



***CARACTERIZACIÓN IN SILCO DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LA  
HOLOTRICINA-3 FRENTE A *Escherichia coli*.***

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo Experimental**

**Bogotá D.C**

**11 Octubre**

**2024**



***CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LA  
HOLOTRICINA-3 FRENTE A Escherichia coli.***

**Paula Andrea Gutiérrez Ovalle**

**Andrés Camilo González Gómez**

**Diana Marcela Parra Muñoz**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo Experimental**

**Bogotá D.C**

**11 Octubre**

**2024**



***CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LA  
HOLOTRICINA-3 FRENTE A Escherichia coli.***

**Asesores: Andrés Camilo González Gómez**

**Diana Marcela Parra Muñoz**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo Experimental**

**Bogotá D.C**

**11 Octubre**

**2024**

## **Dedicatoria**

Dedico mi tesis mi Mamá, mi Papi, mi hermana quienes me acompañaron con palabras de motivación y acciones de amor en este gran proceso y me enseñaron cosas que solo una familia puede hacer, gracias por su sacrificio y dedicación, todo es y siempre será por ustedes.

A Koda, quien me mostró un amor puro e incondicional y me ha enseñado cosas que jamás podría haber aprendido sin tu presencia, siempre serás el bebé de la mami.

A Camilo, por su inagotable paciencia conmigo y también está dedicado a mis mentores, quienes me guiaron y orientaron siempre de la mejor manera.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mis docentes asesores Andrés Camilo González y Diana Marcela Parra quienes hicieron de este proyecto una realidad, gracias por su paciencia, su orientación y apoyo constante. También quiero agradecer a mi pareja, quién se ha convertido en mi principal fuente de motivación, ver su esfuerzo diario, resiliencia y perseverancia son razones que me inspiran a mejorar.

Agradecida infinitamente con mis papás y mi hermana porque sin ellos nada de esto sería posible y, por último, pero no menos importante quiero agradecerle a Yas quien en estos años me ha dado su amistad sincera y pura, gracias amigo.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. ANTECEDENTES.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general .....	16
3.2. Objetivos específicos .....	16
4. JUSTIFICACIÓN .....	16
5. MARCO TEÓRICO .....	19
5.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>E. coli</i> .....	19
5.1.2. Enfermedades causadas por <i>E. coli</i> .....	22
5.1.2.1. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	23
5.1.2.2. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) .....	23
5.1.2.3. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) .....	24
5.1.2.4. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	25
5.1.2.5. <i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC).....	26
5.1.2.6. <i>E. coli</i> adherente-invasiva (AIEC).....	27
5.1.2.7. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) .....	28
5.1.3. Proteínas blanco de <i>E. coli</i> .....	30
5.1.3.1. ZipA.....	30

5.1.3.2.	YidC .....	32
5.1.3.3.	FtsA .....	33
5.1.4.	MECANISMOS DE RESISTENCIA DE <i>E. coli</i> .....	34
5.1.4.1.	Inactivación enzimática .....	34
5.1.4.2.	Alteraciones de la permeabilidad .....	35
5.1.4.3.	Modificaciones en el sitio blanco .....	35
5.1.4.4.	Bombas de flujo.....	36
5.1.4.5.	Resistencia a los betalactámicos .....	37
5.1.4.6.	Resistencia a las quinolonas .....	38
5.1.4.7.	Resistencia a trimetoprim–sulfametoxazol.....	39
5.1.4.8.	Resistencia al cloramfenicol.....	39
5.1.4.9.	Resistencia a las tetraciclinas.....	40
5.1.5.	PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	41
5.1.5.1.	Historia.....	41
5.1.5.2.	Características generales de los PAM's .....	42
5.1.5.3.	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos .....	43
5.1.6.	Holotrichia diomphalia.....	45
5.1.7.	HOLOTRICINA-3.....	46
5.1.7.1.	Definición.....	46
5.1.7.2.	Usos y aplicaciones.....	46
5.1.7.3.	Secuencia de aminoácidos de Holotricina-3 .....	48
5.1.7.4.	Estructura tridimensional de la Holotricina-3.....	48
6.	DISEÑO METODOLÓGICO .....	48

6.1.	Búsqueda de secuencias.....	49
6.1.1.	Búsqueda de secuencias de aminoácidos de FtsA, YidC, ZipA .....	50
6.1.2.	Búsqueda de secuencias aminoácidos Holotricina-3.....	50
6.2.	Bioinformática descriptiva.....	50
6.2.1.	Análisis de secuencias de aminoácidos de Holotricina-3.....	50
6.2.2.	Análisis de ortología de Holotricina-3.....	50
6.2.3.	Análisis de dominios de Holotricina-3.....	51
6.2.4.	Interferencias funcionales de Holotricina-3 .....	51
6.3.	Análisis de homología de las secuencias de proteínas de <i>E. coli</i> .....	51
6.4.	Estructura tridimensional de proteínas de <i>E. coli</i> y Holotricina.....	51
6.4.1.	Modelamiento 3D de FtsA, ZipA, YidC.....	52
6.4.2.	Búsqueda de modelos 3D de Holotricina-3.....	52
6.5.	Identificación de sitios activos de Holotricina-3 y proteínas de <i>E. coli</i> .....	52
6.6.	Acoplamiento molecular por Haddock 2.4.....	52
7.	RESULTADOS .....	53
7.1.1.	Búsqueda de secuencias.....	53
7.1.1.1.	Búsqueda de secuencias de aminoácidos de Holotricina-3, FtsA, YidC y ZipA	
	53	
7.1.2.	Bioinformática descriptiva.....	54
7.1.3.	Análisis de secuencias Holotricina-3 .....	54
7.1.3.1.	Análisis de ortología de Holotricina-3 y posibles inferencias funcionales .....	54
7.1.3.2.	Análisis de dominios de Holotricina.....	54

7.2.	Análisis de homología de secuencias de aminoácidos de <i>E. coli</i> .....	55
7.3.	Identificación de sitios activos.....	56
8.	Acoplamiento molecular.....	58
8.1.1.	Puntuación Haddock .....	59
8.1.2.	Tamaño del clúster o número de estructuras agrupadas .....	60
8.1.3.	Energías de Van der Waals, electrostáticas y solvatación.....	60
8.1.4.	Restricciones violatorias de energía y Área de superficie enterrada .....	60
8.1.5.	Puntuación Z .....	60
9.	DISCUSIÓN .....	61
10.	CONCLUSIONES.....	63
11.	LIMITACIONE Y RECOMENDACIONES .....	63
12.	ANEXOS .....	64
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Distribución de residuos de ZipA .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 2. Distribución de residuos de YidC. DT: Domonios topológicos.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 3. Mecanismos de resistencia cromosómicos, enzimáticos y mediados por eflujo que se encuentran comúnmente en <i>E. coli</i> y que contribuyen a la resistencia de antibióticos ...</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 4. Mecanismos de resistencia a cloranfenicol descritos en <i>E.coli</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5. Compañías involucradas en el desarrollo de péptidos.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 6. Taxonomía de <i>H. diomphalia</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de Holotricina-3.....</b>	<b>53</b>
<b>en diversos grupos taxonómicos .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 8. Parámetros obtenidos en Haddock .....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Composición química de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2. Esquema de clasificación de <i>E.coli</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3. Principales órganos y tejidos afectados por las diferentes cepas de <i>E.coli</i>. En Azul cepas patógenas extraintestinales y en rosado cepas patógenas intrainestinales .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Secuencia de aminoácidos de Holotricina-3 obtenida del Uniprot. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5. Estructura tridimensional de la Holotricina-3 modelada en Swiss-Model. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 6. Flujograma de trabajo .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 7. Alineamiento de diferentes secuencias de FtsA. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 8. Alineamiento de diferentes secuencias de YidC. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 9. Alineamiento de diferentes secuencias de ZipA.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 10. Sitios activos de FtsA, YidC y ZipA.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 11. Sitios activos de Holotrcina-3.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 12. Acoplamiento molecular de las proteínas de <i>E. coli</i> y Holotrcina-3.....</b>	<b>58</b>



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

***CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LA HOLOTRICINA-3  
FRENTE A *Escherichia coli*.***

**RESUMEN**

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa que se asocia principalmente a enfermedades diarreicas agudas, sin embargo, en los últimos años ha tomado una mayor importancia en salud pública ya que se encuentra en la lista de patógenos prioritarios y críticos del 2024 que publicó la Organización mundial de salud (OMS), esto se debe a que actualmente el número de antibióticos efectivos para tratar infecciones causada por esta bacteria, son escasos.

En la búsqueda de tratamientos alternativos para combatir este problema es que surgen los péptidos antimicrobianos (PAM's). La Holotricina-3 es un PAM sintetizado en la hemolinfa del coleóptero *Holotrichia diomphalia* que hasta el momento ha mostrado tener propiedades fungicidas contra *Candida albicans*.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la acción bactericida mediante un acoplamiento molecular por Haddock 2.4 entre Holotricina-3 contra ZipA, FtsA y YidC que son proteínas blanco de *E. coli*. Los resultados demostraron que el acoplamiento molecular de Holtricina-3 y FtsA fue el que más interacciones entre residuos tuvo, mientras que el de YidC mostró posiblemente puede inhibir su función como insertasa y finalmente, el que se realizó contra ZipA demostró que interactuaba con los aminoácidos cargados de la proteína lo cual podría desestabilizar su estructura.

En conclusión, Holotricina-3 parece tener la capacidad estructural de interactuar con distintos sitios activos gracias a su dominio desordenado y estos resultados puede ser utilizados para llevar a cabo experimentos *in vitro*.

**Palabras claves:** Péptidos antimicrobianos, *Escherichia coli*, acoplamiento molecular, Haddock 2.4

**Paula Andrea Gutiérrez Ovalle**

**Diana Marcela Parra Muñoz**

**Andrés Camilo González Gómez**

**11 de Octubre del 2024**

## 1. INTRODUCCIÓN

*E. coli* es una bacteria Gram negativa, perteneciente al orden *Enterobacterales* capaz de colonizar el tracto gastrointestinal tan solo unas horas después del nacimiento y que actualmente es una de muchas bacterias que conforman la microbiota intestinal (1). Toma una gran relevancia en salud pública ya que se encuentra en la lista de patógenos prioritarios del 2024 que publicó la OMS; debido a que presenta resistencia a antibióticos de tercera generación y a los carbapenémicos y por ello se posiciona en el grupo más crítico de todos (2).

Es necesaria la investigación en nuevos campos que sean alternativos a los antibióticos tradicionales para enfrentar las infecciones causadas por este microorganismo, para así reducir el número de casos graves, las muertes por bacterias multiresistentes y dar cumplimiento a los objetivos de desarrollo sostenible (3).

Los PAMs son pequeñas secuencias de aminoácidos que producen mamíferos, insectos, plantas y microorganismos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos como mecanismo de defensa hacia otros patógenos (4). Gracias a las investigaciones previas sobre ellos sabemos que son parte de la respuesta inmune innata y que su principal mecanismo de acción se basa en las propiedades catiónicas y anfipáticas que les permiten la creación de poros en la membrana externa generando así una lisis del microorganismo; es por esta razón que se postulan como grandes candidatos farmacéuticos para combatir infecciones bacterianas (5).

La Holotricina-3 es un PAM caracterizado por ser una molécula hidrofílica sin un dominio hidrófobo sintetizada en la hemolinfa del coleóptero *H. diomphalia*, en respuesta a una infección, tiene un tamaño de 104 aminoácidos y demostró en estudios *in vitro* ser capaz

reducir el número de colonias de *C. albicans* (6); en este estudio usamos herramientas bioinformáticas para caracterizar el comportamiento molecular de Holotricina-3 frente a proteínas de gran importancia de *E. coli*. Se demostró que Holotricina-3 tuvo mejor afinidad con FtsA en comparación de las otras proteínas y que estos resultados pueden ser usado para realizar experimentos *in vitro*.

## **2. ANTECEDENTES**

Todos los organismos vivos, poseen la capacidad de producir moléculas que actúan de manera microbicida evitando así la infecciones por patógenos. La purificación y caracterización *in vitro* de los compuestos peptídicos producidos por insectos se ha llevado a cabo por más de cuatro décadas; en las cuales el aislamiento y la acción bactericida de estos péptidos han sido exitoso (4).

*Sarcophaga peregrina* es un díptero comúnmente conocido como mosca de la carne; Okada y colaboradores llevaron a cabo un trabajo experimental en donde caracterizaron y purificaron proteínas provenientes de la hemolinfa de la larva *S. peregrina* que demostró tener una actividad bactericida en concentraciones de 0,1 µg/ml frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (7).

Concretamente So Young Lee y colaboradores usaron las mismas técnicas de laboratorio para poder identificar péptidos producidos por el coleóptero *H. diomphalia* cuyo nombre común es Chafter negro coreano y que hoy en día es considerado una plaga en dicho continente (8).

Como resultados finales, estas investigaciones identificaron tres proteínas homólogas cada una con actividad microbicida específica entre ellas la Holotricina-2, la cual mostró un poder inhibitorio contra las bacterias Gram negativas, Holotricina-1 contra las bacterias Gram positivas y finalmente la Holotricina-3 contra hongos (6,9,10).

Un estudio más reciente llevado a cabo por Ripu Daman y colaboradores, llevaron a cabo una caracterización *in silico*, identificación y análisis a nivel molecular de la Holotricina-3 con proteínas de la pared celular de *C. albicans*. En resumen, este estudio encontró que Holotricina-3 tenía mayor estabilidad de unión con Bgl2p y que estos hallazgos podrían ser usados en estudios *in vivo* (11).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

- Caracterizar *in silico* la acción bactericida de la Holotricina-3 frente a *Escherichia coli*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar las principales proteínas de membrana de *E. coli* como posibles candidatas para el modelamiento molecular.
- Determinar un posible mecanismo de acción de la Holotricina-3 frente a *E. coli*

### **4. JUSTIFICACIÓN**

El mecanismo de supervivencia que adquieren los microorganismo, generalmente de manera natural frente a un fármaco es conocido como resistencia antimicrobiana; este

proceso lo pueden llevar a cabo virus, parásitos y hongos; sin embargo, la resistencia que genera las bacterias hacia los medicamentos es mejor conocida como resistencia a los antibióticos (3).

Cabe resaltar que actos humanos tales como el uso indiscriminado de los fármacos, el tratamiento de ellos para prevenir enfermedades en animales sanos o disminuir las pérdidas económicas por daños en los cultivos causadas por microorganismos en el sector agrícola, sólo aceleran dicho proceso natural (12,13).

Actualmente, esto constituye es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, pues la resistencia a este tipo de medicamentos genera una mayor estancia del paciente en el hospital, reduce las opciones de tratamientos, lo cual inherentemente produce más gastos y, en algunos casos aumenta la probabilidad de muerte (12,13).

Según la (OMS), si no se logra controlar este problema de salud pública, para el año 2050 la resistencia bacteriana será capaz de producir hasta 10 millones de muertes al año. Sin embargo, esta misma organización considera que se requiere una inversión de 2 a 3.5 % del producto interno bruto (PIB) en algunos países para poder combatirlo de manera eficiente (14).

En este sentido, actualmente existe una lista de patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS, dentro de los cuales se encuentra el microorganismo *E. coli* (2). *E. coli* es bacilo un Gram negativo de aproximadamente 1.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, sin esporas, con o sin cápsula, con motilidad positiva gracias sus flagelos peritricos, mesófila y anaerobia facultativa; formando parte de la microbiota intestinal normal de los humanos y animales de sangre caliente sin llegar a ser patógena (4,15).

Debido a los graves casos que se están presentando por resistencia antimicrobiana y su mal pronóstico, surge la necesidad de crear nuevas terapias alternativas a los antibióticos convencionales dado que los que se recetan en la actualidad carecen de eficacia, generando que las bacterias se propaguen sin problema y sigan causando infecciones o enfermedades de alto riesgo que suponen un mayor costo tanto para el paciente como para la entidad prestadora de servicio (16).

Sumado a esto, la creación de nuevos antibióticos conlleva grandes gastos en cuanto a tiempo y dinero y no muestran una respuesta efectiva dada la rápida aparición de mecanismos de supervivencia en bacterias que antes no los tenían. Por ende, los antibióticos van quedando fuera de la lista de tratamientos prometedores en las infecciones bacterianas (17).

Hoy por hoy existen varias investigaciones sobre los distintos métodos o mecanismos para combatir la resistencia antimicrobiana, también conocidas como terapias alternativas. Son tratamientos de compuestos diferentes a los antibióticos, entre los cuales encontramos: anticuerpos, probióticos, vacunas, bacteriófagos, PAM's y otros que siguen en fase de investigación como los péptidos antibiofilm o inhibidores de las bombas de flujo (18).

Dentro del contexto mencionado los PAMs han pasado ya por la fase de investigación y algunas ya se encuentran en la fase clínica, bien sea para el tratamiento de infecciones, coadyuvantes o como prevención antes de algún procedimiento quirúrgico en el cual se pueda adquirir algún tipo de infección por cualquier microorganismo (19).

Los resultados de las investigaciones con PAM's son prometedores, no sólo porque lisan directamente al microorganismo sin dejar sustancias secundarias tóxicas para el huésped,

sino porque también han demostrado su papel en el sistema inmunológico gracias a sus propiedades quimiotácticas (4).

Se debe incrementar la búsqueda de nuevos tratamientos para las infecciones bacterianas ya que sus consecuencias en el futuro son de alto impacto. Dentro de esta búsqueda se debe tener en cuenta costos, gastos, accesibilidad, fácil producción e impacto en la salud, por ello los PAM's son grandes candidatos.

## **5. MARCO TEÓRICO**

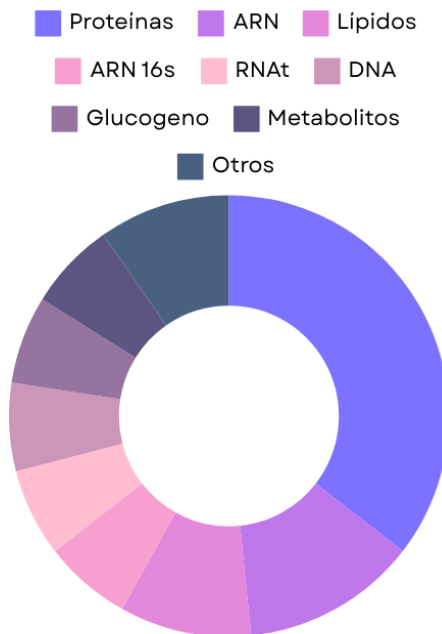
### **5.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *E. coli***

*E. coli* es una bacteria Gram negativa que fue aislada y caracterizada por primera vez por el pediatra y microbiólogo Theodor Escherich en 1885 a partir de las heces de un infante, en donde recibe como primer nombre *Bacterium coli commune*; sin embargo, no fue hasta 1919 que recibió su denominación definitiva gracias a Castellani y Chalmers, quienes decidieron nombrarla *E. coli* en honor a Theodor (20–22).

Desde su descubrimiento hasta hoy, se sabe que este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal tan solo unas horas después del nacimiento, convirtiéndose en el principal comensal anaerobio facultativo de la microbiota intestinal del ser humano y de animales de sangre caliente (15,20).

En el año 1997 que se logró secuenciar el genoma completo de una cepa de *E. coli* conocida comúnmente como K12 y para el 2001 ya habían obtenido el genoma completo de la conocida cepa O157:H7. El tamaño del genoma de esta bacteria depende mucho de la cepa, sin embargo, este puede variar entre 4,6 y 5,5 Mb (22).

Actualmente, se sabe que el genoma de la cepa K12 su ADN de 4.639.221 pb es circular y de doble cadena, que además el 87,8% de este ADN codifica para proteínas, un 0.8% para RNAs y el otro 0.7% es ADN con función desconocida (9). De esta manera las proteínas y el ARN representan más de la mitad del peso seco de la bacteria y el porcentaje restante corresponde a lípidos, ADN, glucógeno, metabolitos y otros (23).



**Figura 1.** Composición química de *E. coli* (23).

Acerca de sus funciones de regulación se estima que el 11% del cromosoma se encarga de ello y que además de los 4.288 marcos de lectura abierta (ORFs) un 28% no tiene una función descrita. En general el contenido de GC de una *E. coli* es de un 50.8%, sin embargo, el 17% del genoma de la K12 y 26% de la O157:H7 varían en su proporción de GC (23).

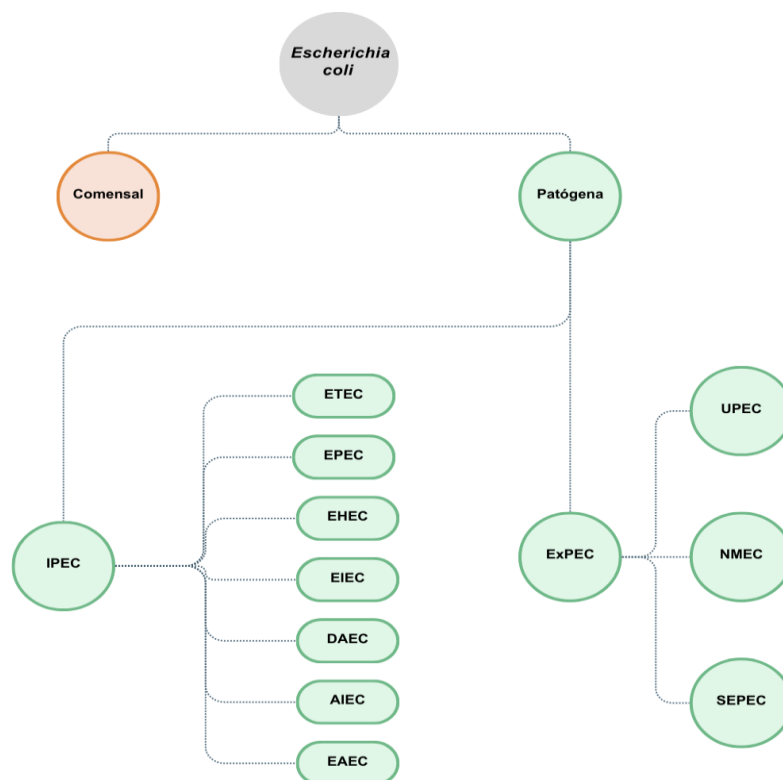
Respecto a sus características microbiológicas se ha descrito que es bacilo un Gram negativo de aproximadamente 1.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, sin esporas,

con o sin cápsula, con motilidad positiva gracias sus flagelos peritricos, mesófila y anaerobia facultativa perteneciente al orden *Enterobacterales* (15,22).

Inicialmente, se puede clasificar a las cepas de *E. coli* en dos grandes grupos: *E. coli* patógena intestinal, (IPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal, (ExPEC) indicando que hay cepas de *E. coli* que puede generar enfermedad en órganos diferentes al tracto gastrointestinal, tales como el urinario (15).

En cuanto a las cepas patógenas intestinales, tienen otra subclasificación que se basa en el sistema descrito por Kauffmann en 1947, quien propuso la identificación de cepas con base a sus diferencias antigénicas; este esquema actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K), siendo el antígeno “O” quien determina el serogrupo y la combinación del antígeno “O” y “H” indica el serotipo (1).

Como resultado un serogrupo o un serotipo se puede asociar no sólo a los síntomas generados en el paciente, sino también a la presencia de factores patogénicos. Se han caracterizado siete patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y un nuevo patotipo, *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), que causa principalmente diarrea y trastornos intestinales (1).



**Figura 2.** Esquema de clasificación de *E.coli*. Abreviaturas: *E. coli* patógena intestinal (IPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC). *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) (3).

### 5.1.2. Enfermedades causadas por *E. coli*

Las principales enfermedades asociadas a esta bacteria son las diarreas agudas (EDA), sin embargo, dependiendo del patotipo genera distintos síntomas en diferentes edades con una epidemiología variable y esto es gracias a su mecanismo patógeno y/o factores de

virulencia; Cabe resaltar que las ExPEC se relacionan más con infecciones en el tracto urinario, meningitis, sepsis e incluso se encuentran infectando heridas (20,24).

#### **5.1.2.1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Los patotipos de ETEC son las principales causantes de la diarrea del viajero y diarrea infantil aguda especialmente en lactantes menores de dos años pues en ellos se encuentran las tasas más altas de mortalidad e infección. De un 10% a un 30% de los casos de la diarrea en infantes, la ETEC es la responsable y según la OMS esta misma causa anualmente más de 157.000 casos de diarrea que provocan la muerte, especialmente en países en vías de desarrollo (1,20,24).

Con respecto a los síntomas, se caracteriza por ser una diarrea acuosa aguda, sin moco, sin sangre y sin pus, pero con dolor abdominal leves a intensos; pocas veces el paciente cursa con fiebre, vómito, náuseas o dolor de cabeza. Actualmente se acepta a este tipo de como causante de enteritis y gastroenteritis (1,24).

Acerca de su mecanismo patógeno y factores de virulencia, se distingue por tener y sintetizar fimbrias (CFA I, CFA II), toxinas termolábiles (TL) y termoestables (TE) respectivamente. Gracias a sus fimbrias tiene la capacidad de colonizar las células epiteliales del intestino delgado y al producir sus toxinas provoca en la mucosa una mayor salida de agua e iones (24).

#### **5.1.2.2. *E. coli* enteropatógena (EPEC)**

La EPEC produce diarrea en menores de seis años y también se ha reportado casos en menores de dos años; cabe resaltar que durante un tiempo fue una problemática en salud pública en países desarrollados disminuyendo sus casos de incidencia poco a

poco, sin embargo, no es la situación de países en desarrollo pues sigue siendo un problema de salud pública en lactantes y adultos (1,20).

El paciente suele cursar con una diarrea aguda y crónica prolongada, con vómito, fiebre baja y mala absorción intestinal, siendo su principal vía de transmisión el consumo de leche y carne molida (1,20).

Respecto su patogenia y factores de virulencia, esta produce unas proteínas que una vez expresadas inducen una adherencia entre la íntima de la bacteria y la célula intestinal provocando un acortamiento de las microvellosidades de esta, este mecanismo se conoce comúnmente como "unión y borramiento" (A/E) lo cual es una histopatología intestinal característica de esta cepa (25,26).

Este patotipo cuenta con una isla de patogenicidad cromosómica (PAI) de 35,62 kb dentro de 41 marcos abiertos de lectura (ORF) donde se codifican sus principales genes de virulencia. Además, también tiene un locus de borramiento de enterocitos (LEE) y factor de adherencia de EPEC (EAF) denominado plásmido patógeno (20).

Los principales antibióticos a los cuales es resistente está bacteria son estreptomina, ampicilina, tetraciclina y al combinado antibiótico de trimetoprim-sulfametoxazol (26).

#### **5.1.2.3. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

A diferencia de los patotipos mencionados anteriormente, la EHEC causa colitis hemorrágica y síndrome urémico-hemolítico en todas las edades y púrpura trombocitopénica trombótica post diarreica en los adultos; El serotipo el O157: H7 es un problema de salud pública en países como Japón, Europa y América del Norte (20).

El cuadro clínico se manifiesta con una colitis hemorrágica (CH) que es básicamente, dolor abdominal, diarrea con sangre con o sin fiebre leve y de la misma manera puede llegar a generar síndrome urémico hemolítico (SHU) que se distingue por una hemólisis, falla renal, y trombocitopenia (1,20).

Su principal mecanismo de patogenicidad es la producción de toxinas *Shiga-like* shigatoxinas o verotoxinas, la síntesis de esta toxina está estrechamente relacionado con el bacteriófago STX y es debido a ello que las cepas de la EHEC se pueden clasificar en las cepas típicas cuando tienen el fago y en cepas atípicas, cuando no producen lesiones de adherencia y esfacelación (A/E) (1).

Al ser su principal factor de virulencia, la toxina *Shiga-like* ha sido profundamente estudiada, de ella se sabe que es una toxina AB<sub>5</sub> lo cual quiere decir que tiene una subunidad A que a su vez tiene dos fragmentos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> donde el primer fragmento es el responsable del efecto citotóxico; y también consta de cinco subunidades B que se encarga de unir la holotoxina al glicolípido globotriaosilceramida en la célula diana (20,27).

La estreptomicina, ampicilina, tetraciclina y las sulfonamidas son los principales antibióticos a los cuales este patotipo ha generado resistencia (26).

#### **5.1.2.4.E. coli enteroinvasiva (EIEC)**

Con relación a este patógeno Oscar G y James B describen que es una causa frecuente de diarrea en todas las edades y que su comportamiento es muy similar al de la bacteria *Shigella* spp, pues según estudios filogenéticos EIEC era un ancestro muy cercano a

*Shigella* spp y esto explicaría por qué causan cuadros clínicos muy similares y que sea taxonómicamente indistinguibles (25,27).

Los síntomas característicos que presenta un paciente cuando cursa con una infección por esta cepa son: disentería que es la inflamación de los intestinos más una diarrea con sangre, algunas veces la diarrea viene acompañada con calambres abdominales y fiebre, dicha historia clínica se describe cómo los síntomas clásicos que produce una shigelosis o una disentería bacilar (20).

Acerca de su patogenia se sabe que es capaz de adherirse a las células del colón, específicamente a las microvellosidades para posteriormente, gracias a la presencia de un plásmido de 220 kb, codificar un sistema de secreción tipo III e invadir y multiplicarse en la célula intestinal causando la destrucción de estas (20,25).

Su mecanismo de acción explicaría porque el paciente cursa principalmente con una disentería y al mismo tiempo se puede deducir que esta cepa es una intracelular obligada ya que requiere de estar dentro de la célula para ejercer su acción (20,25).

La resistencia antimicrobiana comúnmente encontrada en esta bacteria está dirigida a los carbapenémicos, a la fosfomicina trometamol, nitrofurantoína, cloramfenicol, betalactamasas, ácido nalidíxico, ampicilina y fluoroquinolonas (26).

#### **5.1.2.5.E. coli de adherencia difusa (DAEC)**

Acerca de DAEC se considera de patotipos heterogéneos, pero menos caracterizados y del cual se sabe poco de su mecanismo de acción, sin embargo, se conoce que posee un patrón difuso en las células Hep-2 y HeLa y es de allí que viene su nombre y este fenómeno a su vez se asocia con una proteína de membrana externa (20,25).

Este patógeno se ha aislado en pacientes sanos como en aquellos que tienen diarrea, pero toma mayor importancia en niños de 1,5 a 5 años, sin embargo, también se ha descrito que genera infecciones del tracto urinario (ITU) en adultos y algunas complicaciones en mujer en estado de gestación. Cabe resaltar que el cuadro clínico típico es una diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (1,20).

En cuanto a su patogenicidad se asocia a una adherencia difusa gracias a una fimbria conocida como F1845 que es quien le otorga dicho patrón, sin embargo, autores describen también la presencia de fimbrias Afa/Dr, AIDA, y Daa (Difuse adhesin) como generadoras del efecto citopático pues requiere de la unión al receptor DAF por las fimbrias y se caracteriza por el desarrollo de extensiones celulares (15,25,27).

Los principales antibióticos a los cuales esta cepa ya ha generado un tipo de resistencia son: ampicilina, trimetoprima, sulfametoxazol, fosfomicina, piperacilina, tetraciclina, ciprofloxacina, cotrimoxazol, nitrofurantoína, oxacilina, bactericina, cloxacilina, cloranfenicol y ácido nalidíxico (26).

#### **5.1.2.6. *E. coli* adherente-invasiva (AIEC)**

Este tipo de *E. coli* está fuertemente asociado a la etiopatogenia de dos trastornos inflamatorios idiopáticos los cuales son, la Enfermedad de Crohn (EC) y La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), pero cabe resaltar que este tipo de cepa se ha aislado de pacientes totalmente sanos como parte de la microbiota normal del intestino sin llegar a generar ningún tipo de alteración (20,28).

Esta bacteria es capaz de adherirse a las células epiteliales, invadir las mismas y sobrevivir a la fagocitosis multiplicándose dentro del mismo; aunque sus factores de

virulencia específicos aún no están claros se sabe que su proceso de infección lo lleva a cabo en tres pasos (28).

La primera etapa consta de la adhesión a las células del íleon usando la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6 (CAECAM6) que expresan las células epiteliales. Cuando esta molécula empieza su sobreexpresión estimula la producción de TNF- $\alpha$  lo que provoca inherentemente la inflamación intestinal (28).

Posteriormente usa las vesículas de la membrana externa, proteínas de membrana externa y las fimbrias polares largas en las siguiente dos fases de infección, que vienen siendo la invasión, infección y replicación dentro de los macrófagos (20,28).

Los genes asociados a los factores de virulencia son el *kpsMT II* que codifica para la cápsula, el gen *fyuA* que codifica para la yersiniabactina férrica, el gen *ipaH* que codifica para la proteína de invasión *ibeA*, el gen *fimH* que codifica para las fimbrias tipo 1 y el gen *yjaA* que codifica para a proteína polipeptídica de respuesta al estrés (20).

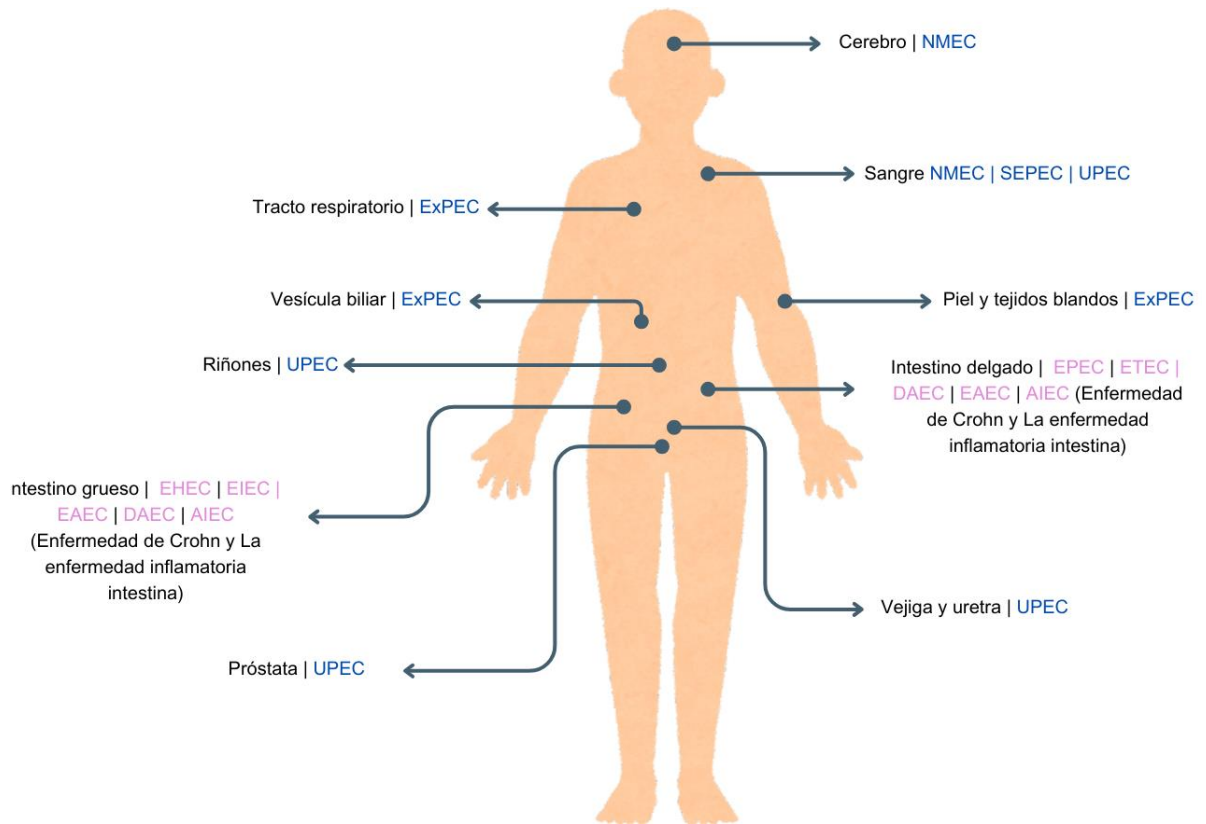
#### **5.1.2.7.E. coli enteroagregativa (EAEC)**

Este patotipo se considera una enfermedad emergente pues fue gracias Scaletsky y Nataro quienes aislaron este patógeno en un paciente con diarrea y notaron que sus características serológicas no correspondían a ningún otro patotipo ya descrito. Fue gracias a sus estudios que encontraron el fenotipo de autoaglutinación de las bacterias entre sí que hoy se conoce como adherencia agregativa. Esta manifestación se le puede

atribuir a la presencia de la fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I) codificada por un gen del plásmido CVD432 (20,24).

La sintomatología clásica de esta cepa es una diarrea aguda y crónica no solo en lactantes e infantes pues, también se ha asociado a la enfermedad de la diarrea de viajero. El tipo de diarrea es con moco y líquida de color verdoso en niños, que puede o no ser sanguinolenta, con o sin fiebre y vómito. Su principal vía de transmisión es la alimentaria no solo en países en desarrollo, sino también en países subdesarrollados (1,24).

Una familia de plásmidos virulentos es quienes le otorgan a esta bacteria sus factores de virulencia, entre ellos el plásmido de adherencia agregativa llamado pAA, también poseen islas de patogenicidad y algunas cepas pueden sintetizar una toxina denominada enteroagregativa EAST-1) (20,24). La Ampicilina, trimetoprima, sulfametoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina son los principales medicamentos a los cuales tiene resistencia esta cepa de *E. coli* (26).



**Figura 3.** Principales órganos y tejidos afectados por las diferentes cepas de E.coli. En Azul cepas patógenas extraintestinales y en rosado cepas patógenas intrainestinales (29).

### 5.1.3. Proteínas blanco de *E. coli*

Se eligieron tres proteínas que según la literatura son altamente conservadas entre las diferentes cepas de *E. coli* y que además estas fueran de alguna u otra manera cruciales en algún proceso vital de la misma, a continuación, se describen dos proteínas involucradas en la división celular y otra con funciones de insertasa y chaperona.

#### 5.1.3.1. ZipA

El mecanismo de septación bacteriana es imprescindible para asegura la proliferación de una cepa dado que por medio de este proceso es que se da origen a una célula nueva, idéntica a la original. Acerca de esta proteína, actualmente se conoce que es un

compuesto importante en el desarrollo de la división celular; pues hace parte del complejo de moléculas que llevan a cabo la formación del anillo septal en *E. coli* (30,31).

Estructuralmente, ZipA es una proteína de 328 aminoácidos anclada a la membrana, con un peso molecular de 36,4 kD, integrada en regiones específicas de la bacteria, similar a las balsas lipídicas de las células eucariotas y con un total de tres dominios principales y una única hélice transmembranal (TMH) (32).

**Tabla 1.** Distribución de residuos de ZipA (32)

TMH: transmembranal DG: Dominio globular

	Residuos
N-terminal	1-6
TMH	7-28
Aminoácidos cargados	29-85
Dominio PQ	86-185
DG	186-328

El dominio N-terminal está anclado a la membrana, mientras que el C-terminal es un dominio citoplasmático. El dominio P/Q está compuesto el 31 % por prolina y el 23 % por glutamina, por lo que se dice que es rico en estos dos aminoácidos; mientras que el dominio globular está compuesto por tres hélices beta y una lámina beta que consta de seis hebras alfa antiparalelas; esta última región ha sido ampliamente estudiada ya que parece ser el dominio encargado de la interacción con FtsZ (33–35).

Entre sus funciones principales encontramos la reticulación de los protofilamentos de FtsZ, el anclaje del anillo Z a la membrana, pero que de ninguna manera interfiere en la formación de este último. Otros estudios han arrojado que también es necesaria para

el reclutamiento de FtsK y que además protege a FtsZ de la degradación por parte de ClpP al impedir el reconocimiento por ClpX (36).

### 5.1.3.2. YidC

YidC es una proteína descubierta recientemente y de la cual se sabe que es miembro de la familia YidC/Alb3/Oxa1, que es un conjunto de compuestos que se relacionan con la biogénesis de las proteínas de membrana entre otras funciones secundarias; este sistema celular está altamente conservado en las bacterias, cloroplastos y mitocondrias respectivamente (37).

En cuanto a su estructura, YidC tiene alrededor de 548 aminoácidos con un peso de 61 kD con aproximadamente 2500 copias por célula y posee seis segmentos transmembrana (TM), distribuidos de la siguiente manera (38).

**Tabla 2.** Distribución de residuos de YidC. DT: Dominios topológicos (38).

	Residuos
DT	1-5
TM1	6-23
P1	24-342
DT	343-353
TM2	354-370
DT	371-416
TM3	417-442
DT	443-462
TM4	463-481
DT	482-493
TM5	494-510
DT	511
TM6	512-529
C-terminal	530-548

Con respecto al dominio periplásmico (P1) su función parece no ser clara aún, pues mientras algunos autores dicen que no es esencial para la función correcta de la proteína otros han demostrado que con la eliminación del residuo 265 al 346 YidC pierde su función como insertasa (39).

La función principal de YidC en *E. coli* es actuar como chaperona e insertasa, es decir que ayuda al plegamiento e inserción de las proteínas de membrana y que, aunque esta pueda actuar de manera independiente, la literatura dice que junto con el traslocón Sec o el complejo SecYEG son los principales encargados de la inserción de proteínas dependiente de Sec (40).

Finalmente, los autores plantean que YidC interactúa con los dominios hidrofóbicos de las proteínas bajo dos maneras, la primera llamada “Modelo secuencial” y la otra conocida como “Sitio de ensamblaje”; el primero aplica para proteínas con dos hélices transmembranales en donde sus dominios se insertan uno a uno en la membrana lipídica y el último es para aquellas con más de dos hélices y aquí los dominios transmembranales entran todos al mismo tiempo (41)

### **5.1.3.3.FtsA**

Esta proteína también se caracteriza por ser esencial en durante la división celular de *E. coli*, se comprende que comparte una gran homología con la actina y componentes de la superfamilia ATPasa y que además está altamente conservada entre las bacterias (31). FtsA cuenta con un total de 420 aminoácidos, un peso molecular aproximado de 45.3 kD, alrededor de 1000 copias por célula y estudios previos muestran que aparentemente no tiene dominios transmembranales (42).

En cuanto a su función, al igual que ZipA, FtsA interactúa con el dominio C-terminal de FtsZ y ayuda a su ensamblaje utilizando una hélice anfipática, y sobre las distinciones entre ZipA y FtsA, FtsA tiene más copias que ZipA y de esta última se tiene bien caracterizado sus dominios de membrana; Aunque las funciones de ZipA y FtsA son similares parece ser que se regulan de manera independiente, pero falta aún más estudios que esclarezcan sus semejanzas y diferencias funcionalmente (30,43).

#### **5.1.4.MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *E. coli***

La resistencia antimicrobiana (RAM), específicamente la resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública a nivel global, debido a la cantidad de casos reportados de bacteria multirresistentes, las pocas opciones disponibles para el tratamiento del paciente y el gran número de muertes que este fenómeno ha provocado. Ciertamente la resistencia que cualquier microorganismo, sea virus, hongos, parásitos o en este caso bacterias puede generar frente a un fármaco se da forma natural en ciertos casos, sin embargo, dicho proceso natural se ha visto acelerado por la intervención humana. (18).

Las enterobacterias cuentan con unos mecanismos de resistencia a veces distintos a los que las bacterias Gram positivas pueden tener, entre ellos encontramos: inactivación enzimática, alteraciones de la permeabilidad, bombas de flujo y las alteraciones en las modificaciones en el sitio blanco como las que se dan en las proteínas fijadoras de penicilina (PFP) o también conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP) (44).

##### **5.1.4.1.Inactivación enzimática**

La producción de enzimas para inactivar un antibiótico es ahora un mecanismo muy común entre todas las bacterias; estas enzimas logran hidrolizar o modificar el antibiótico lo cual convierte al microorganismo inmune a su acción (21).

Las betalactamasas son las enzimas mejor conocidas por evitar que los betalactámicos ejerzan su poder bactericida; estas son capaces de inactivar toda la familia de estos medicamentos que incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactames y carbapenemes (45).

Existen una gran variedad de estas enzimas sido las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) las más comunes de las enterobacterias; en general estas moléculas se asocian principalmente a los plásmidos, pero también a la transmisión de genes cuando las son parte constitutiva del cromosoma (44).

Otros ejemplos de estas son penicilinasas, cefalosporinasas, carbapenemasas, cloranfenicol acetiltransferasa, entre otras (44,45).

#### **5.1.4.2.Alteraciones de la permeabilidad**

Este tipo de mecanismos es propio de las bacterias Gram negativas, pues en las enterobacterias las porinas son canales de proteínas que le permiten a algunos antibióticos entrar a las bacterias, por ellos mutaciones o en los genes que codifican estas proteínas o supresiones en la misma limitan las entradas del fármaco favoreciendo así a este microorganismo (44,45).

#### **5.1.4.3.Modificaciones en el sitio blanco**

El sistema de modificación en el sitio blanco se atribuye a aquellas bacterias que son capaces de alterar el blanco donde se une el antibiótico y esto lo puede llevar a cabo mutando genes que codifican para el mismo (46).

Algunos ejemplos son *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR) las alteraciones en las PBP de *S. pneumoniae* que confiere resistencia a penicilina y ceftriaxona; cambios en la proteína receptora de la subunidad 30S, metilación del ARN ribosomal en la subunidad 50S entre otras (44,46).

#### **5.1.4.4. Bombas de flujo**

La resistencia medida por bombas de flujo es realmente un mecanismo inespecífico que se sabe que afecta desde quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos hasta los betalactámicos. Las bombas de flujo son proteínas que se encargan del transporte de metabolitos desde adentro hacia afuera de la bacteria, estas bombas de flujo son usadas por las bacterias para extraer el antibiótico y de esta manera reducir su concentración en el interior (45,46).

**Tabla 3.** Mecanismos de resistencia cromosómicos, enzimáticos y mediados por eflujo que se encuentran comúnmente en *E. coli* y que contribuyen a la resistencia de antibióticos (47).

Antibiótico	Mutaciones cromosómicas	Mecanismo enzimático (codificado por plásmidos)	Eflujo medidado
Nitrofurantoína	<i>nfsA, nfsB, rib E</i>	CTX-M-14 (mutado)	<i>aqxAB</i>
Fosfomicina	<i>murA, glpT, uhpT</i>	<i>fosA, fosL</i> (Varios alelos)	
Trimetoprima	<i>MgrB</i>	<i>drfA1, drf A5, drfA7, drfA12, drfA17, drfA8, drfA14, drf2d, drfA3, drfA9, drfA10, drfA24, drfA26</i>	<i>acrAB-tolC</i>
Sulfametoxazol		<i>sul1, sul2, sul3</i>	
Fiuoroquinolonas	<i>gyrA, gyrB, parC</i>	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qnrE, qnrVC, aac(6)-Ib-cr</i>	<i>acrB, qepA, oqxAB</i>
β-lactámicos	<i>mrdA, ampC</i>	<i>bla<sup>CTX-M</sup>, bla<sup>TEM</sup>, bla<sup>SHV</sup>, bla<sup>OXA</sup>, bla<sup>CMY</sup>, pAmpC</i>	<i>acrAB-tolC, acrAD-tolC</i>

#### 5.1.4.5. Resistencia a los betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos que se caracterizan intervenir en la síntesis de un compuesto muy importante de la pared celular conocido como peptidoglicano; por otro lado, las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del núcleo beta-lactámico, lo cual lleva a la inactivación del mismo (48).

Actualmente existen alrededor de 890 beta-lactamasas y la más comunes entre las enterobacterias son: blaTEM, blaSHV, blaOXA-1 y blaCARB, sin embargo, las betalactamasa de tipo CTX-M ha tomado importancia entre este grupo de bacterias y un ejemplo es la detección de la misma en un estudio de 32 cepas de *E. coli* (48).

En *E. coli* también se ha encontrado la presencia de enzimas como blaGES que hidrolizar a la ceftazidima, beta-lactamasa TEM-116 y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) como la anteriormente mencionada (CTX-M); las enzimas de tipo AmpC le confieren a esta bacteria resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas y

monobactámicos, sin mencionar la reciente metalo- $\beta$ -lactamasa-1 de Nueva Delhi (NDM-1) (encontradas no solo en *E. coli*) que llegan a hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (15,47,48).

En general, la resistencia a los betalactámicos se puede dar por la presencia de las enzimas mencionadas, pero además la bacteria puede presentar mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP) lo cual disminuye la afinidad hacia el fármaco.

#### **5.1.4.6. Resistencia a las quinolonas**

Las quinolonas son fármacos que inhibe la síntesis de ADN a través de la ADN girasa y de las topoisomerasas tipo II como los son la ADN girasa y topoisomerasa IV; las ADN girasa está compuesta por dos subunidades A y B está codificada por lo genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente y es importante porque a diferencia de la topoisomerasa IV la ADN girasa es el blanco principal en Gram negativas (48).

Los principales mecanismos de resistencia asociados a las fluoroquinolonas incluyen, bombas de flujo - como es el caso del gen *QepA*, que codifica una bomba de expulsión para fluoroquinolonas hidrofílicas-, un cambio en el codón 83 que ya codifica para un aminoácido diferente lo cual modifica totalmente la enzima y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos como es el caso de los genes *qnr* que codifican a la familia de las proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD) que se unen a la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) (48).

En cuanto a la resistencia hacia las fluoroquinolonas se relaciona con la variante cr de la acetiltransferasa 6' (AAC (6')-Ibcr) en donde realiza cambios en los codones 102 y 179 lo cual le confiere resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino y aminoglucósidos ya

que los inactiva de manera dual y se cree que es un mecanismo mediado por plásmidos (47,48).

#### **5.1.4.7. Resistencia a trimetoprim–sulfametoxazol**

El trimetoprim y la sulfonamida sulfametoxazol actúan inhibiendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico y ácido dihidrofólico respectivamente, estos son cofactores importantes en la ruta del ácido fólico lo cual indica que estos medicamentos actúan interviniendo en la síntesis de ADN. El uso continuo de estos antibióticos desde el año 1935 tanto en la medicina humana como en la veterinaria ha generado velozmente una resistencia antibiótica y se asocia frecuentemente a plásmidos e integrones (47).

Hoy en día se sabe que existen genes en los cromosomas *folA* y *folP* que son naturalmente resistentes a la trimetoprima y las sulfonamidas, sin embargo, los más de 30 genes del complejo de los genes *Dfr* (dihidrofolato reductasa) le confieren a *E.coli* una resistencia a la trimetoprima. Esta familia de genes se encuentra muy próximos a los genes *sul* de los cuales se han descrito tres, *sul 1*, *sul 2* y *sul 3* encargados de la resistencia a las sulfonamidas (47,48).

Aunque los elementos móviles son, como hemos visto, un factor determinante en la resistencia antimicrobiana en este caso las mutaciones cromosómicas también confieren resistencia así como las bombas de flujo que para el caso de la *E.coli* el sistema de eflujo AcrAB-TolC conduce a un aumento de las CMI de trimetoprima (47,48).

#### **5.1.4.8. Resistencia al cloramfenicol**

El mecanismo de acción de este fármaco se basa en la inhibición de la biosíntesis de proteínas pues se une al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S que a su vez evita la elongación de las cadenas peptídicas (48).

El cloramfenicol acetiltransferasas (CAT) son enzimas de acetilación y se caracterizan por ser el principal mecanismo de resistencia pues inactiva el medicamento mediante la acetilación del mismo. Las CAT se dividen en dos tipos, A y B y varían por sus secuencias de aminoácidos, pero no son los únicos mecanismos pues se han descrito sistemas de exportadores específicos relacionados con genes *cmlA* y *floR* (48).

**Tabla 4.** Mecanismos de resistencia a cloranfenicol descritos en *E.coli* (48). Nota: <sup>1</sup>

No está disponible el nombre del plásmido

Grupo	Gen	Plásmido/transposon/ cromosoma	N.º acceso en base de datos
Cloranfenicol transferasas (CAT) tipo A			
A1	<i>catI</i>	Tn9, R429	VO0622
A2	<i>catII</i>	pSa	X53796
Clornfenicol transferasas (CAT) tipo B			
B-2	<i>catB2</i>	pNR79:Tn2424	AF047479
B-3	<i>catB3</i>	pHSH2	AY259086
Exportadores específicos para cloranfenicol/florfenicol			
E-1	<i>cmlA5</i>	R751(Tn2000)	AF205943
E-2	<i>cml</i>	R26	M22614
E-3	<i>Flo</i>	Plasmid <sup>1</sup>	AF252855
	<i>floR</i>	Plasmid <sup>1</sup>	AF231986
	<i>floR</i>	pMBSF1	AJ218835

#### 5.1.4.9. Resistencia a las tetraciclinas

El mecanismo por medio del cual actúan las tetraciclinas es mediante la unión a la parte 16S de la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria que evita la unión del aminoacil-tRNA en la posición A del ribosoma lo cual termina en una inhibición de la síntesis de proteínas. Cabe destacar que los sistemas de flujo, la protección ribosomal y la acción enzimática, son otro de los mecanismos de resistencia hacia estos fármacos (16); Sin embargo, *TetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY* son los principales genes asociados a la resistencia a las tetraciclinas en *E. coli* y se sabe que *tetB* y *tetA* son los genes de resistencia a tetraciclinas más comúnmente encontrados (48).

En América Latina se han reportado cepas de *E. coli*. productoras  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) —en su mayoría de tipo CTX-M—, cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como a los carbapenémicos y presencia de gen *mcr-1* que le confiere resistencia a la colistina (49).

Sin embargo, cabe resaltar que se ha encontrado nuevas enzimas que le confieren a esta bacteria una resistencia antibiótica aún más alta, tales como:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A,  $\beta$ -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos de clase C, Metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) de clase B, carbapenemasas KPC de clase A y OXA- $\beta$ -lactamasas de clase B (15).

## **5.1.5. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

### **5.1.5.1. Historia**

El punto de partida para hablar sobre los PAM's radica en Alexander Fleming quien observó que las secreciones respiratorias tenía efectos bactericidas y esto es debido a

la presencia de la lisozima y fue esta misma la primera proteína con función antimicrobiana reportada (4).

En el año 1939 se reporta oficialmente el primer péptido que es capaz de combatir la infecciones contra neumococos llamado gramicidina; este descubrimiento fue hecho por Dubos quien extrajo este péptido a partir de un *Bacillus*, una bacteria presente en el suelo (19); y para el año 1941 se descubrió y reportó otro PAM's conocidos como tirocidina y puorotionina con aspectos inhibitorios hacía bacterias Gram negativas y Gram positivas y hongos (50).

En la época de los ochenta fueron reportado péptidos almacenados en células polimorfonucleares de humanos y conejos por Robert Lehrer y colaboradores, así como se revelo que la piel de la rana *Xenopus laevis* contenía grandes cantidades de PAM's, este hecho fue declarado en el año 1987 por Michael Zasloff (5).

Desde entonces se han aislado más de 5.000 péptidos de distintos especies tales como, plantas, insectos, hongos, bacterias e incluso péptidos de origen humano; es tal la información sobre estos que existen bases de datos tales como GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y Swiss-Prot, Antimicrobial Sequences Database (AMSDb), peptaibol, ANTIMIC, SAPD (Synthetic Antibiotic Peptide Database), y APD (Antimicrobial Peptide Database) (50,51).

#### **5.1.5.2. Características generales de los péptidos antimicrobianos**

Los PAM's son pequeñas secuencias de aminoácidos cuyo tamaño no los logra clasificar como una proteína, pero tampoco como un péptido propiamente dicho. Estas moléculas son sintetizadas tanto por organismos eucariotas como procariotas, pues son

compuestos que producen tanto humanos como otros mamíferos, insectos, plantas, humanos y otros animales y microorganismos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos (52).

Con el paso de las investigaciones sobre estas compuestas han ido en creciente y gracias ellos también sabemos que son parte de la respuesta inmune innata, se pueden clasificar como polipéptidos, casi ninguno de ellos supera los 200 aminoácidos y hoy en día cuenta con una clasificación basada en su estructura y composición (52).

En total se puede agrupar a los péptidos en cinco categorías, siendo las siguientes: péptidos aniónicos, péptidos catiónicos lineales de hélice alfa, péptidos catiónicos enriquecidos por aminoácidos específicos, péptidos catiónicos y aniónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro y finalmente péptidos catiónicos y aniónicos que son fragmentos de proteínas mayores; Holotricina-3 se encuentra dentro de la clasificación de los péptidos catiónicos enriquecidos por aminoácidos específicos (53).

### **5.1.5.3.Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos**

Su mecanismo de acción se basa en las propiedades catiónicas y anfipáticas que poseen los péptidos, dicha cualidades le permiten o les facilita al mismo la creación de poros en la membrana externa generando así una lisis del microorganismo y aumentando la permeabilidad de la misma (5,52).

Se han descrito siete mecanismos de acción de los PAM's, entre ellos están las interacciones con la membrana externa, función de inmunomoduladores, formación poros membranales de diferentes formas, mecanismos de agregado, también

interactúan con el ADN y proteínas relacionadas y de la misma manera alteran la síntesis y plegamiento de proteínas (53).

Por la misma capacidad de crear alteraciones en la membrana los microorganismos no han podido generar algún tipo de resistencia, pues ello representaría realizar un gran cambio en la membrana celular (5).

En los humanos la denominación que reciben los PAM's son defensina, han sido tan bien estudiadas y se relacionan tanto con el sistema inmune que como mecanismo de acción está incluida su activación; La activación toma lugar luego de que los genes que codifican los péptidos son activados -los puede activar fragmentos de peptidoglicanos- posteriormente, hay una interacción con los lipopolisacáridos (LPS) con el complejo CD14- proteína de unión a LPS y con los receptores tipo Toll, -TLR4 o TLR2- y la molécula MD-2 provocando una señalización (53).

En la actualidad se ha llevado a cabo una serie de estudios con tan buenos resultados que ya podemos encontrar algunos PAM's circulando en el mercado farmacéutico con enfermedades específicas a tratar, se muestra a continuación una tabla con ejemplos (5).

**Tabla 5.** Compañías involucradas en el desarrollo de péptidos (5).

Nombre de la compañía	Nombre del péptido	Enfermedad a tratar y desarrollo clínico
Magainin Pharmaceuticals Inc (PA, USA)	Pexiganan	Úlceras infectadas de pie diabético (fase III, uso local)
Micrologix Biotech Inc. (Vancouver, Canada)	MBI-594AN MBI-226	Acné (fase III, uso local ), terminada. Sepsis causada por catéteres (fase III, uso local).
Intrabiotics (Mountain View, CA, USA)	Iseganan (IB-367; protegerina)	Mucositis (fase II, uso tópico-oral fallido)
Intrabiotics (Mountain View, CA, USA)	Iseganan (IB-367; protegerina)	Infecciones pulmonares en fibrosis quística (fase II, uso local inhalativo).
Xoma Corp. (Berkeley, CA, USA)	Neuprex	Meningitis (fase III, uso sistémico).
Demegen (Pittsburg, PA, USA)	P-113 (análogo de histatina) D2AD21	Candidiasis oral, mucositis (fase II, uso oral) Heridas de quemaduras, heridas infectadas (fase I uso local).
Cubist Pharmaceutical (Lexington, USA)	Daptomicina	Sepsis (fase III)
AM (Pharma, Bilthoven, Holanda)	Lactoferricina-B	Antimicótico (fase preclínica, uso sistémico)
Entomed (Illkirch, Francia)	Heliomicina	Antibacteriano (fase preclínica, uso sistémico)
Trimeris (Durham, NC, USA)	Enfuvirtide	Antiviral (HIV) (fase III completada)

### 5.1.6. *Holotrichia diomphalia*

*H. diomphalia* es un coleóptero que pertenece a la familia de los escarabajos y está específicamente es conocido en el este de Asia como el escarabajo negro más grande del noreste. Este insecto toma relevancia ya que puede causar daños en los cultivos de maíz, soja e incluso afectar cultivos de frutas y verduras. Cabe resaltar que es un problema que solo se presenta en dicho continente pues la presencia de este animal no ha sido reportada en otros países (54).

Por otra parte, hay varios estudios que hablan sobre las principales posibles propiedades benéficas que tiene este insecto, como por ejemplo los efectos de las larvas sobre fibrosis hepática y la hepatotoxicidad, la actividad anticoagulante y además se han aislado y caracterizado un glico glicerolípido y una profenoloxidasas de la hemolinfa de las mismas (55–58).

**Tabla 6.** Taxonomía de *H. diomphalia* (59)

Reino	Animalia
Filo	Artrópodos
Subfilo	Hexápodos
Clase	Insectos
Orden	Coleópteros
Familia	Escarabajos
Género	<i>Holotrichia</i>
Especie	<i>Holotrichia diomphalia</i>

### **5.1.7.HOLOTRICINA-3**

#### **5.1.7.1.Definición**

La Holotricina-3 es un PAM caracterizado por ser una molécula hidrófila sin un dominio hidrófobo sintetizada en la hemolinfa del coleóptero *H- diomphalia*, en respuesta a una infección; con un tamaño de 104 aminoácidos, catiónico, no lineal, sin Cis y con alta proporción de ciertos aminoácidos (Glicina e Histidina) (5,53).

Actualmente la Holotricina-3 cuenta con dos homólogos, Holotricina-1 y Holotricina-2 cada uno de ellos con una actividad inhibitoria aparentemente diferente (6,9). En este caso particular se ha demostrado que Holotricina-3 tiene una actividad antifúngica y una gran afinidad por la proteína de membrana Bgl2p de *C. albicans* (11).

#### **5.1.7.2.Usos y aplicaciones**

El primer reporte acerca del PAM Holotricina-3 fue en el año de 1995 por So Young

Lee y colaboradores; ellos llevaron a cabo la purificación de este compuesto a partir de hemolinfa del coleóptero *H. diomphalia*, sin embargo, cabe destacar que estos mismos autores realizaron dos publicaciones anteriores a la mencionada, donde aislaron y purificaron los homólogos conocidos como Holotricina- 1 y Holotricina-2. Lo que aquellos investigadores destacaron de estos péptidos es que aparentemente tiene una actividad inhibitoria diferente, pues mientras Holotricina-3 se considera un PAM antifúngico, Holotricina- 1 y Holotricina-2 inhiben el crecimiento de bacteria Gram negativas y Grampositivas respectivamente (6,9,10).

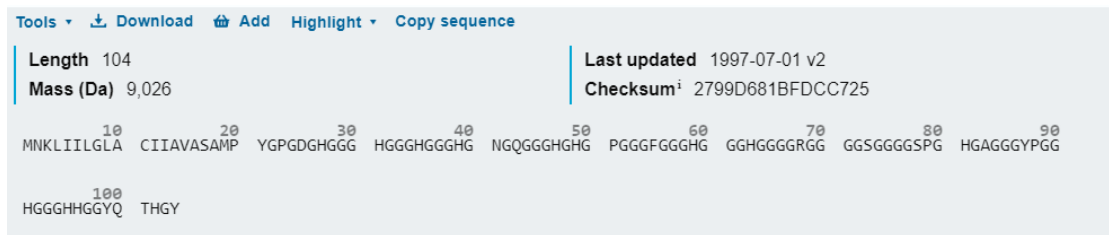
Actualmente se cuenta con un estudio *in silico* publicado en donde realizan una caracterización, identificación y un análisis de a nivel molecular de la interacción de Holotricina-3 con proteínas de la pared celular de la levadura *C. albicans*. Las proteínas elegidas en esa investigación fueron Kre9p, Bgl2p, Xog1p, Eng1p y quitinasas, la razón de su elección es que se sabe que estas proteínas forman parte integral de la pared celular de este microorganismo (11).

El principal objetivo de este artículo fue analizar la unión a nivel molecular de la Holotricina-3 contra las proteínas antifúngicas; la metodología se llevó a cabo en varios pasos, la primera fue la identificación del sitio de unión a proteína diana y el péptido, seguido de una validación de estructuras y predicción de sitios activos, para luego identificar los ligandos de las moléculas, y luego recuperar los receptores objetivo (11).

Simultáneamente hicieron modelamiento de homología, para finalmente hacer un análisis de acoplamiento y simulación dinámica molecular. El resultado de este estudio encontró que Holotricina-3 tenía mayor unión con Bgl2p y que estos hallazgos podrían ser usados en estudios in vivo (11).

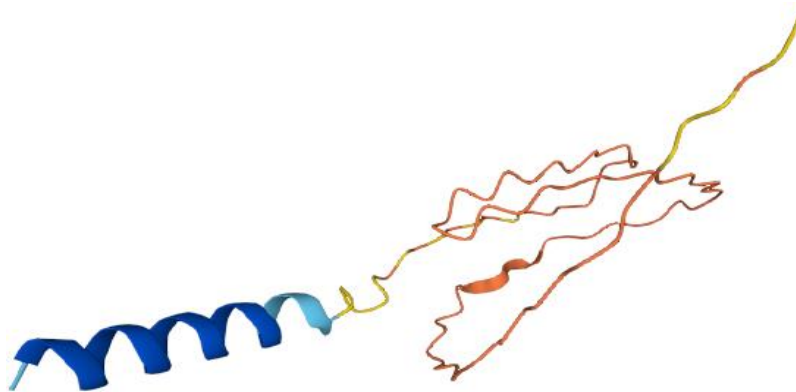
### 5.1.7.3. Secuencia de aminoácidos de Holotricina-3

La secuencia de aminoácidos del polipéptido Holotricina-3 consta de un total de 84 residuos más otros 20 aminoácidos (al inicio de la cadena), que corresponden al péptido señal, este mismo empieza con una metionina en la posición número uno y termina con una prolina en la posición número 20.



**Figura 4.** Secuencia de aminoácidos de Holotricina-3 obtenida del Uniprot.

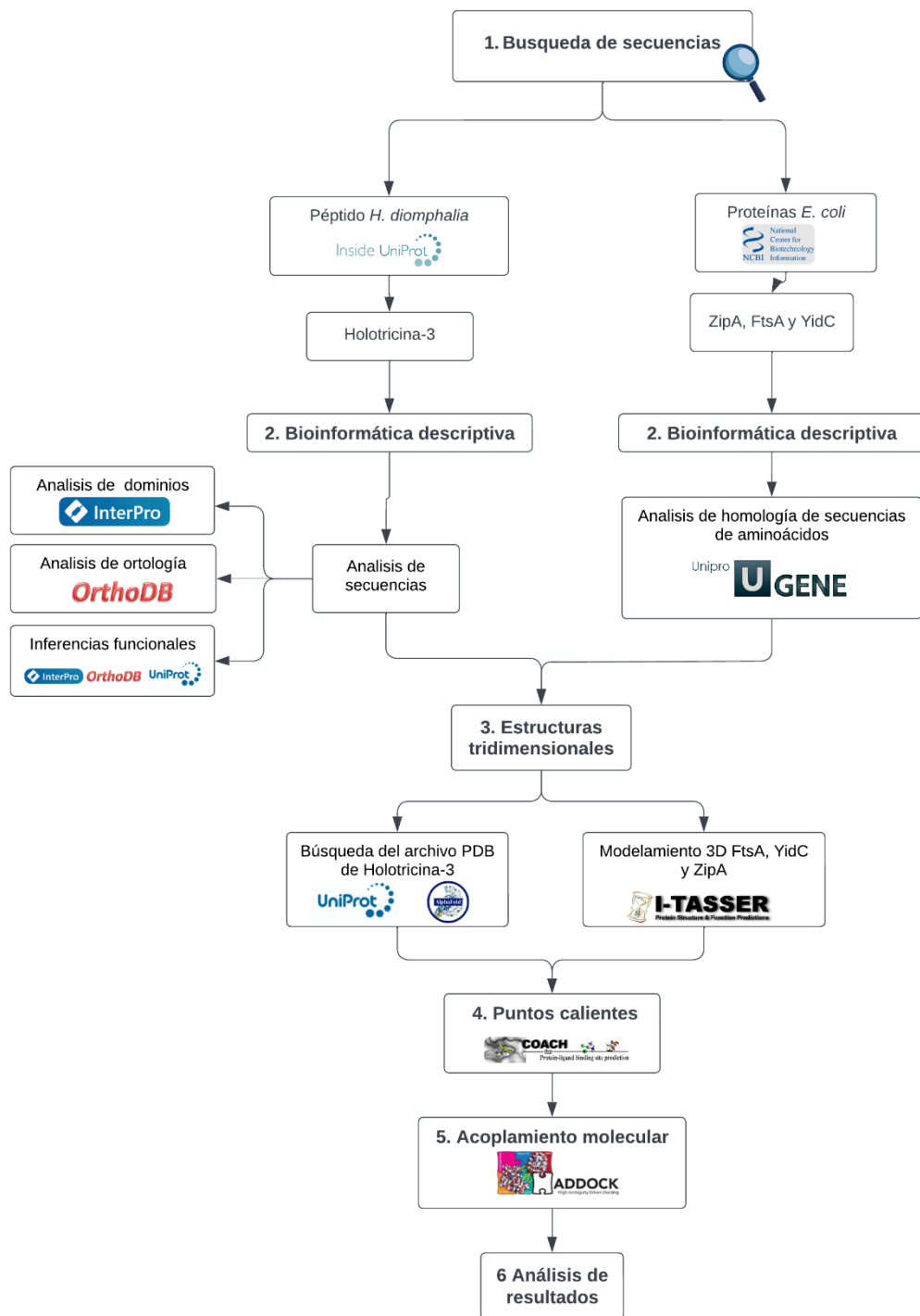
### 5.1.7.4. Estructura tridimensional de la Holotricina-3



**Figura 5.** Estructura tridimensional de la Holotricina-3 modelada en Swiss-Model.

Elaboración propia

## 6. DISEÑO METODOLÓGICO



**Figura 6.** Flujograma de trabajo

### 6.1. Búsqueda de secuencias

### **6.1.1. Búsqueda de secuencias de aminoácidos de FtsA, YidC, ZipA**

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *E. coli* se obtuvieron de la base de datos **Genbank** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (60), filtrando la información únicamente por proteínas, una vez hecho esto se usaron los términos “*E. coli*” y “FtsA” para precisar la búsqueda en cada proteína. Posteriormente, se descargó las secuencias de aminoácidos en formato de texto plano (.fasta) para su posterior análisis y uso.

### **6.1.2. Búsqueda de secuencias aminoácidos Holotricina-3**

Para las secuencias de Holotricina-3 y sus respectivos homólogos se usó la base de datos de **Uniprot** (<https://www.uniprot.org/>) (61–63) y **Alphafold** (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (64,65), donde se descargó el formato de archivo del Protein Data Bank (PDB) que es un formato de archivo de texto que describe las estructuras tridimensionales de las moléculas contenidas en el Protein Data Bank.

## **6.2. Bioinformática descriptiva**

Luego, con la información obtenida desarrollamos la bioinformática descriptiva que consistió en un análisis de secuencias, homología, dominios y función de los dos compuestos.

### **6.2.1. Análisis de secuencias de aminoácidos de Holotricina-3**

El análisis de las secuencias de aminoácidos se realizó tanto por ortología y dominios en dos servidores en línea distintos y con ello se logró hacer inferencias funcionales del péptido.

### **6.2.2. Análisis de ortología de Holotricina-3**

Para buscar los péptidos ortólogos de Holotricina-3 se subió la secuencia de aminoácidos al servidor de **Ortho Database** (<https://www.orthodb.org/>) (66) que proporciona anotaciones funcionales tentativas de grupos ortólogos y su mapeo a categorías funcionales. A partir de esa información se elaboró un esquema piramidal que compactara los datos obtenidos y así mejorar la comprensión.

### **6.2.3. Análisis de dominios de Holotricina-3**

Finalmente, para la búsqueda de dominios representativos se usó **InterProScan** (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (67) subiendo de igual manera la secuencia de aminoácidos en dicho sitio que utiliza modelos predictivos, conocidos como firmas, proporcionados por varias bases de datos diferentes (denominadas bases de datos miembro) que conforman el consorcio InterPro, para la búsqueda de dominios.

### **6.2.4. Interferencias funcionales de Holotricina-3**

Las inferencias funcionales se realizaron no solo en base a la literatura, si no de datos como a la categoría funcional, procesos biológicos, similitudes en secuencias y dominios que ofrece, **IntreProScan**, **Uniprot** y **OrthoDB**.

## **6.3. Análisis de homología de las secuencias de proteínas de *E. coli***

El análisis de homología de las proteínas de *E. coli* se desarrolló a través de un alineamiento múltiple en el software UniProt UGENE por medio de la herramienta “*Multiple Sequence Alignment – Align With MUSCLE*”, con el fin de verificar que estas proteínas no presentan modificaciones en diferentes cepas de la bacteria y pueden ser un buen blanco terapéutico.

## **6.4. Estructura tridimensional de proteínas de *E. coli* y Holotricina**

#### **6.4.1. Modelamiento 3D de FtsA, ZipA, YidC**

En relación con las estructuras 3D de las proteínas de *E. coli*, se modelaron en base a la secuencia de aminoácidos obtenida del Genbank que está contenida en el archivo .fasta, en el programa **I-TASSER** (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) (68) el cual requería precisamente de este tipo de archivo para su ejecución.

#### **6.4.2. Búsqueda de modelos 3D de Holotricina-3**

Para Holotricina-3 se descargó directamente el archivo PDB **AlphaFold** y/o **Uniprot** ya que estas plataformas tienen la secuencia del péptido altamente curadas y sin ningún tipo de mutagénesis.

#### **6.5. Identificación de sitios activos de Holotricina-3 y proteínas de E. coli**

Una vez obtenido los resultados del modelamiento de las moléculas o el archivo PDB, este se cargó al sitios web que se encargan de buscar los sitios activos o los puntos calientes, dicha plataforma fue **COACH** (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/COACH/>) (69), que básicamente realiza su el análisis en un conjunto de datos en línea que habla sobre las funciones biológicas de las distintas moléculas.

#### **6.6. Acoplamiento molecular por Haddock 2.4**

Se utilizó el servidor **HADDOCK 2.4** (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>)) (70) para evaluar el acoplamiento molecular entre las proteínas de *E. coli* y Holotricina-3. Para optimizar los parámetros de entrada de **HADDOCK** se seleccionó la opción de análisis denominada “Protein or Protein-Ligand” y se seleccionaron las estructuras tridimensionales de las proteínas de *E. coli* como macromoléculas (Protein) y las estructuras tridimensionales de Holotricina-3 previamente obtenidas como ligandos (Protein-Ligand). Los residuos de aminoácidos referentes a los

sitios activos FstA, ZipA y YidC se seleccionaron como entrada para el análisis, lo que permitió realizar un acoplamiento dirigido sobre los sitios de unión. Asimismo, como control del análisis, se realizó un ensayo de acoplamiento en ciego, es decir, sobre todos los residuos de aminoácidos de estas proteínas, con el fin de visualizar si Holotricina-3 se acoplaba a una región diferente a las de los sitios activos.

Finalmente, las interacciones entre estas moléculas se visualizaron con el software Pymol (<https://www.pymol.org>).

## 7. RESULTADOS

### 7.1.1. Búsqueda de secuencias

#### 7.1.1.1. Búsqueda de secuencias de aminoácidos de Holotricina-3, FtsA, YidC y ZipA

En el GenBank se encontraron diversas secuencias de las proteínas FstA, YidC y ZipA de diferentes cepas de *E. coli* el tamaño de las secuencias fue homogéneo. Se seleccionaron 10 secuencias por proteína y con éstas se realizó el análisis de homología. Por su parte, en Uniprot se encontraron 188 secuencias de Holotricina de diversos organismos. La tabla 7 describe los resultados de búsqueda de este péptido.

**Tabla 7.** Secuencias de aminoácidos de Holotricina-3 en diversos grupos taxonómicos

<b>Organismo o grupo taxonómico</b>	<b>Cantidad de secuencias</b>
Bacterias	124
Plantas	20
Artrópodos	32
Hexápoda – insectos	28

Es importante resaltar que en la búsqueda de secuencias de Holotricina-3 y sus homólogos, los datos obtenidos abarcaron diferentes grupos taxonómicos, donde el

65% pertenece al dominio bacteria y un 35% al dominio eucariota; dentro de este último dominio hay secuencias que pertenecen a plantas, insectos y otros metazoos.

### **7.1.2. Bioinformática descriptiva**

#### **7.1.3. Análisis de secuencias Holotricina-3**

##### **7.1.3.1. Análisis de ortología de Holotricina-3 y posibles inferencias funcionales**

Se encontró que Holotricina-3 cuenta con dos homólogos (Holotricina-1 y Holotricina-2) que no solo son sintetizado por el mismo organismo si no que, tal parece que los tres péptidos son defensinas con actividad antimicrobiana especie-específica y que respecto a sus tamaños las tres oscilan entre los 43 y 127 aminoácidos

Además, otro de los hallazgos fue de del péptido denominado Tecnicina-3, el cual por sus características funcionales es un posible ortólogo de Holotricina. Esta molécula tiene un tamaño de 96 aminoácidos y es producida por la especie *Tenebrio molitor* que además de ser un Coleóptero es conocido como gusano de la harina. La función biológica de esta molécula es similar a la de Holotricina, es decir, funciones de defensa contra hongos, en este caso *C. albicans*.

Por último, la búsqueda de ortólogos en Ortho DB demostró ser congruente con los dominios, pues exhibió a las Knottinas producidas por los aculeados que es el infra orden al que pertenecen las avispas, abejas y hormigas, como un ortólogo.

##### **7.1.3.2. Análisis de dominios de Holotricina.**

Respecto a la actividad biológica de Holotricina-3, el análisis obtenido por Inter Pro Scan reveló que este péptido cuenta con dos dominios funcionales, el primero, denominado “*Non cytoplasmic domain*” el cual tiene funciones de interacción, permitiendo a Holotricina-3 detectar y responder ante señales externas. El otro

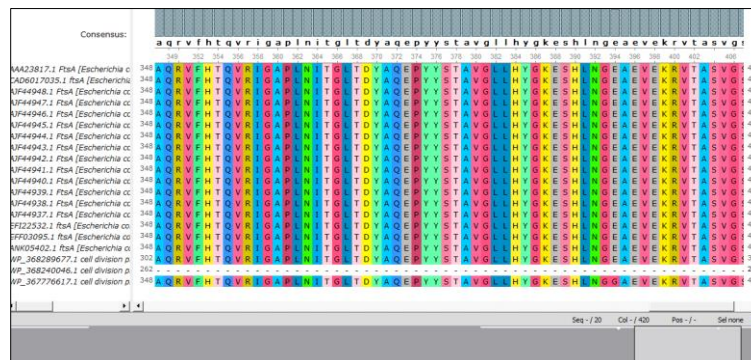
dominio, denominado “Disorder domain” el cual abarca más del 80% de la proteína. Este dominio está asociado con la flexibilidad de la proteína, lo cual le permite adoptar múltiples conformaciones estructurales facilitando la interacción de ésta con una amplia gama de moléculas.

Holotrina- 1, fue quien demostró tener como gran dominio representativo las defensinas de invertebrados, específicamente de insectos y guarda una gran similitud con el dominio de las Knottinas que producen los escorpiones.

Por último, Holotricina-2 fue quien tuvo la menor cantidad de dominios, siendo el principal el de las Coleopterinas que es un grupo de proteínas de insectos que son activas contra bacterias, también se observó un dominio no citoplasmático y uno desordenado en el 32% de la proteína.

## 7.2. Análisis de homología de secuencias de aminoácidos de *E. coli*

Una vez descargadas las secuencias en formato fasta de las proteínas blanco de *E. coli* se realizó un alineamiento por medio de la plataforma Ugene, las proteínas de *E. coli* fueron homólogas con porcentajes de identidad del 99,8% lo cual sugiere que podrían ser un posible blanco molecular ante fármacos.



**Figura 7.** Alineamiento de diferentes secuencias de FtsA.

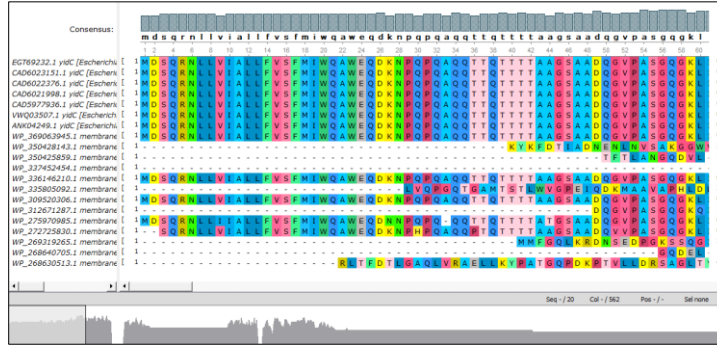


Figura 8. Alineamiento de diferentes secuencias de YidC.

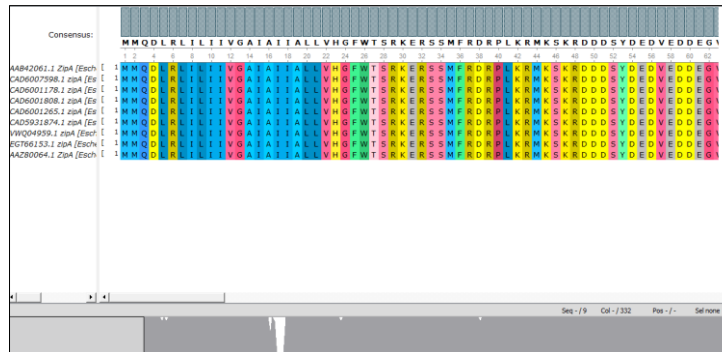
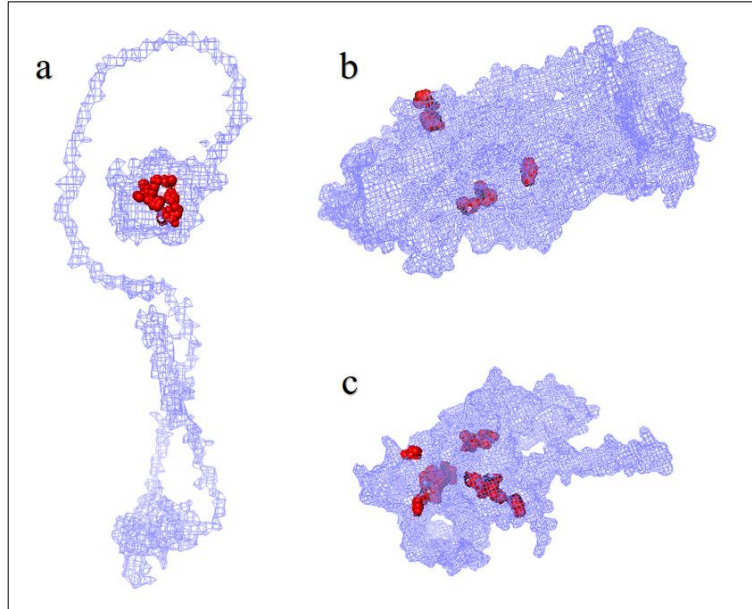


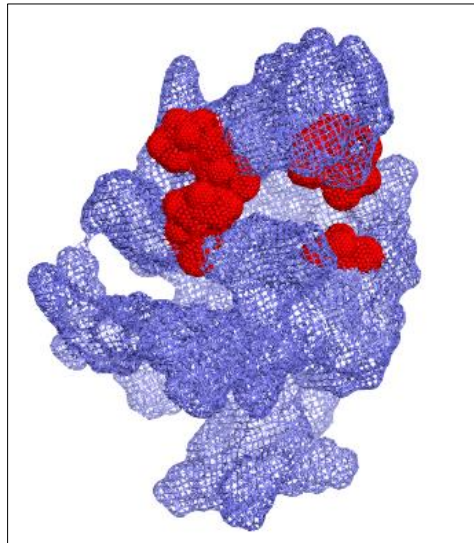
Figura 9. Alineamiento de diferentes secuencias de ZipA.

### 7.3. Identificación de sitios activos



**Figura 10.** Sitios activos de FtsA, YidC y ZipA.

En azul la proteína y en rojo los sitios activos. **a.** ZipA **b.** YidC **c.** FtsA

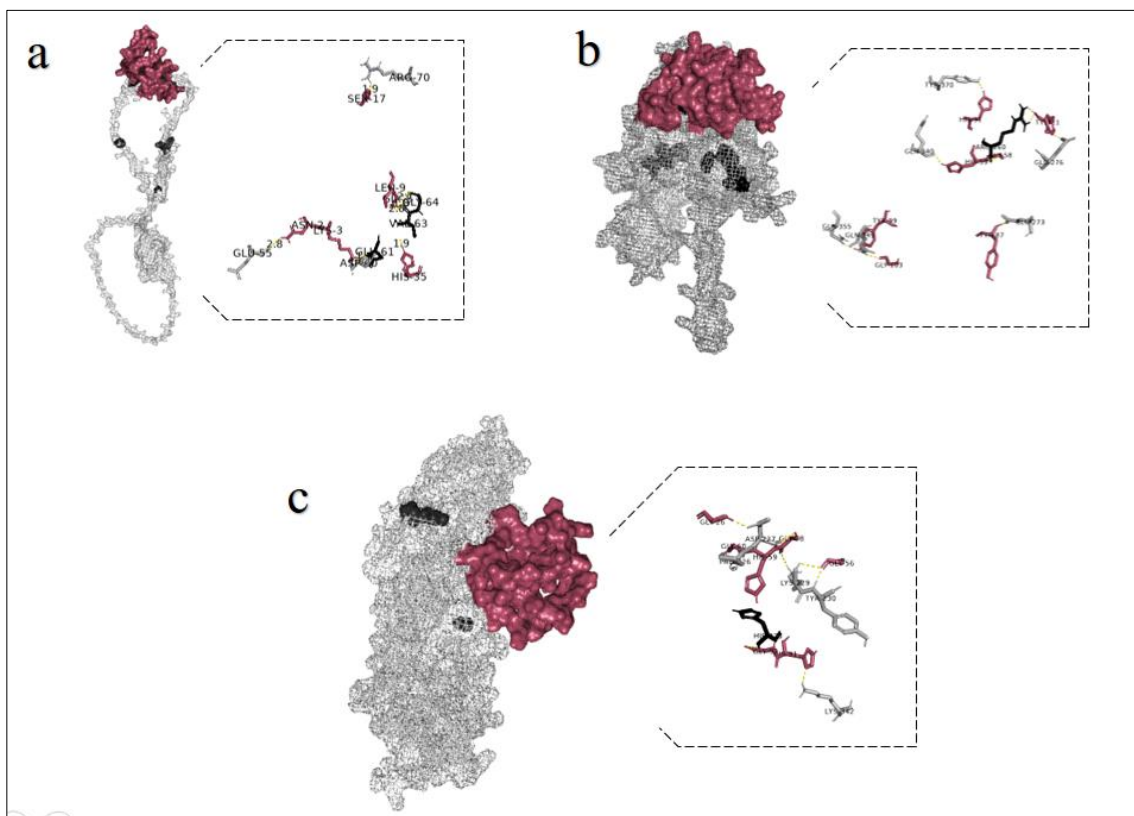


**Figura 11.** Sitios activos de Holotrcina-3.

En azul la proteína y en rojo los sitios activos

## 8. Acoplamiento molecular

Los resultados del acoplamiento molecular por medio del Docking se describen en la (Tabla 8) en la cual se visualizan tipos de uniones y las energías de afinidad. Los datos muestran energías de afinidad bajas lo que supone una adecuada interacción entre las proteínas de *E. coli* y Holotricina-3. Asimismo, la (Figura 12) muestra el sitio de interacción de estas moléculas y los aminoácidos involucrados en el acoplamiento.



**Figura 12.** Acoplamiento molecular de las proteínas de *E. coli* y Holotricina-3. En rosado Holotricina-3 y en gris las proteínas de *E. coli*. **a.** Se muestra acoplamiento molecular de

ZipA de *E. coli* y Holotricina-3 de *H. diomphalia*. **b.** Se muestra acoplamiento molecular de FtsA de *E. coli* y Holotricina-3 de *H. diomphalia*. **c.** Se muestra acoplamiento molecular de YidC de *E. coli* y Holotricina-3 de *H. diomphalia*..

**Tabla 8.** Parámetros obtenidos en Haddock

<b>Parámetro</b>	<b>ZipA</b>	<b>YidC</b>	<b>FtsA</b>
<b>Puntuación Haddock</b>	46.7 +/- 16.4	53.8 +/- 22.3	5.9 +/- 10.1
<b>Tamaño del clúster o número de estructuras agrupadas</b>	7	4	12
<b>RMSD de la estructura general de menor energía</b>	10.5 +/- 0.1	16.3 +/- 0.1	10.5 +/- 0.0
<b>Energía de Van der Waals</b>	-55.3 +/- 4.0	-74.3 +/- 5.1	-96.0 +/- 5.6
<b>Energía electrostática</b>	-174.1 +/- 36.1	-115.3 +/- 30.1	-145.4 +/- 16.9
<b>Energía de solvatación</b>	-9.8 +/- 0.5	-33.3 +/- 2.1	-25.0 +/- 3.4
<b>Restricciones violatorias de energía</b>	1467.6 +/- 172.2	1843.8 +/- 146.8	1560.3 +/- 79.5
<b>Área de superficie enterrada</b>	1752.4 +/- 54.2	2000.9 +/- 88.3	2654.1 +/- 117.8
<b>Puntuación Z</b>	-1.1	-1.9	

El acoplamiento molecular de cada una de las proteínas con Holotricina-3 demostró tener resultados muy similares entre ellas, pues el número de residuos que interactuaban entre si variaban entre diez y quince, además en todos los hallazgos el acoplamiento se dirigió sobre al menos uno de los aminoácidos que se predijo que era parte de los sitios activos de las proteínas, sin embargo, es importante mencionar que el acoplamiento molecular entre FstA y Holotricina-3 fue el que tuvo un mayor número de interacciones.

### **8.1.1.Puntuación Haddock**

El servidor saca esté resultado de la suma ponderada de trece parámetros distintos entre los cuales encontramos energías, radios, ángulos de proyección y demás, sin embargo, no es

un indicador de afinidad de enlace, por cual no se puede establecer si un valor negativo o positivo es un mal o buen puntaje en el cual basarse para escoger un clúster,

### **8.1.2.Tamaño del clúster o número de estructuras agrupadas**

El tamaño del clúster hace referencia a el número de modelos que Haddock agrupo durante el acoplamiento, la desviación de la medida cuadrática (RMSD) es un resultado que compara la estructura general de menor energía contra los otros modelos que agrupo dentro del mismo clúster.

### **8.1.3.Energías de Van der Waals, electrostáticas y solvatación**

Por otra parte, la energía de Van der Waals mide las fuerzas de interacción entre mis dos moléculas mientras que, la energía de interacción entre cargas es la misma energía electrostática y la energía de solvatación es aquella requerida para que mi compuesto interactúe en una solución; así mismo entre menor sea el valor negativo de estas energías en conjunto, mayor será la estabilidad de interacción.

### **8.1.4.Restricciones violatorias de energía y Área de superficie enterrada**

Las restricciones violatorias de energía hacen alusión a las propias limitaciones energéticas que ponen el programa para que el acoplamiento sea lo más real posible y que las moléculas no se lleguen a separar tanto que pierda estabilidad la unión. Por último, el área de superficie enterrada es aquella parte de mi interacción que está expuesta y no la ocultan otras moléculas por lo cual es aquella porción que puede interactuar como otros componentes o solventes.

### **8.1.5.Puntuación Z**

El puntaje z es un valor estadístico que indica cuántas desviaciones estándar hay entre el puntaje obtenido en el clúster respecto al el puntaje promedio de todos lo acoplamientos realizados.

## **9. DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo, fue caracterizar la acción bactericida de Holotricina-3 un péptido contra proteínas blanco de *E. coli*, en busca de nuevas alternativas terapéuticas para las infecciones causadas por esta bacteria; una de las razones principales de esta investigación, es que este microorganismo se postula como un patógeno crítico según la OMS, de no ser tratado de forma eficaz puede ocasionar graves problemas en el paciente e incluso su muerte (2).

Se confirmó con alineamiento por Ugene que independientemente de la cepa de *E. coli*, al menos las proteínas asociadas a la división celular son altamente conservadas (ZipA y FtsA) no solo es *E. coli* si no en otras bacterias también (31), lo cual las convierte en grandes candidatas de proteínas blanco para enfocar los medicamentos hacia estas.

Por otro lado, el acoplamiento entre Holotricina-3 y ZipA se dirigió básicamente hacia los aminoácidos cargados de la proteína lo cuales interfieren en la estabilización de una proteína (71) y se ha mostrado en otros estudios que son importantes en algunas interacciones (72). Por el contrario, si se observa el acoplamiento entre Holotricina-3 y YidC se puede notar que la interacción se da en el gran dominio periplásmico de YidC que es P1; hay varios autores que plantean P1 no es importante para que lleve a cabo sus funciones (38,40), y finalmente hay estudios que parecen demostrar que con la eliminación de ciertos residuos pierde su función como insertasa (39).

En cuanto a la interacción que se dio entre FtsA y Holotricina-3 fue la que más residuos de aminoácidos incluyó, sin embargo, falta información para esclarecer que función tienen estos aminoácidos, sin embargo, debido a la importancia que tiene esta proteína para en el anclaje de FtsZ a la membrana, puede que cualquier interacción con FtsA interfiera en el septación bacteriana y la división celular no se lleve a cabo con éxito (73).

Holotricina-3, demostró en los tres acoplamientos que uso una gran variedad de aminoácidos que iban desde el número dos hasta el último de sus residuos; estos son resultados que corresponden a lo descrito por autores como Cuevas C y colaboradores (74) quienes afirman que las proteínas intrínsecamente desordenadas son pequeñas, de baja complejidad y ricas en aminoácidos como la glicinas y estas características corresponden a las Holotricina-3.

Adicionalmente, la presencia de un dominio desordenado no significa que Holotricina-3 forme uniones inestables, pues Ripu D y colaboradores mostraron *in silico* que este péptido es estable cuando se une a Bgl2p gracias a sus bajas energías de unión, este estudio también reveló que las energías entre el acoplamiento son de igual manera negativas, En comparación a nuestra investigación las proteínas usadas no fueron de membrana, sin embargo, se obtuvieron resultados similares ya que energías como Van Der Waals y electrostáticas también dieron negativas.

Finalmente, Lee et al, demostraron *in vivo* que los homólogos de Holotricina-3 tienen actividad inhibitoria contra las bacterias, y que Holotricina-3 actúa contra *C. albicans*, mientras que los resultados de este estudio muestran que también Holotricina-3 también es capaz de interactuar con proteínas bacterianas y no solo fungicidas, lo cual podría dar a

entender que es funcional con ambos tipos de microorganismo, característica que es posiblemente por su gran dominio desordenado.

## **10. CONCLUSIONES**

1. Las proteínas FstA, YidC y ZipA son homologas en todas las cepas de *E. coli* con un porcentaje de identidad del 99,8% sugiriendo que estas moléculas pueden ser blancos terapéuticos con la bacteria.
2. El péptido Holotricina-3 presenta diversos ortólogos en otros grupos taxonómicos presentando funciones similares de defensa ante agentes infecciosos.
3. El acoplamiento molecular entre las proteínas de *E. coli* y Holotricina-3 presentó valores bajos de energía de afinidad, sugiriendo una interacción adecuada entre estas moléculas.
4. El acoplamiento de Holotricina-3 con la proteína FstA fue el que presentó la mayoría de las interacciones entre los residuos de aminoácidos, sugiriendo su uso como primera alternativa para ensayos *in vitro*.

## **11. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES**

Se sugieren estudios adicionales bioinformáticos y de laboratorio sobre el péptido Holotricina-3 que permitan obtener secuencias, datos, entre otros. Esto con el fin de poder evaluar este compuesto como una posible opción terapéutica ante infecciones por *E. coli*. Asimismo, con la información disponible en las bases de datos realizar análisis más robusto con el uso de un mayor número de herramientas computacionales que permitan establecer una línea base de investigación en este campo.

## 12. ANEXOS

Anexos	
1. Glosarios	Definición de palabras claves usadas en el documento, para mejorar el entendimiento de los distintos conceptos
2. Encuentro internacional y semana de investigación modalidad póster – FABA UDES	Incluye la presentación del póster como propuesta de investigación y certificado de ponencia,

### GLOSARIO

**Serotipo:** Es la clasificación que permite diferenciar a nivel subespecie un microorganismo infeccioso, es dado según sus características antigénicas distintivas las cuales se determinan mediante pruebas serológicas (75).

**Serogrupo:** Es la diferenciación de las subespecies de un microorganismo determinada por el lipopolisacárido y/o el antígeno “O”. En E. coli el antígeno “O” es quien determina el serogrupo y la combinación del antígeno “O” y “H” indica el serotipo (75).

**Patotipo:** Agrupación de un agente infeccioso de acuerdo al fenotipo, presentación clínica y sobre todo a sus mecanismos de patogenicidad, es decir factores de virulencia como la cápsula, enzimas, toxinas entre otros (76).

**Plásmido:** Es una molécula de AND extracromosómico, circular o lineal de doble hélice que se distingue por su pequeño tamaño que varía entre 1 a 250 kb, por replicarse de manera independiente y su capacidad de integrarse en el cromosoma de otros organismos.

**Hep-2:** Human Epidermoid Cancer Cells por su nombre en inglés, es una línea de células tumorales ampliamente usadas en la investigación, que se aislaron por primera vez luego

de inocular con el tejido de carcinoma epidermoide proveniente de un paciente de 56 años a ratas jóvenes (77).

**HeLa:** Fue el primer cultivo celular inmortal neoplásico humano en la historia, que se aisló del cáncer de cuello uterino de la paciente Henrietta Lacks, de allí las siglas de esta línea celular. Actualmente es uno de los cultivos celulares más famosos y más empleados en los laboratorios de todo el mundo (78).

**Aglutinación:** Se conoce así a la reacción inmunológica que se da cuando una aglutinina o anticuerpo se une a su respectiva antígeno, esto da como resultado una agregación celular bien sea in vivo o in vitro (79) .

### **13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1.Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Pública México. septiembre de 2002;44(5):464-75.

2.WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

3.Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero MDR, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gac Médica México. 19 de febrero de 2020;156(2):3610.

4.Bruno-Rivas S, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Salud Pública México. febrero de 2006;48(1):62-71.

5. Franco RV, López RH, Corrales M, Sánchez T, Rodríguez AI. Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. 2004;
6. Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Natori S, Lee BL. Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol Pharm Bull.* agosto de 1995;18(8):1049-52.
7. Okada M, Natori S. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J.* 1 de junio de 1983;211(3):727-34.
8. CABI. *Holotrichia diomphalia* (northeast larger black chafer). *CABI Compend.* 20 de noviembre de 2019;CABI Compendium:27542.
9. Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J Biochem (Tokyo).* enero de 1994;115(1):82-6.
10. Lee SY, Moon HJ, Kawabata S, Kurata S, Natori S, Lee BL. A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia*: purification, sequencing and determination of disulfide pairs. *Biol Pharm Bull.* marzo de 1995;18(3):457-9.
11. Daman R, Sharma S. In Silico Characterization, Identification, and Molecular-level Analysis of Holotricin-3: A Dynamic Study. *Orient J Chem.* 30 de junio de 2022;38(3):671-5.
12. Chamba VMC, Calero J de los Á, Torres JMA, Moscol GBT. La resistencia antimicrobiana: situación actual. *RECIMUNDO.* 7 de abril de 2019;3(2):307-23.

13. Camacho- Silvas L. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Pública*. 97:e202302013.
14. OMS. Un nuevo informe insta a actuar con urgencia para prevenir una crisis causada por la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
15. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*. 20 de octubre de 2021;10(11):1355.
16. ONU. La OMS alerta de que el desarrollo de nuevos antibióticos está “estancado” | Noticias ONU [Internet]. 2022 [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2022/06/1510742>
17. Jinks T. Por qué es tan difícil desarrollar nuevos antibióticos. *BBC News Mundo* [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-41776539>
18. Cárdenas J, Castillo O, Cámara CD, González V. Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol*. junio de 2018;29-Nº1.
19. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett*. 2020;27(1):4-16.

20. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 14 de septiembre de 2021;22(18):9922.
21. Canet J. Christeyns. 2016 [citado 8 de octubre de 2024]. *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I). Disponible en: <https://www.christeyns.com/es-es/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i-2/>
22. Cabal Rosel A. VISAVET. [citado 8 de octubre de 2024]. Distribución, cuantificación y caracterización de genes de virulencia de *Escherichia coli* en reservorios animales, humanos y medioambientales. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/distribucion-cuantificacion-y-caracterizacion-de-genes-de-virulencia-de-escherichia-coli-en-reservorios-animales-humanos-y-medioambientales/72=152/>
23. Leroux M, Sourby N, Rodrigo-Reyes L. Dynamics of Proteins and Macromolecular Machines in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* [Internet]. 1 de junio de 2021 [citado 8 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.esp-0011-2020#B4>
24. Vila Estapé J, Zboromyrska Y. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterol Hepatol*. 1 de febrero de 2012;35(2):89-93.
25. Gómez-Duarte OG. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia*. octubre de 2014;31(5):577-86.
26. Braz VS, Melchior K, Moreira CG. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 21 de diciembre de 2020

[citado 8 de octubre de 2024];10. Disponible en:  
[https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-](https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.548492/full)

[microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.548492/full](https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.548492/full)

27.Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. febrero de 2004;2(2):123-40.

28.Rojas S, Lisette W. Caracterización de los perfiles de proteínas de membrana externa (PMEs) de cepas de *Escherichia coli* adherente invasivas (ACAISs) obtenidas desde pacientes con enfermedades de Crohn. 2016 [citado 8 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/183555>

29.Geurtsen J, de Been M, Weerdenburg E, Zomer A, McNally A, Poolman J. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*. 24 de junio de 2022;46(6):fuac031.

30.Morrison JJ, Conti J, Camberg JL. Assembly and architecture of *Escherichia coli* divisome proteins FtsA and FtsZ. *J Biol Chem*. 29 de enero de 2022;298(3):101663.

31.Radler P, Loose M. A dynamic duo: Understanding the roles of FtsZ and FtsA for *Escherichia coli* cell division through in vitro approaches. *Eur J Cell Biol*. 1 de marzo de 2024;103(1):151380.

32.Lee SC, Collins R, Lin YP, Jamshad M, Broughton C, Harris SA, et al. Nano-encapsulated *Escherichia coli* Divisome Anchor ZipA, and in Complex with FtsZ | *Scientific Reports* [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-54999-x>

33. Hale CA, de Boer PAJ. Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure That Mediates Cell Division in *E. coli*. *Cell*. 24 de enero de 1997;88(2):175-85.
34. Moy FJ, Glasfeld E, Mosyak L, Powers R. Solution structure of ZipA, a crucial component of *Escherichia coli* cell division. *Biochemistry*. 8 de agosto de 2000;39(31):9146-56.
35. Mosyak L, Zhang Y, Glasfeld E, Haney S, Stahl M, Seehra J, et al. The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J*. 3 de julio de 2000;19(13):3179-91.
36. Kuchibhatla A, Bhattacharya A, Panda D. ZipA binds to FtsZ with high affinity and enhances the stability of FtsZ protofilaments. *PLoS One*. 2011;6(12):e28262.
37. Hennon SW, Soman R, Zhu L, Dalbey RE. YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J Biol Chem*. 12 de junio de 2015;290(24):14866-74.
38. Dalbey RE, Kuhn A, Zhu L, Kiefer D. The membrane insertase YidC. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 de agosto de 2014;1843(8):1489-96.
39. Xie K, Kiefer D, Nagler G, Dalbey RE, Kuhn A. Different Regions of the Nonconserved Large Periplasmic Domain of *Escherichia coli* YidC Are Involved in the SecF Interaction and Membrane Insertase Activity. *Biochemistry*. 1 de noviembre de 2006;45(44):13401-8.
40. Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A, Mori H, Tanaka Y, Dohmae N, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase | *Scientific*

Reports. Sci Rep [Internet]. 3 de diciembre de 2014 [citado 8 de octubre de 2024];4(7299).  
Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep07299>

41. Aguilar-López JL. Análisis in vivo de las interacciones entre SecY, YidC y FtsY en *Escherichia coli* [Internet]. 2011 [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://ru.dgb.unam.mx/handle/20.500.14330/TES01000680579>

42. Cameron TA, Margolin W. Construction and Characterization of Functional FtsA Sandwich Fusions for Studies of FtsA Localization and Dynamics during *Escherichia coli* Cell Division. *J Bacteriol.* 9 de enero de 2023;205(1):e00373-22.

43. Pichoff S, Lutkenhaus J. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli* | *The EMBO Journal*. *The EMBO journal.* 2002;21:685-93.

44. Barrera Monterroso ML, Matheu JR. Determinación del Perfil de Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* en el Sanatorio privado «Nuestra Señora del Pilar» [Internet]. 2005 [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/library/index.php?title=3288&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@autor=MATHEU,%20JORGE%20RAUL%20@mode=&recnum=5>

45. Treviño NP, Molina NB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana [Internet]. 2022. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>

46. García-Zuñiga CV. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*, en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. [Internet]. 2014. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/2069>

47. Whelan S, Lucey B, Finn K. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. MDPI Microorganisms [Internet]. 28 de agosto de 2023 [citado 8 de octubre de 2024];11(9)(2169). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/9/2169>
48. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011;28(4):648-56.
49. Piña L, Hinostroza K. Mecanismos de resistencia de *Escherichia Coli* en América Latina. Rev Vive. 4 de mayo de 2021;4:203-16.
50. González García M, San Juan Galán J, Morales Vicente FE, Otero González AJ. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. Rev Cubana Med Trop. agosto de 2017;69(2):01-13.
51. Brahmachary M, Krishnan SPT, Koh JLY, Khan AM, Seah SH, Tan TW, et al. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. Nucleic Acids Res. 1 de enero de 2004;32(Database issue):D586-9.
52. Cubillos-Berrío JE, Caycedo Lozano L. Los péptidos antimicrobianos y sus propiedades como macromoléculas. Una revisión sistemática | Biociencias (UNAD). 11 de diciembre de 2020 [citado 30 de abril de 2024]; Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/39535>
53. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. Infectio. marzo de 2010;14(1):55-67.

54. Chen R zhao, Klein MG, Li Y, Li Q yun, Sheng C fa. Japanese beetle lures used alone or combined with structurally related chemicals to trap NE China scarabs (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Asia-Pac Entomol.* 1 de diciembre de 2014;17(4):871-7.
55. Oh WY, Pyo S, Lee KR, Lee BK, Shin DH, Cho SI, et al. Effect of *Holotrichia diomphalia* larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 1 de agosto de 2003;87(2):175-80.
56. Xu X, Liu W, Li W, Liu S. Anticoagulant activity of crude extract of *Holotrichia diomphalia* larvae. *J Ethnopharmacol.* 11 de enero de 2016;177:28-34.
57. Liu WJ, Qiao YH, Wang S, Wang YB, Nong QN, Xiao Q, et al. A novel glycolipid from *Holotrichia diomphalia* Bates: Structure characteristics and protective effect against DNA damage. *Int J Biol Macromol.* 1 de junio de 2024;271:132594.
58. Kwon TH, Lee SY, Lee JH, Choi JS, Kawabata S ichiro, Iwanaga S, et al. Purification and Characterization of Prophenoloxidase from the Hemolymph of Coleopteran Insect, *Holotrichia diomphalia* Larvae. *Mol Cells.* 1 de febrero de 1997;7(1):90-7.
59. *Holotrichia diomphalia* (LACHDI)[Overview] EPPO Global Database [Internet]. [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/LACHDI>
60. National Institutes of Health (NIH) [Internet]. [citado 10 de octubre de 2024]. National Institutes of Health (NIH). Disponible en: <https://www.nih.gov/>

61. Golosova O, Henderson R, Vaskin Y, Gabrielian A, Grekhov G, Nagarajan V, et al. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ*. 4 de noviembre de 2014;2:e644.
62. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 15 de abril de 2012;28(8):1166-7.
63. Rose R, Golosova O, Sukhomlinov D, Tiunov A, Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*. 1 de junio de 2019;35(11):1963-5.
64. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. agosto de 2021;596(7873):583-9.
65. Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res*. 5 de enero de 2024;52(D1):D368-75.
66. Kuznetsov D, Tegenfeldt F, Manni M, Seppey M, Berkeley M, Kriventseva E, et al. OrthoDB v11: anotación de ortólogos en la muestra más amplia de diversidad de organismos [Internet]. 2022. Disponible en: [doi:10.1093/nar/gkac996](https://doi.org/10.1093/nar/gkac996). ID del proyecto:36350662
67. Paysan Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto B, Salazar G, et al. Nucleic Acids Research InterPro en 2022. [Internet]. 2022. Disponible en: noviembre de 2022, (doi: 10.1093/nar/gkac993)

68.Servidor I-TASSER para la predicción de la estructura y función de las proteínas [Internet]. [citado 10 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>

69.COACH: A meta-server based approach to protein-ligand binding site prediction [Internet]. [citado 10 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://zhanggroup.org/COACH/>

70.Honorato RV, Trellet ME, Jiménez García B, Schaarschmidt JJ, Giulini M, Reys V, et al. The HADDOCK2.4 web server: A leap forward in integrative modelling of biomolecular complexes. *Nature Prot., In Press* [Internet]. 2024. Disponible en: <https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>

71.Fuerzas que intervienen en la estructura de las proteínas [Internet]. [citado 11 de octubre de 2024]. Disponible en: [https://www.urv.cat/html/consellsocial/PQDocent/CD%20LLibre%20Qualitat/material/cap06/contenido/UIB/fuerzas\\_proteinas/texto1.htm](https://www.urv.cat/html/consellsocial/PQDocent/CD%20LLibre%20Qualitat/material/cap06/contenido/UIB/fuerzas_proteinas/texto1.htm)

72.Melo MJ. PREDICCIÓN IN-SILICO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA.

73.Krupka M, Rowlett VW, Morado D, Vitrac H, Schoenemann K, Liu J, et al. Escherichia coli FtsA forms lipid-bound minirings that antagonize lateral interactions between FtsZ protofilaments. *Nat Commun.* 11 de julio de 2017;8(1):15957.

74.Cuevas-Velázquez CL, Covarrubias-Robles AA. Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *TIP Rev Espec En Cienc Quím-Biológicas.* 2011;14(2):97-105.

75.DIRECCIÓN DE REDES EN SALUD PÚBLICA, SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE, GRUPO DE MICROBIOLOGÍA, INS. GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Vibrio cholerae*. 2017.

76.*Escherichia Coli* uropatógena, una bacteria peligrosa [Internet]. [citado 11 de octubre de 2024]. Disponible en: [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012\\_443.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012_443.html)

77.NIH. Glosario parlante de términos genómicos y genéticos - Plásmido [Internet]. [citado 11 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Plasmido>

78.Álvarez A. JP. Henrietta lacks. el nombre detrás de las células hela, primera línea celular inmortal humana. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 1 de julio de 2013;24(4):726-9.

79.<https://www.cun.es> [Internet]. [citado 11 de octubre de 2024]. Aglutinación. Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/aglutinacion>