observó un crecimiento cercano al 84%, sin diferencia significativa respecto al control. En 0.66 μM , 1.31 μM y 2.63 μM el crecimiento disminuyó aproximadamente a 70%, registrándose diferencias significativas ($*p \leq 0.05$). A concentraciones de 5.25 μM y 10.50 μM el crecimiento fue cercano a 57% y 55%, respectivamente, con una significancia mayor ($***p < 0.001$). Sin embargo, la máxima actividad inhibitoria se presentó a 21 μM , donde el crecimiento fue de aproximadamente 6%, también con alta significancia estadística ($***p < 0.001$), equivalente a una inhibición cercana al 94% respecto al control.

En *A. baumannii*, la respuesta inicial al tratamiento fue menor. A 0.33 μM y 0.66 μM se registraron crecimientos cercanos a 105% y 90%, respectivamente, sin diferencias significativas frente al control. A 10.50 μM el crecimiento residual fue de aproximadamente 33%, también con diferencia significativa ($**p \leq 0.01$). Finalmente, a 21 μM se registró un crecimiento cercano al 19%, correspondiente a una inhibición aproximada del 81%, con alta significancia estadística ($***p < 0.001$).

En comparación, *P. aeruginosa* mostró mayor susceptibilidad al péptido híbrido, alcanzando una inhibición casi completa a la concentración máxima evaluada y presentando diferencias significativas desde concentraciones más bajas. En contraste, *A. baumannii* mostró una respuesta más gradual y requirió concentraciones superiores para alcanzar niveles importantes de inhibición.

En conjunto, estos resultados confirman que LL-37_Renalexin posee actividad antimicrobiana significativa frente a ambos patógenos clínicamente relevantes, aunque con distinta potencia según la especie bacteriana evaluada.

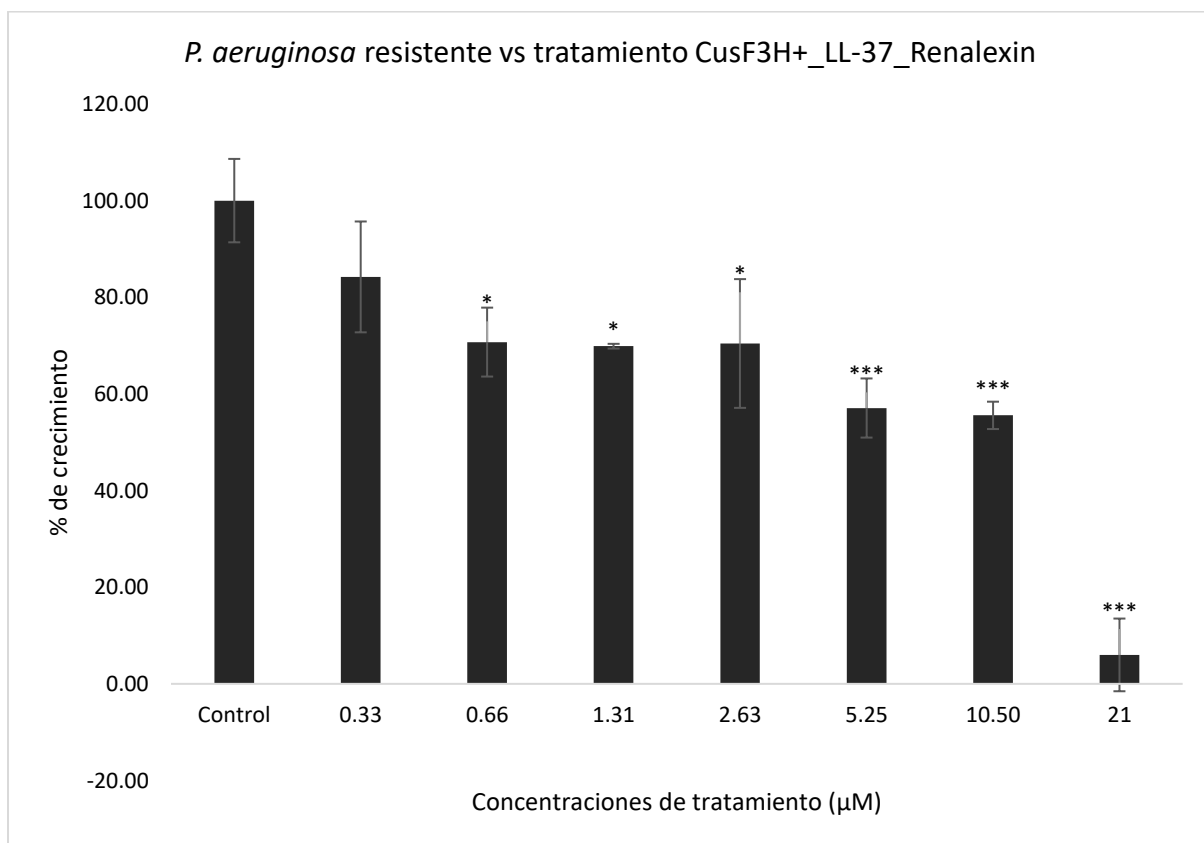


Figura 10. Actividad antimicrobiana de CusF3H+_LL-37_Renalexin contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Se muestra el porcentaje de crecimiento bacteriano en función de concentraciones crecientes del péptido CusF3H+_LL-37_Renalexin (expresadas en µM), en comparación con un control sin tratamiento. Evaluado con t-test, los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$.

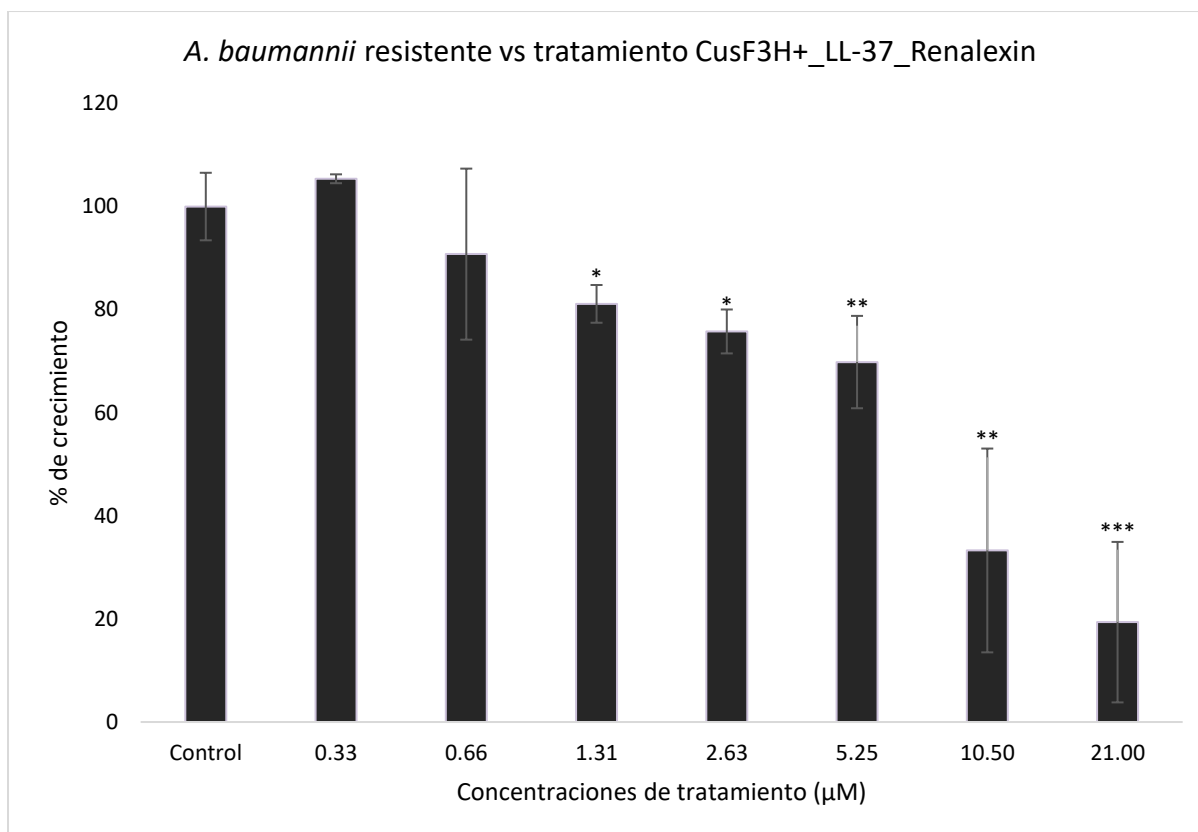


Figura 11. Actividad antimicrobiana de CusF3H+_LL-37_Renalexin contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Se muestra el porcentaje de crecimiento bacteriano en función de concentraciones crecientes del péptido CusF3H+_LL-37_Renalexin (expresadas en µM), en comparación con un control sin tratamiento. Evaluado con t-test, los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$.

5.5 Ensayos antimicrobianos de CusF3H+_LL-37_Renalexin: Recuento en placa.

La actividad antimicrobiana del constructo completo se evaluó mediante el método de recuento en placa a una concentración de 21 µM. En *A. baumannii*, el tratamiento produjo una reducción del crecimiento viable respecto al control, lo que corresponde a una actividad antimicrobiana de $46.67 \pm 10.5\%$. De manera similar, en *P. aeruginosa* se observó una disminución más pronunciada de la viabilidad celular, equivalente a una actividad antimicrobiana de $60.34 \pm 0.40\%$, evidenciando una mayor susceptibilidad de esta cepa al híbrido (tabla 2).

La representación gráfica del porcentaje de actividad antimicrobiana (figura 12) mostró al control negativo como 0% de inhibición, mientras que los valores positivos reflejaron la capacidad del péptido para disminuir la población bacteriana viable. En ambas cepas se observó una reducción significativa del crecimiento respecto al control sin tratamiento.

El análisis estadístico mediante prueba *t* evidenció diferencias altamente significativas entre los grupos tratados y sus respectivos controles ($***p \leq 0.001$). Comparativamente, el péptido mostró mayor efecto bactericida frente a *P. aeruginosa* que frente a *A. baumannii*, lo que coincide con los resultados observados previamente en el ensayo de dilución en microplaca. Estos hallazgos confirman que CusF3H+_LL-37_Renalexin conserva actividad antimicrobiana frente a ambos patógenos resistentes, incluso al evaluar directamente la viabilidad celular por recuento de colonias.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana del péptido híbrido CusF3H+-LL37_Renalexin frente a bacterias Gram negativas resistentes determinada mediante recuento en placa. Los valores de control y tratamiento corresponden al número promedio de unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas después de la incubación bacteriana en ausencia y presencia del péptido a una concentración de 21 μ M, respectivamente. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. El porcentaje de actividad antimicrobiana se calculó con base en la reducción relativa del crecimiento bacteriano respecto al control sin tratamiento.

	Control (UFC $\pm$ DE)	Tratamiento a 21 μ M (UFC $\pm$ DE)	% de actividad
<i>A. baumannii</i>	299 $\pm$ 3.5	159 $\pm$ 2	46.67 $\pm$ 1.05
<i>P. aeruginosa</i>	298 $\pm$ 1.15	118 $\pm$ 1.5	60.34 $\pm$ 0.4

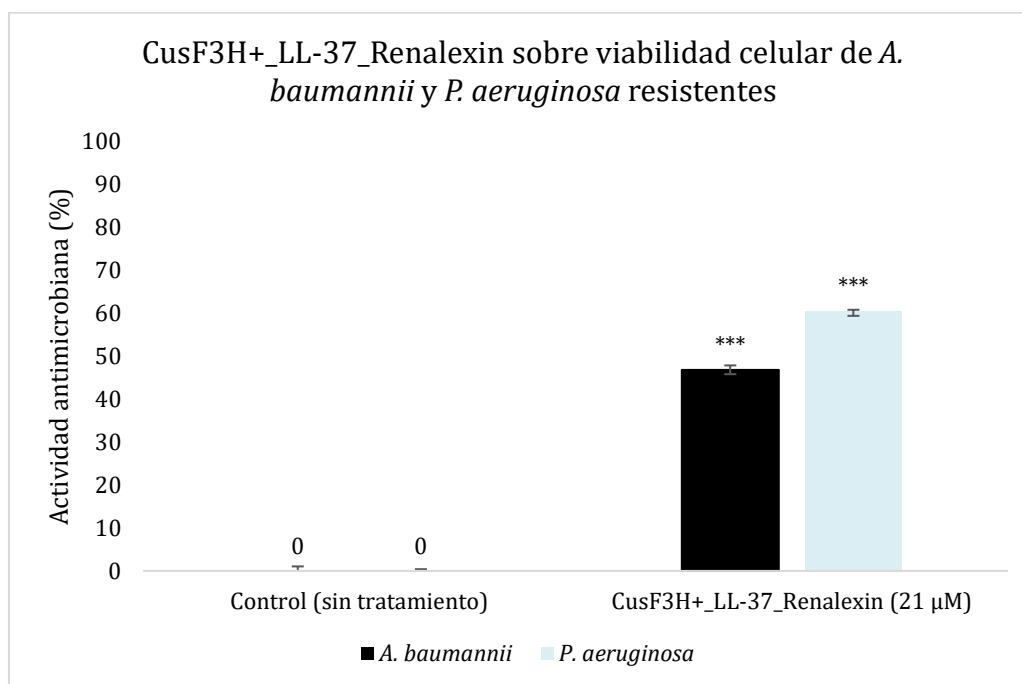


Figura 12. Actividad antimicrobiana (%) del péptido híbrido CusF3H+_LL37_Renalexin frente a *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes determinada mediante el método de recuento en placa. La gráfica muestra el porcentaje de actividad antimicrobiana generado por el tratamiento con el péptido a una concentración de 21 μM, calculado en relación con el control sin tratamiento. El porcentaje se obtuvo a partir de la disminución en el número de unidades formadoras de colonia (UFC) respecto al grupo control. El control negativo se representa como 0% de actividad antimicrobiana, mientras que valores mayores indican una mayor capacidad inhibitoria del péptido sobre la población bacteriana viable. Las barras representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se registró una actividad antimicrobiana de 46.6% frente a *A. baumannii* y de 60.3% frente a *P. aeruginosa*. Los resultados fueron evaluados mediante la prueba *t*; los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (***) $p \leq 0.001$.

CAPÍTULO 6

6. Discusión

El desarrollo de nuevas tecnologías que combaten la resistencia bacteriana ha sido de gran utilidad en los últimos años. Obtener una proteína eficiente depende en gran medida de las condiciones de cultivo e inducción. Emplear *E. coli* como sistema de expresión presenta múltiples ventajas ya reportadas, su fácil crecimiento, la facilidad de manipular genéticamente y su bajo costo operacional (Z. X. Zhang *et al.*, 2022). La expresión a pequeña escala develó las condiciones óptimas de crecimiento, para la etapa de crecimiento fue necesario incrementar de forma rápida la densidad celular para alcanzar la fase logarítmica y posteriormente llevar a cabo la expresión de proteínas, sin embargo, el problema abordado en esta etapa fue encontrar un equilibrio entre el crecimiento celular óptimo y producción de proteínas evitando estrés metabólico en las células, además de retos como plegamiento de proteínas, agregados o la misma carga metabólica excesiva por una sobreexpresión de proteínas heterólogas (de Marco, 2025). Optimizar la inducción es vital en la producción de proteínas: seleccionar el agente inductor y su concentración. En sistemas basados en T7, utilizar IPTG induce la síntesis de proteínas; sin embargo, existen reportes de que utilizar concentraciones elevadas puede generar presión metabólica en las células bacterianas, lo que favorecería la formación de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, fue necesario determinar la concentración adecuada del inductor (1 M) (Mani *et al.*, 2024). La expresión de proteínas recombinantes puede generar estrés fisiológico y metabólico en las células y alterar propiedades fisiológicas como tamaño o incluso su metabolismo, es por lo que es imperante cuidar tanto las condiciones de cultivo como las de expresión.

Respecto al análisis electroforético, la aparición de la banda cercana a 17.0 kDa en las muestras inducidas representa evidencia de la expresión recombinante. Este valor coincide con el peso

molecular teórico esperado del constructo, compuesto por el híbrido LL-37_Renalexin y la proteína de fusión CusF3H⁺. Este resultado coincide directamente con lo reportado por los autores que originalmente diseñaron este péptido híbrido, quienes observaron en SDS-PAGE una banda esperada de 17–18 kDa tras la inducción en *E. coli* BL21(DE3) y SHuffle T7(DE3), confirmando la producción soluble del sistema híbrido (Narh *et al.*, 2024b).

La concordancia entre el peso molecular observado y el calculado es relevante, ya que en proteínas recombinantes pequeñas fusionadas suelen presentarse desviaciones aparentes por proteólisis, truncamientos o agregación parcial. En este caso, la banda detectada se mantuvo dentro del rango esperado (17 kDa), lo que sugiere que el marco de lectura se conservó adecuadamente y que no ocurrió degradación significativa durante la expresión. Esto es especialmente importante tratándose de péptidos antimicrobianos, ya que por su naturaleza catiónica frecuentemente son susceptibles a degradación intracelular o toxicidad para la célula hospedera. (Narh *et al.*, 2024b).

El escalamiento de un proceso representa una etapa crítica en la producción de proteínas recombinantes ya que las condiciones que nos proporcionaban resultados óptimos no siempre se traducen de forma literal en volúmenes mayores debido a las diferencias en la transferencia de oxígeno, la distribución de nutrientes o la acumulación de metabolitos secundarios; por esto, es necesario que al aumentar el volumen de producción, se conserven las condiciones que permitan conservar la viabilidad celular y la eficiencia del sistema de producción (Hussein *et al.*, 2021; Z. X. Zhang *et al.*, 2022). El oxígeno disuelto en cultivos de volúmenes mayores influye de forma directa en la productividad; específicamente, en *E. coli*, su demanda de O₂ aumenta debido a la producción de proteínas recombinantes y a algunos otros factores, como la biosíntesis de macromoléculas (Z. X. Zhang *et al.*, 2022). Existen estudios que muestran cómo una transferencia eficiente de O₂ favorece la expresión de proteínas (Rosano &

Ceccarelli, 2014). En cultivos de *E. coli* es común la acumulación de metabolitos secundarios derivados del metabolismo del carbono, como el acetato, cuya producción puede inhibir el crecimiento bacteriano y afectarlo negativamente. Este proceso ocurre cuando la velocidad de consumo de glucosa supera la capacidad de la cadena respiratoria, lo que provoca la desviación del metabolismo hacia la producción de metabolitos secundarios. Estudios recientes han confirmado que la acumulación de acetato no solo reduce la biomasa, sino que también disminuye la eficiencia en la expresión de proteínas recombinantes al generar estrés metabólico y alterar el balance energético celular (Li *et al.*, 2022; Millard *et al.*, 2021).

En este contexto, el escalamiento de la producción de proteínas recombinantes exige considerar los efectos citotóxicos sobre las células bacterianas. Escalar la producción a 1 litro de medio de cultivo nos permitió incrementar principalmente la biomasa disponible para la obtención de CusF3H+_LL-37_Renalexin para su posterior purificación, lo cual es consistente con lo reportado en sistemas recombinantes donde el aumento de volumen favorece la acumulación celular, pero no necesariamente se traduce de forma directa en un mayor rendimiento del producto (Z. X. Zhang *et al.*, 2022).

A partir de los resultados obtenidos, el perfil cromatográfico observado es consistente con el comportamiento típico reportado para purificaciones mediante cromatografía IMAC. En este sentido, el incremento inicial de la absorbancia durante la carga del lisado celular puede atribuirse principalmente al flujo de proteínas que no presentan afinidad por la resina, lo cual concuerda con lo descrito por Loughran *et al.* 2023, quienes señalan que en estrategias “carga – lavado - elución” las proteínas carentes de etiquetas polihistidínicas (His-tag) no establecen interacciones de coordinación con los iones metálicos (como Ni^{2+} o Co^{2+}), y por tanto se recuperan en el flujo inicial (Loughran *et al.*, 2023). Este comportamiento también ha sido

asociado con la baja frecuencia natural de residuos de histidina expuestos en proteínas endógenas, lo que favorece la selectividad de la técnica (Kano *et al.*, 2023).

Posteriormente, la disminución de la absorbancia observada durante la fase de lavado sugiere la eliminación progresiva de proteínas débilmente unidas o sin afinidad específica, lo cual es un indicador de que las condiciones de lavado fueron adecuadas para incrementar la pureza del sistema. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en estudios recientes, donde se establece que los lavados permiten remover proteínas unidas de manera inespecífica mediante interacciones débiles con la matriz, optimizando así la selectividad antes de la elución (Völzke *et al.*, 2023a). Kano *et al.* 2023 reportan que, tras esta etapa, la mayoría de las proteínas contaminantes han sido eliminadas, permaneciendo retenidas principalmente aquellas que presentan una interacción coordinada efectiva con los iones metálicos de la columna (Kano *et al.*, 2023).

Durante la etapa de elución, el buffer que contenía imidazol (200 mM) actúa como un competidor de los residuos de histidina de la etiqueta por los sitios de coordinación del metal en la resina. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito en la literatura reciente; por ejemplo, Bornhorst and Falke y estudios más recientes (2022–2024) coinciden en que concentraciones de imidazol entre 150–300 mM son efectivas para desplazar proteínas His-tag sin afectar significativamente su estructura. En este contexto, los picos de absorbancia observados durante la elución corresponden a la liberación del constructo que contiene CusF3H+_LL-37_Renalexin, previamente retenido en la columna, lo cual coincide con reportes donde la elución de proteínas recombinantes genera picos definidos bajo condiciones óptimas de competencia con imidazol (Bornhorst & Falke, 2000).

Utilizar etiquetas ricas en histidina es una estrategia útil en la purificación de péptidos con actividad antimicrobiana debido a su tamaño más pequeño, y gracias a ellos puede ser más complicado purificarlos por métodos convencionales (Roca-Pinilla *et al.*, 2022), añadir una

etiqueta facilita su purificación, pero también participa en mejorar la estabilidad del péptido durante su expresión y su recuperación por la alta susceptibilidad a degradación proteolítica o pérdidas durante las etapas de purificación que poseen (Völzke *et al.*, 2023).

Los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE al 15% evidencian una banda predominante alrededor de 17 kDa, correspondiente al constructo CusF3H⁺_LL-37_Renalexin, lo cual confirma la recuperación de la proteína de interés tras la purificación por IMAC. Este comportamiento es consistente con lo reportado en estudios recientes sobre purificación de proteínas recombinantes, donde la identificación de bandas específicas mediante SDS-PAGE sigue siendo una herramienta confiable para verificar la expresión y pureza de proteínas fusionadas. Por ejemplo, Roca-Pinilla *et al.* 2022 describen que los péptidos antimicrobianos expresados como proteínas de fusión presentan bandas bien definidas en geles de poliacrilamida, facilitando su identificación incluso cuando se encuentran en mezclas complejas, lo cual coincide con lo observado en este estudio (Roca-Pinilla *et al.*, 2022).

El análisis densitométrico reveló que la banda correspondiente al constructo representó aproximadamente 96.8% del total de proteína en el carril analizado, lo que indica un alto grado de pureza tras una sola etapa cromatográfica. En este contexto, Roca-Pinilla *et al.* (2022) señalan que la producción recombinante de péptidos de defensa del hospedero representa una alternativa viable frente a la síntesis química, aunque estos péptidos pueden presentar retos asociados con toxicidad hacia el hospedero, agregación o baja recuperación. Por ello, el uso de constructos de fusión y sistemas de purificación por afinidad resulta una estrategia pertinente para favorecer su recuperación. De manera similar, Leonhardt *et al.* 2023 reportan purezas cercanas al 90% tras una sola corrida cromatográfica (Leonhardt *et al.*, 2023). En comparación, el valor obtenido en este estudio (96.8%) supera en aproximadamente 6.8% el rango típico

reportado y en 6.8–11.8% los valores promedio (85–90%), lo que posiciona el sistema de purificación empleado como eficiente dentro de este contexto.

La elución mediante un gradiente que generó 40 fracciones permitió una adecuada separación de las proteínas retenidas en la columna, lo cual puede explicarse por el incremento en la resolución cromatográfica asociado a este tipo de estrategias. En sistemas de purificación por IMAC, el uso de gradientes de imidazol favorece la elución diferencial de proteínas en función de su afinidad por el metal, permitiendo aislar fracciones con mayor pureza en comparación con eluciones escalonadas (Loughran *et al.*, 2023). En este sentido, el número elevado de fracciones obtenido en este trabajo concuerda con lo reportado por Loughran *et al.* 2023, quienes describen que la elución gradual mejora la discriminación entre proteínas con afinidades similares, aunque puede implicar una mayor dilución del producto (Loughran *et al.*, 2023).

El uso de proteínas de fusión en la producción de péptidos antimicrobianos ha demostrado ser una estrategia clave para superar limitaciones inherentes a estos compuestos, como su bajo peso molecular, susceptibilidad a degradación proteolítica y toxicidad para la célula hospedera. En el presente trabajo, la fusión de LL-37_Renalexin a CusF3H⁺ favoreció su expresión y recuperación, lo cual es consistente con estudios recientes que reportan mejoras significativas en la estabilidad y solubilidad de péptidos antimicrobianos al emplear proteínas portadoras. Por ejemplo, en el estudio de Expression of the Antimicrobial Peptide SE-33-A2P se describe que la producción recombinante de péptidos tipo catelicidina en *E. coli* requiere estrategias que aumenten la estabilidad estructural para evitar degradación intracelular, destacando la necesidad de sistemas de expresión optimizados (Gasnov *et al.*, 2024).

En relación con la eficiencia de purificación obtenida, He et al. (2023) evaluaron la anexina A1 humana (hanA1) como una etiqueta N-terminal alternativa para la separación y purificación de

proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. En dicho estudio, los autores observaron que el incremento en la pureza de las proteínas recombinantes puede estar acompañado por una disminución en la recuperación total, particularmente cuando se combinan etapas de separación y purificación por afinidad. Este comportamiento permite contextualizar los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el cromatograma mostró un pico de elución de baja intensidad; sin embargo, el análisis por SDS-PAGE y densitometría evidenció una banda predominante alrededor de 17 kDa, correspondiente al constructo CusF3H⁺_LL-37_Renalexin (He *et al.*, 2023).

De manera complementaria, Lamer y Vederas (2023) reportaron que algunos péptidos expresados heterológamente en *E. coli* pueden presentar problemas de degradación, truncamiento o precipitación durante el aislamiento y purificación, lo que limita el rendimiento final del producto. Para resolverlo, los autores propusieron un sistema de fusión tipo “sandwich” His₆-SUMO-péptido-inteína-CBD-His₆, diseñado para proteger la secuencia peptídica y facilitar su recuperación mediante cromatografía de afinidad. En este sentido, aunque el sistema utilizado en el presente trabajo es diferente, ambos estudios respaldan que la purificación de péptidos recombinantes puede estar condicionada por la estabilidad del constructo, su solubilidad y su comportamiento durante el aislamiento. Por lo tanto, el bajo pico de elución observado no necesariamente indica una purificación deficiente, sino que puede reflejar una recuperación moderada de un producto altamente enriquecido, como lo sugiere la pureza relativa de 96.8% obtenida por densitometría (Lamer & Vederas, 2023).

La literatura actual coincide en que los rendimientos típicos de producción de AMP en sistemas recombinantes bacterianos suelen ubicarse en rangos relativamente bajos en comparación con proteínas convencionales. En general, se reportan valores que oscilan entre 1 y 30 mg/L en

sistemas no optimizados, lo cual refleja las limitaciones estructurales y funcionales de estos péptidos. Aunque existen reportes de rendimientos significativamente mayores, estos suelen estar asociados a estrategias avanzadas de optimización, como ingeniería metabólica o el uso de sistemas de fusión altamente especializados. Por ejemplo, estudios recientes han mostrado que el empleo de etiquetas como SUMO o SmbP puede mejorar considerablemente la solubilidad y estabilidad del péptido (Gomez-Lugo *et al.*, 2024), mientras que procesos intensificados pueden incluso superar los 100 mg/L, aunque bajo condiciones altamente controladas (Lappöhn *et al.*, 2023). Bajo este contexto, el rendimiento obtenido en este estudio (4.442 mg/L) se sitúa dentro del rango esperado, aunque en el extremo inferior, lo cual es consistente con las limitaciones inherentes a este tipo de biomoléculas.

Un factor clave que puede contribuir a este comportamiento es la naturaleza híbrida del péptido LL-37_Renalexin. Aunque la hibridación se emplea para potenciar la actividad antimicrobiana, también puede introducir cambios estructurales que afectan negativamente la eficiencia de expresión. Se ha demostrado que modificaciones en la secuencia primaria pueden alterar propiedades como la carga, hidrofobicidad y plegamiento, incrementando la susceptibilidad a degradación proteolítica o afectando la interacción con la maquinaria celular, lo que repercute directamente en el rendimiento final (Roshanak *et al.*, 2023).

En conjunto, el rendimiento obtenido en este trabajo no debe interpretarse como una limitación del sistema, sino como un reflejo de los desafíos en la producción de péptidos antimicrobianos recombinantes. La evidencia reciente respalda que estos sistemas requieren un balance entre estabilidad, toxicidad y eficiencia de expresión, y que incluso rendimientos moderados pueden ser adecuados para aplicaciones experimentales. Esto resalta la importancia de estrategias integrales de diseño y optimización para mejorar la producción sin comprometer la funcionalidad del péptido.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana muestran que el constructo CusF3H+_LL-37_Renalexin presenta actividad dependiente de la concentración, con mayor eficacia frente a *P. aeruginosa* que frente a *A. baumannii*. En el caso de *P. aeruginosa* la inhibición casi completa observada a 21 μ M (6% de crecimiento) es consistente con lo reportado para péptidos derivados de LL-37, donde se han descrito CMI en rangos de 8 a 32 μ M. Por ejemplo, Song *et al.* 2023 reportaron que LL-37 y su derivado RP557 presentan actividad frente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos con valores de CMI dentro de este rango, confirmando su eficacia incluso en cepas resistentes (Song *et al.*, 2023) De forma similar, Ridyard *et al.* 2023 describieron que LL-37 presenta actividad significativa frente a *P. aeruginosa*, incluyendo una reducción importante del crecimiento bacteriano en concentraciones similares (10 – 32 μ M), lo cual coincide con la inhibición observada en este trabajo (94%) (Ridyard *et al.*, 2023)

En contraste, la menor susceptibilidad observada en *A. baumannii* (20% de crecimiento) también concuerda con estudios publicados recientemente. White *et al.* 2022 reportaron que derivados estructuralmente modificados de LL-37 presentan actividad antimicrobiana variable dependiendo de la bacteria, observando una menor susceptibilidad en algunas Gram negativas, posiblemente debido a adaptaciones de membrana (White *et al.*, 2022)

La diferencia en susceptibilidad entre ambas bacterias ha sido documentada y es atribuible a variaciones en la composición de la membrana. En este sentido, múltiples estudios han confirmado que LL-37 actúa mediante interacción electrostática con la membrana bacteriana, provocando su desestabilización y lisis celular, siendo este mecanismo dependiente de la carga superficial de la bacteria (Geitani *et al.*, 2022; White *et al.*, 2022). Del mismo modo, estas diferencias en susceptibilidad pueden explicarse no solo por la composición de la membrana, sino también por los mecanismos de resistencia específicos de cada bacteria. En *P. aeruginosa*, los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos incluyen la pérdida o mutación de

la porina OprD, la sobreexpresión de bombas de eflujo y la producción de β -lactamasas. Estudios recientes han demostrado que la pérdida de OprD puede reducir hasta 100 veces la entrada de antibióticos, mientras que la sobreexpresión de bombas de eflujo incrementa significativamente los valores de CMI de carbapenémicos (Guo *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2025). Por su parte, en *A. baumannii*, la resistencia está principalmente asociada a la producción de β -lactamasas tipo OXA-23, OXA-24 y OXA-58, así como a la disminución de la permeabilidad de membrana, la presencia de bombas de eflujo y modificaciones en proteínas de membrana. Estas β -lactamasas son responsables de la mayoría de los casos de resistencia a carbapenémicos y pueden conferir niveles elevados de resistencia, como lo reportan estudios recientes (de Souza *et al.*, 2025; Stoian *et al.*, 2025).

Sin embargo, a pesar de estos mecanismos de resistencia, el constructo evaluado mantiene una actividad antimicrobiana significativa, lo cual puede explicarse por su mecanismo de acción. A diferencia de los antibióticos β -lactámicos, que actúan sobre enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular, los péptidos derivados de LL-37 actúan directamente sobre la membrana bacteriana mediante interacciones electrostáticas que provocan su desestabilización y lisis celular (Yang *et al.*, 2024). Por esta razón, la pérdida de porinas como OprD no afecta la acción del péptido, y las β -lactamasas no son capaces de degradarlo, lo que explica por qué los péptidos antimicrobianos pueden conservar su actividad frente a bacterias resistentes a carbapenémicos. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la literatura reciente, donde se describe que los AMP ejercen su actividad mediante interacción directa con membranas bacterianas, alterando su permeabilidad y provocando disrupción estructural independiente de los mecanismos clásicos de resistencia antibiótica (Talapko *et al.*, 2022).

Es importante considerar que la actividad observada del constructo CusF3H⁺_LL-37_Renalexin también es influenciada por su naturaleza híbrida, ya que la fusión de secuencias

derivadas de diferentes péptidos antimicrobianos ha demostrado mejorar propiedades como la afinidad por membrana, la estabilidad estructural y la potencia antimicrobiana. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la modificación y combinación de dominios funcionales en péptidos derivados de LL-37 puede incrementar significativamente su actividad antimicrobiana en comparación con los péptidos individuales. Por ejemplo, Narh *et al.* 2024 reportaron que el péptido híbrido LL-37_Renalexin presenta valores de CMI menores que sus contrapartes individuales, lo que indica un efecto sinérgico derivado de la hibridación (Narh *et al.*, 2024b), y de forma similar White *et al.* 2022 demostraron que péptidos derivados estructuralmente de LL-37, como variantes ciclizadas, presentan una mayor estabilidad y actividad antimicrobiana debido a una mejor interacción con la membrana bacteriana (White *et al.*, 2022). Dicho esto, la combinación de dominios funcionales de LL-37 y Renalexin en el constructo evaluado favorezca una interacción más eficiente con la membrana bacteriana, lo que podría explicar la inhibición casi completa observada en *P. aeruginosa* a 21 μ M (6 % de crecimiento), en concordancia con lo reportado para péptidos híbridos que muestran mayor potencia que sus formas nativas. Sin embargo, la menor eficacia frente a *A. baumannii* sugiere que, aunque la hibridación puede potenciar la actividad antimicrobiana, ésta sigue estando limitada por factores intrínsecos de la envoltura celular de cada especie, como modificaciones en el lipopolisacárido y mecanismos de resistencia asociados, lo cual ha sido ampliamente descrito para péptidos derivados de LL-37 (Memariani & Memariani, 2023).

Y, a pesar de que la hibridación ha demostrado mejorar las propiedades antimicrobianas de los AMP, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la actividad antimicrobiana del constructo LL-37_Renalexin puede estar parcialmente condicionada por la presencia de la etiqueta de fusión, lo cual coincide con lo reportado recientemente en la literatura. Diversos autores han señalado que la adición de etiquetas, como His-tag, puede modificar tanto la

conformación estructural como la eficiencia biológica de los péptidos antimicrobianos. En este caso particular, el incremento en el tamaño del constructo (CusF3H+ de 9.9 kDa frente a LL-37_Renalexin de 7.0 kDa) puede generar impedimentos estéricos que interfieren con la interacción del péptido con la membrana bacteriana, además de afectar la adopción de su estructura α -helicoidal, la cual es crucial para su mecanismo de acción (Narh *et al.*, 2024a; Pavelka *et al.*, 2023).

Estudios recientes respaldan esta observación, un estudio publicado por Abbasi en 2023 sobre la expresión del péptido híbrido LL-37/Hbd-129 unido a la etiqueta His-tag, mostró que el péptido recombinante presentaba actividad antimicrobiana, pero menor que el péptido libre, reportando valores de CMI entre 16 y 32 μ M, mientras que los péptidos individuales presentaban CMI entre 50-100 μ M, sin embargo, cuando el híbrido es expresado con la etiqueta los valores de CMI pueden incrementar entre 2 y 4 veces por la interferencia estructural de la etiqueta (Abbasi *et al.*, 2023)

El estudio de Narh *et al* 2024 también reportó que la remoción de la etiqueta incrementa la actividad de los AMP; alcanzaron una reducción de hasta un 85% de células viables, así como valores de CMI más bajos (Narh *et al.*, 2024b). Por ende, la actividad antimicrobiana reportada en este trabajo es posible que represente una subestimación de la actividad potencial real.

Por otro lado, los resultados experimentales obtenidos en este estudio evidencian un comportamiento claramente dosis-dependiente, en el cual concentraciones elevadas del péptido inducen una inhibición significativa del crecimiento bacteriano, mientras que a concentraciones más bajas solo se observa un efecto parcial. Este patrón ha sido ampliamente documentado para péptidos antimicrobianos como LL-37 y sus derivados. En particular, se ha demostrado que el incremento en la concentración del péptido se asocia con una mayor interacción con los fosfolípidos de la membrana bacteriana, promoviendo su desestabilización y eventual lisis celular (Zarei-Mehrvarz *et al.*, 2023) De manera consistente, estudios más recientes han

confirmado que este efecto dosis-dependiente se traduce en una reducción progresiva de la viabilidad bacteriana, como se ha observado en *A. baumannii*, donde el tratamiento con LL-37 produce una disminución significativa de la carga bacteriana conforme aumenta la concentración del péptido (Zarei-Mehrvarz *et al.*, 2023)

Este comportamiento no se limita a un solo tipo de microorganismo, sino que se ha reportado en una amplia variedad de especies, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas e incluso hongos. En este sentido, estudios recientes han demostrado que péptidos derivados de LL-37 presentan actividad antifúngica contra *Candida spp.*, donde la inhibición del crecimiento incrementa progresivamente con la concentración del péptido (Pinilla *et al.*, 2022). o en el caso de *Candida auris*, donde de forma similar LL-37 induce daño celular mediante mecanismos asociados a la disrupción de la membrana y la generación de estrés intracelular, reforzando la idea de un mecanismo de acción conservado basado en la interacción directa con la membrana (Rather *et al.*, 2022).

El efecto del híbrido CusF3H+_LL-37_Renalexin sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el método de recuento en placa tras 3 horas de incubación a una concentración de 21 μ M. Los resultados de este estudio reportan un porcentaje de actividad superior al 45% de ambas cepas resistentes en comparación con el control sin tratamiento, observándose una diferencia estadísticamente significativa al evaluarlo mediante un *t-test*. Este nivel de inhibición, aunque no corresponde a una erradicación total de la población bacteriana, es consistente con el comportamiento característico de los AMP, particularmente aquellos derivados de LL-37, cuando se evalúan en condiciones cercanas a la CMI y en tiempos de exposición cortos.(Borcan *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2024).

La relevancia de una actividad superior al 45% es significativa desde el punto de vista biológico. Aunque no representa una eliminación total de la población bacteriana, estudios recientes han demostrado que reducciones parciales de la carga bacteriana pueden ser

suficientes para potenciar la eficacia de otros agentes antimicrobianos o del sistema inmune. Por ejemplo, se ha observado que LL-37 puede actuar de manera sinérgica con antibióticos como polimixina B, incrementando significativamente la reducción de células viables en comparación con tratamientos individuales (Ridyard *et al.*, 2023). Esto sugiere que incluso una inhibición parcial, como la observada en este estudio, puede tener un impacto terapéutico relevante cuando se considera en un contexto fisiológico o combinado.

En los estudios de actividad antimicrobiana es común utilizar el ensayo de microdilución en microplaca para determinar CMI, sin embargo, este método únicamente permite evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano, más no la reducción de la viabilidad celular. La CMI se define como la concentración mínima de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del microorganismo después de la incubación, mientras que la concentración mínima bactericida (MBC) corresponde a la concentración necesaria para reducir al menos el 99.9 % de las células viables respecto al inóculo inicial (Ishak *et al.*, 2024a; Makvandi *et al.*, 2018). Esto explica por qué un compuesto puede mostrar actividad en microplaca (sin crecimiento visible) pero aún presentar crecimiento en el recuento en placa: las bacterias pueden permanecer viables, pero sin multiplicarse, lo que corresponde a un efecto bacteriostático. Cuando estas células se siembran en agar sin el antimicrobiano, pueden volver a crecer y formar colonias, lo que indica que la CMI no necesariamente implica muerte celular (Hossain *et al.*, 2022). La literatura reciente indica que la clasificación entre bacteriostático y bactericida no depende únicamente del método, sino también de factores como la concentración del antimicrobiano, el tiempo de exposición, el tamaño del inóculo y el tipo de bacteria. Esto es especialmente importante en péptidos antimicrobianos, ya que muchos presentan actividad dependiente de concentración y tiempo (Ishak *et al.*, 2024b).

Trabajos de Cafaro *et al.* 2023 reportaron que LL-37 a concentraciones cercanas a la CMI obtenida (12.5-25 μM) produce reducciones significativas en la viabilidad bacteriana, aunque no siempre se alcanza la eliminación completa de la población celular (Cafaro *et al.*, 2023), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio, en donde se observan reducciones mayores al 45%, lo cual sugiere que el péptido afecta la integridad celular, aunque algunas células pueden sobrevivir al tratamiento. Narh *et al* 2024 reportan en su estudio una reducción superior al 85% de UFC a una concentración similar a la CMI, lo que demuestra que el péptido híbrido presenta mayor eficacia que un péptido individual debido a la combinación de los dominios antimicrobianos de ambos péptidos que incrementan la interacción con la membrana celular. (Narh *et al.*, 2024c)

Comportamientos similares se observan en estudios sobre péptidos derivados de LL-37 frente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, que han demostrado una reducción significativa de las colonias viables tras la exposición al péptido, especialmente a concentraciones cercanas a la CMI, lo que evidencia que los péptidos afectan la integridad celular y disminuyen la capacidad de la bacteria para formar colonias viables (Song *et al.*, 2023).

Estos resultados, junto con el ensayo de dilución en microplaca, sugieren que, a una concentración de 21 μM , no solo inhibe el crecimiento bacteriano, sino que también reduce significativamente el número de células viables capaces de formar colonias. Específicamente para péptidos antimicrobianos, se ha observado que concentraciones sub-CMI pueden eliminar solo una parte de la población bacteriana, mientras que células que sobrevivieron continúan creciendo una vez que la concentración efectiva del péptido disminuye (Narh *et al.*, 2024b).

Existen diversas razones por las que se observan estos comportamientos, los péptidos al actuar sobre la membrana celular, su efecto dependerá de alcanzar una concentración crítica; si la

concentración no es suficiente o si el tiempo de exposición es corto, solo una parte de la población se ve afectada (Neshani *et al.*, 2025).

Finalmente, porcentajes de actividad mayores al 45 % indican que el péptido presenta actividad biológica sobre las cepas resistentes, afectando su viabilidad celular, y estos resultados son consistentes con lo reportado para péptidos derivados de LL-37 y péptidos híbridos, donde se observan reducciones parciales a concentraciones cercanas a la CMI y reducciones mayores conforme aumenta la concentración o el tiempo de exposición (Cafaro *et al.*, 2023; Narh *et al.*, 2024b).

CAPÍTULO 7

7. Conclusiones

- Usar una proteína de fusión como etiqueta de afinidad permitió la purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).
- Las fracciones purificadas se evaluaron mediante SDS-PAGE, observándose una banda característica con el peso esperado (17 kDa).
- La dilución en microplaca mostró actividad bacteriostática del péptido a una concentración de 21 μ M.
- Se observó una mayor inhibición frente a *P. aeruginosa* que frente a *A. baumannii*, lo que sugiere diferencias en la estructura celular de cada bacteria, mecanismos de resistencia y en cómo estas pueden interferir con la eficacia del péptido.
- El recuento en placa demostró una actividad mayor al 45% en ambas bacterias tras 3 horas de exposición, con una diferencia estadísticamente significativa respecto al control.
- La presencia de la etiqueta CusF3H⁺ pudo haber influido parcialmente en la actividad antimicrobiana del péptido, ya que podría generar efectos estéricos o alterar su conformación, lo que disminuiría la interacción con la membrana celular.
- Los resultados obtenidos demuestran que el péptido híbrido CusF3H⁺_LL-37_Renalexin presenta actividad antimicrobiana potencial frente a bacterias patógenas resistentes.

CAPÍTULO 8

8. Perspectivas a futuro

- Estudiar el mecanismo de acción a detalle mediante técnicas como la microscopía electrónica, los estudios de interacción con LPS o los ensayos de permeabilidad.
- Evaluar la toxicidad en células eucariotas para determinar el índice terapéutico y su posible aplicación como antimicrobiano seguro.
- Desarrollar sistemas de liberación y incorporar el péptido en sistemas de liberación, como nanopartículas o hidrogeles, para mejorar su estabilidad.

CAPÍTULO 9

9. Disposición de residuos generados

Tabla 3. Tabla de disposición de los residuos generados en el laboratorio.

RESIDUO	COLECTOR
Solución buffer TAE (tris glicina SDS)	A: Soluciones salinas de pH 6-8, soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y bases inorgánicas
Solución buffer TGS (tris acetato EDTA)	
Buffer de equilibrio	
Buffer de elución	
Tris-HCl, EDTA	
CaCl ₂ , NaCl, MgCl ₂ , Kac, glicerol	G: Combinaciones orgánicas sólidas
Agarosa	
Poliacrilamida	
Azul de coomassie	Colorante y Lugol
Cristal violeta	
Medios de cultivo	Esterilizados y basura normal

CAPÍTULO 10

10. Referencias

- Dahdouh, E., Gómez-Gil, R., Pacho, S., Mingorance, J., Daoud, Z., & Suárez, M. (2017). Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. PLoS ONE, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176824>
- Gan, B. H., Gaynord, J., Rowe, S. M., Deingruber, T., & Spring, D. R. (2021). The multifaceted nature of antimicrobial peptides: Current synthetic chemistry approaches and future directions. In Chemical Society Reviews (Vol. 50, Issue 13, pp. 7820–7880). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00729c>
- González García, M., San, J., Galán, J., Fidel, I. I., Morales, E., Iii, V., & Otero González, A. J. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. Revista Cubana de Medicina Tropical, 69(2), 01–13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. (n.d.). Retrieved October 8, 2024, from <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (n.d.). Retrieved October 8, 2024, from <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Lirola Andreu, L., Ávila Jiménez, Á. F., Fernández Mariscal, M. A., Reinoso Espín, Á., & Martínez Martínez, S. (2022). La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/75043>

- Lorenzon, E. N., Cespedes, G. F., Vicente, E. F., Nogueira, L. G., Bauab, T. M., Castro, M. S., & Cilli, E. M. (2012). Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3004–3010. <https://doi.org/10.1128/AAC.06262-11>
- Lorenzon, E. N., Piccoli, J. P., Santos-Filho, N. A., & Cilli, E. M. (2019). Dimerization of Antimicrobial Peptides: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Peptide Activity. *Protein & Peptide Letters*, 26(2), 98–107. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190102125304>
- Montfort-Gardeazabal, J. M., Balderas-Renteria, I., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2021). Expression and purification of the antimicrobial peptide Bin1b in *Escherichia coli* tagged with the fusion proteins CusF3H⁺ and SmbP. *Protein Expression and Purification*, 178, 105784. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2020.105784>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Narh, J. K., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2024). LL-37_Renalexin hybrid peptide exhibits antimicrobial activity at lower MICs than its counterpart single peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12887-5>
- Neshani, A., Zare, H., Akbari Eidgahi, M. R., Kamali Kakhki, R., Safdari, H., Khaledi, A., & Ghazvini, K. (2019). LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens. *Gene Reports*, 17, 100519. <https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2019.100519>

- Olascoaga Del Ángel, K., Sánchez Evangelista, G., Carmona Navarrete, I., Galicia Sanchez, M. del C., Gomez Luna, A., Islas Arrollo, S. J., & Castaneda Sanchez, J. I. (2018). gm186h. Gaceta Médica de México.
- Peck, K. R., Kim, M. J., Choi, J. Y., Kim, H. S., Kang, C. I., Cho, Y. K., Park, D. W., Lee, H. J., Lee, M. S., & Ko, K. S. (2012). In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 61(3), 353–360. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036939-0>
- Resistencia a los antimicrobianos. (n.d.). Retrieved October 8, 2024, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Vargas-Cortez, T., Morones-Ramírez, J. R., Balderas-Rentería, I., & Zarate, X. (2016). Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Protein Expression and Purification*, 118, 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2015.10.009>
- Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2017). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expression and Purification*, 132, 44–49. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2017.01.006>
- Villalobo Polo, E. (2018). Alexander Fleming: 70 años de su visita a España. *SEM@foro*, ISSN-e 2254-4399, No. 66, 2018, Págs. 10-15, 66, 10–15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7315189>
- Abavisani, M., Bostanghadiri, N., Ghahramanpour, H., Kodori, M., Akrami, F., Fathizadeh, H., Hashemi, A., & Rastegari-Pouyani, M. (2023). Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: a Focus on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2). <https://doi.org/10.1093/LAMBIO/OVAD023>

- Abbasi, M., Behmard, E., Yousefi, M. H., Shekarforoush, S. S., & Mahmoodi, S. (2023). Expression, purification and investigation of antibacterial activity of a novel hybrid peptide LL37/hBD-129 by applied comprehensive computational and experimental approaches. *Archives of Microbiology*, 205(5). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03529-5>
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jornvall, H., Wigzell, H., & Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9), 3086–3093. <https://doi.org/10.1182/blood.v96.9.3086>
- Agrawal, S., Padmaswari, M. H., Stokes, A. L., Maxenberger, D., Reese, M., Khalil, A., & Nelson, C. E. (2024). Optimizing Recombinant Cas9 Expression: Insights from *E. coli* BL21(DE3) Strains for Enhanced Protein Purification and Genome Editing. *Biomedicines* 2024, Vol. 12, 12(6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061226>
- Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2(7), 100081. <https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081>
- Ajish, C., Yang, S., Kumar, S. D., Kim, E. Y., Min, H. J., Lee, C. W., Shin, S. H., & Shin, S. Y. (2022). A novel hybrid peptide composed of LfcinB6 and KR-12-a4 with enhanced antimicrobial, anti-inflammatory and anti-biofilm activities. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 4365-. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08247-4>
- Akbari, A., Talaei, M., Mir-Derikvand, M., Dad, N., Modiri, S., Saadati, F., Noorbakhsh, N., Zahiri, H. S., Vali, H., & Noghabi, K. A. (2025). Heterologous expression and optimization of the antimicrobial peptide acidocin 4356 in *Komagataella phaffii* to target *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2025 109:1, 109(1), 231-. <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13584-1>

- Borcan, A. M., Rotaru, E., Caravia, L. G., Filipescu, M. C., & Simoiu, M. (2025). Trends in Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from Bloodstream Infections: An Eight-Year Study in a Romanian Tertiary Hospital. *Pharmaceuticals* 2025, Vol. 18, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ph18070948>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)
- Cafaro, V., Bosso, A., Di Nardo, I., D’Amato, A., Izzo, I., De Riccardis, F., Siepi, M., Culurciello, R., D’Urzo, N., Chiarot, E., Torre, A., Pizzo, E., Merola, M., & Notomista, E. (2023). The Antimicrobial, Antibiofilm and Anti-Inflammatory Activities of P13#1, a Cathelicidin-like Achiral Peptoid. *Pharmaceuticals* 2023, Vol. 16, 16(10). <https://doi.org/10.3390/ph16101386>
- Casal, M. del M., Rodriguez-Lopez, F., Causse, M., & Casal, M. (2012). *casal*. *Quimioter*, 25, 37–41.
- Chen, N., & Jiang, C. (2023). Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>
- de Marco, A. (2025). Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>
- de Souza, J., D’Espindula, H. R. S., Ribeiro, I. de F., Gonçalves, G. A., Pillonetto, M., & Faoro, H. (2025). Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms, Therapeutics, and Innovations. *Microorganisms* 2025, Vol. 13, 13(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071501>
- Endale, H., Mathewos, M., & Abdeta, D. (2023). Potential Causes of Spread of Antimicrobial Resistance and Preventive Measures in One Health Perspective-A Review. *Infection and Drug Resistance*, 16, 7515–7545. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428837>
- Garvey, M. (2023). Antimicrobial Peptides Demonstrate Activity against Resistant Bacterial Pathogens. *Infectious Disease Reports*, 15(4), 454–469. <https://doi.org/10.3390/idr15040046>

- Gasarov, V., Vorotelyak, E., & Vasiliev, A. (2024). Expression of the Antimicrobial Peptide SE-33-A2P, a Modified Analog of Cathelicidin, and an Analysis of Its Properties. *Antibiotics* 2024, Vol. 13, 13(2). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13020190>
- Geitani, R., Moubareck, C. A., Costes, F., Marti, L., Dupuis, G., Sarkis, D. K., & Touqui, L. (2022). Bactericidal effects and stability of LL-37 and CAMA in the presence of human lung epithelial cells. *Microbes and Infection*, 24(3). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104928>
- Gibisch, M., Müller, M., Tauer, C., Albrecht, B., Hahn, R., Cserjan-Puschmann, M., & Striedner, G. (2024). A production platform for disulfide-bonded peptides in the periplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2024 23:1, 23(1), 166-. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02446-6>
- Gomez-Lugo, J. J., Casillas-Vega, N. G., Gomez-Loredo, A., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2024). High-Yield Expression and Purification of Scygonadin, an Antimicrobial Peptide, Using the Small Metal-Binding Protein SmbP. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, 12(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12020278>
- Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., & Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry*, 238(2), 325–332. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0325z.x>
- Guo, Y., Hao, Y., Huang, M., Sun, Y., Tao, Z., Liu, Y., Huang, S., Liu, P., & Wei, D. (2025). Whole-genome sequencing reveals resistance mechanisms and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *BMC Microbiology* 2025 25:1, 25(1), 679-. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04293-w>
- Guryanova, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2022). Immunomodulatory and Allergenic Properties of Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052499>

- Hartwell, J. P., Blackwood, C. M., Eastman, B. R., & Fairchild, O. K. (2024). Systematic comparison of recombinant protein expression systems: Optimization strategies for yield and quality. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(6), 91–95. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i6ba.7381>
- He, X., Zhang, S., Dang, D., Lin, T., Ge, Y., Chen, X., & Fan, J. (2023). Detection of human annexin A1 as the novel N-terminal tag for separation and purification handle. *Microbial Cell Factories* 2023 22:1, 22(1), 2-. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-02005-X>
- Hossain, F., Billah, M. M., & Yamazaki, M. (2022). Single-Cell Analysis of the Antimicrobial and Bactericidal Activities of the Antimicrobial Peptide Magainin 2. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e00114-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00114-22>
- Hosseini, M., Hosseini, F., Amirmozafari, N., Abbas, &, & Sepahy, A. (2025). In vitro assessment of an antimicrobial peptide against *Acinetobacter baumannii* persister cells. *Scientific Reports* 2025 16:1, 16(1), 3226-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33137-w>
- Hu, M., & Chua, S. L. (2025). Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Current Challenges and Emerging Alternative Therapies. *Microorganisms* 2025, Vol. 13, 13(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040913>
- Huertas, T., Millán, D., Fonseca-Benítez, A. V., & Guevara-Pulido, J. (2025). Structure-based design of an antibacterial peptide from the Myotoxin II sequence, evaluating its effectiveness against Gram-negative bacteria and its safety. *Scientific Reports* 2025 15:1, 15(1), 24350-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08397-1>
- Hussein, A., Gameil, M., Yusof, F., Azmi, A. S., Illi, N., & Puad, M. (2021). PROCESS SCALE-UP CRITERIA IN PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN *E. COLI*: A SYSTEMATIC REVIEW. *Chemical and Natural Resources Engineering Journal* (Formally Known as Biological

and Natural Resources Engineering Journal), 5(2), 37–61.
<https://doi.org/10.31436/CNREJ.V5I2.60>

Ishak, A., Mazonakis, N., Spornovasilis, N., Akinosoglou, K., & Tsioutis, C. (2024a). Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>

Ishak, A., Mazonakis, N., Spornovasilis, N., Akinosoglou, K., & Tsioutis, C. (2024b). Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>

Kanoh, S., Shiraki, K., Wada, M., Tanaka, T., Kitamura, M., Kato, K., & Hirano, A. (2023). Chromatographic purification of histidine-tagged proteins using zirconia particles modified with phosphate groups. *Journal of Chromatography A*, 1703, 464112.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2023.464112>

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 2018, Vol. 8, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

Lamer, T., & Vederas, J. C. (2023). Simplified cloning and isolation of peptides from “sandwiched” SUMO-peptide-intein fusion proteins. *BMC Biotechnology* 2023 23:1, 23(1), 11-.
<https://doi.org/10.1186/S12896-023-00779-5>

Lappöhn, C. A., Oestreich, A. M., Stei, R., Weber, L. G., Maerz, L., & Wolff, M. W. (2023). Process intensification for the production of a C-tagged antimicrobial peptide in *Escherichia coli* – First steps toward a platform technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 136(5), 358–365. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2023.09.003>

- Leonhardt, F., Gennari, A., Paludo, G. B., Schmitz, C., da Silveira, F. X., Moura, D. C. D. A., Renard, G., Volpato, G., & Volken de Souza, C. F. (2023). A systematic review about affinity tags for one-step purification and immobilization of recombinant proteins: integrated bioprocesses aiming both economic and environmental sustainability. *3 Biotech*, 13(6), 186. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03616-W>
- Li, Z., Nees, M., Bettenbrock, K., & Rinas, U. (2022). Is energy excess the initial trigger of carbon overflow metabolism? Transcriptional network response of carbon-limited *Escherichia coli* to transient carbon excess. *Microbial Cell Factories* 2022 21:1, 21(1), 67-. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01787-4>
- Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2023). Poly-Histidine-Tagged Protein Purification Using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2699, 193–223. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_11
- Makvandi, P., Jamaledin, R., Jabbari, M., Nikfarjam, N., & Borzacchiello, A. (2018). Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. *Dental Materials*, 34(6), 851–867. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.014>
- Mani, S., Arab, B., Akbari, V., & Chou, C. P. (2024). Integrated bioprocessing and genetic strategies to enhance soluble expression of anti-HER2 immunotoxin in *E. coli*. *AMB Express* 2024 14:1, 14(1), 107-. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01765-6>
- Memariani, H., & Memariani, M. (2023). Antibiofilm properties of cathelicidin LL-37: an in-depth review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2023 39:4, 39(4), 99-. <https://doi.org/10.1007/S11274-023-03545-Z>
- Millard, P., Enjalbert, B., Uttenweiler-Joseph, S., Portais, J. C., & Létisse, F. (2021). Control and regulation of acetate overflow in *Escherichia coli*. *ELife*, 10, e63661. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63661>

- Mohite, Dr. A., Shrivastava, D., Pawar, Dr. J. R., Bharti, Dr. N., Parveen, F., & Vikram, V. (2026). Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*: Optimization Strategies. *Vascular and Endovascular Review*, 9(1), 15–30. <https://verjournal.com/index.php/ver/article/view/647>
- Mondal, A. H., Khare, K., Saxena, P., Debnath, P., Mukhopadhyay, K., & Yadav, D. (2024). A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. *Microorganisms*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12040772>
- Narh, J. K., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2024a). LL-37_Renalexin hybrid peptide exhibits antimicrobial activity at lower MICs than its counterpart single peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2024 108:1, 108(1), 126-. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12887-5>
- Narh, J. K., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2024b). LL-37_Renalexin hybrid peptide exhibits antimicrobial activity at lower MICs than its counterpart single peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12887-5>,
- Narh, J. K., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2024c). LL-37_Renalexin hybrid peptide exhibits antimicrobial activity at lower MICs than its counterpart single peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 126. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12887-5>
- Neshani, A., Zare, H., Ghiasi, N. S., Karimi, M. A., & Hosseini Bafghi, M. (2025). Decoding LL-37: Structure and antimicrobial mechanisms against microbial threats. *Infection, Genetics and Evolution*, 136(9), 105853. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2025.105853>
- Pavelka, A., Vacek, L., Norek, A., Kobzová, Š., & Janda, L. (2023). Recombinant production of human antimicrobial peptide LL- 37 and its secondary structure. *Biologia* 2023 79:1, 79(1), 263–273. <https://doi.org/10.1007/S11756-023-01539-8>
- Pinilla, G., Coronado, Y. T., Chaves, G., Muñoz, L., Navarrete, J., Salazar, L. M., Taborda, C. P., & Muñoz, J. E. (2022). In Vitro Antifungal Activity of LL-37 Analogue Peptides against *Candida* spp. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, 8(11). <https://doi.org/10.3390/JOF8111173>

- Pouresmaeil, M., & Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Archives of Microbiology*, 205(5), 212. <https://doi.org/10.1007/S00203-023-03541-9>
- Rather, I. A., Sabir, J. S. M., Asseri, A. H., & Ali, S. (2022). Antifungal Activity of Human Cathelicidin LL-37, a Membrane Disrupting Peptide, by Triggering Oxidative Stress and Cell Cycle Arrest in *Candida auris*. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, 8(2). <https://doi.org/10.3390/JOF8020204>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Ridyard, K. E., Elsayy, M., Matrasingh, D., Klein, D., Strehmel, J., Beaulieu, C., Wong, A., & Overhage, J. (2023). Synergy between Human Peptide LL-37 and Polymyxin B against Planktonic and Biofilm Cells of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, 12(2). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020389>
- Roca-Pinilla, R., Lisowski, L., Arís, A., & Garcia-Fruitós, E. (2022). The future of recombinant host defense peptides. *Microbial Cell Factories* 2022 21:1, 21(1), 267-. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01991-2>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Roshanak, S., Yarabbi, H., Shahidi, F., Tabatabaei Yazdi, F., Movaffagh, J., & Javadmanesh, A. (2023). Effects of adding poly-histidine tag on stability, antimicrobial activity and safety of recombinant buforin I expressed in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 5508-. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32782-3>

- Ruiz-Aragón, J., Del Prado-Montoro, C., Martínez Rubio, C., García-Martín, S., Freyre-Carrillo, C., & Antonio Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Antimicrobianos. www.revinf.cl
- Sandín, D., Valle, J., Chaves-Arquero, B., Prats-Ejarque, G., Larrosa, M. N., González-López, J. J., Jiménez, M. Á., Boix, E., Andreu, D., & Torrent, M. (2021). Rationally Modified Antimicrobial Peptides from the N-Terminal Domain of Human RNase 3 Show Exceptional Serum Stability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(15), 11472–11482. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00795>
- Shi, J., Mao, X., Sun, F., Cheng, J., Shao, L., Shan, X., & Zhu, Y. (2025). Epidemiological characteristics and antimicrobial resistance of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in ICU wards. *Microbiology Spectrum*, 13(4), e02619-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02619-24>
- Song, Y.-Q., Kyung, S. M., Kim, S., Kim, G., Lee, S. Y., & Yoo, H. S. (2023). Effects of synthetic peptide RP557 and its origin, LL-37, on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Spectrum*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00430-23>
- Stoian, I. A., Maftai, B. B., Florea, C.-E., Rotaru, A., Costin, C. A., Pasare, M. A., Dabija, R. C., & Manciu, C. (2025). Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Resistance Mechanisms, Emerging Therapies, and Prevention—A Narrative Review. *Antibiotics* 2026, Vol. 15, 15(1), 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics15010002>
- Talapko, J., Meštrović, T., Juzbašić, M., Tomas, M., Erić, S., Horvat Aleksijević, L., Bekić, S., Schwarz, D., Matić, S., Neuberg, M., & Škrlec, I. (2022). Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, 11(10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11101417>
- Travé-Asensio, S., Gómez, O., Carratalá, J. V., Robles, C., Fàbregas, F., López-Cano, A., Rodríguez, X. R., Ratera, I., Arís, A., & Garcia-Fruitós, E. (2025). Recombinant production of

- antimicrobial proteins in bacterial expression systems: *Escherichia coli* vs. lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 2025 24:1, 24(1), 252-. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02904-9>
- Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2017). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expression and Purification*, 132, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.006>
- Vignal, E., Chavanieu, A., Roch, P., Chiche, L., Grassy, G., Calas, B., & Aumelas, A. (1998). Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. *European Journal of Biochemistry*, 253(1), 221–228. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530221.x>
- Völzke, J. L., Smatty, S., Döring, S., Ewald, S., Oelze, M., Fratzke, F., Flemig, S., Konthur, Z., & Weller, M. G. (2023a). Efficient Purification of Polyhistidine-Tagged Recombinant Proteins Using Functionalized Corundum Particles. *BioTech* 2023, Vol. 12, 12(2). <https://doi.org/10.3390/BIOTECH12020031>
- Völzke, J. L., Smatty, S., Döring, S., Ewald, S., Oelze, M., Fratzke, F., Flemig, S., Konthur, Z., & Weller, M. G. (2023b). Efficient Purification of Polyhistidine-Tagged Recombinant Proteins Using Functionalized Corundum Particles. *Biotech (Basel (Switzerland))*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biotech12020031>
- Voronko, O. E., Khotina, V. A., Kashirskikh, D. A., Lee, A. A., & Gasanov, V. A. oglu. (2025). Antimicrobial Peptides of the Cathelicidin Family: Focus on LL-37 and Its Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 8103. <https://doi.org/10.3390/ijms26168103>
- Wang, M., Zhang, Y., Pei, F., Liu, Y., & Zheng, Y. (2025). Loss of OprD function is sufficient for carbapenem-resistance-only but insufficient for multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 2025 25:1, 25(1), 218-. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03935-3>

- Wei, X., Liu, M., Mo, C., Tan, R., Li, S., Liang, H., & Li, M. (2024). Molecular characteristics and antibiotic resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Nanning, China. *BMC Microbiology* 2024 24:1, 24(1), 478-. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03640-7>
- White, J. K., Muhammad, T., Alsheim, E., Mohanty, S., Blasi-Romero, A., Gunasekera, S., Strömstedt, A. A., Ferraz, N., Göransson, U., & Brauner, A. (2022). A stable cyclized antimicrobial peptide derived from LL-37 with host immunomodulatory effects and activity against uropathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 79(8), 411. <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04440-W>
- Yang, J., Zhang, J., Feng, Z., & Ma, Y. (2024). The Role and Mechanisms of Antimicrobial Peptides in Overcoming Multidrug-Resistant Bacteria. *Molecules* 2025, Vol. 30, 30(1). <https://doi.org/10.3390/molecules30010128>
- Zarei-Mehrvarz, E., Fahimirad, S., Ghaznavi-rad, E., Abbasian, S. S., & Abtahi, H. (2023). The LL-37 Antimicrobial Peptide as a Treatment for Systematic Infection of *Acinetobacter baumannii* in a Mouse Model. *Protein and Peptide Letters*, 30(1), 44–53. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220929160704>
- Zhang, H. L., Nizamani, M. M., Wang, Y., Cui, X., Xiu, H., Qayyum, M., & Sun, Q. (2024). Analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Haikou City. *Scientific Reports* 2024 14:1, 14(1), 22068-. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73258-2>
- Zhang, Z. X., Nong, F. T., Wang, Y. Z., Yan, C. X., Gu, Y., Song, P., & Sun, X. M. (2022). Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microbial Cell Factories* 2022 21:1, 21(1), 191-. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01917-Y>