

Péptidos antibacterianos derivados de LfcinB (20-30): Inducción y evaluación de la resistencia bacteriana en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Jennifer González Solano ^{1,†}, Kelin Johana Cuero Amu ², Zuly Rivera Monroy ³, Sandra Mónica Estupiñán ^{1, *}

¹ Departamento de Bacteriología, Facultad de Ciencias de la salud, Sede Bogotá—Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá 110311, Colombia

² Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Sede Bogotá—Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 111231, Colombia

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Sede Bogotá—Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 111231, Colombia

*

Autor a quien deberá dirigirse la correspondencia.

†

Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Resumen

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana y la inducción de resistencia de péptidos derivados de la Lactoferrina bovina (LfcinB) frente a aislados clínicos de *E. coli* y *S. aureus*. Específicamente las moléculas empleadas en el estudio corresponden al motivo mínimo de actividad de la LfcinB (²⁰RRWQWR²⁵), un palíndromo derivado de esta secuencia, y péptidos diméricos derivados de LfcinB(20-30), en los que se hicieron modificaciones estructurales en la secuencia, como el cambio puntal de aminoácidos, reducción de la longitud o introducción de aminoácidos no naturales. Se utilizó el método de microdilución en caldo para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB). Posteriormente, se realizó la inducción de resistencia mediante la exposición continua de las bacterias a concentraciones subinhibitorias (0.25–2 CMI) de los péptidos y antibióticos control (ciprofloxacina, meropenem y vancomicina), evaluando el aumento de la CMI en el tiempo.

Los resultados mostraron que los péptidos modificados, como ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-27)₂ y ²⁶[NaI]-LfcinB (20-30)₂, presentaron mayor eficacia antibacteriana, en los aislados clínicos. Algunos péptidos mantuvieron su actividad durante varios pases, mientras que otros evidenciaron aumentos en la CMI, indicando resistencia inducida, los cuales presentaban características como su estructura similar de secuencias cortas y sencillas de

aminoácidos mientras que los péptidos con modificaciones estructurales como dímeros y con reemplazos en los aminoácidos no se obtuvo resistencia inducida ni cruzada. También se evaluó la estabilidad de dicha resistencia y la posible resistencia cruzada frente a otros péptidos y a los antibióticos. Se observó que algunas cepas mantuvieron niveles elevados de CMI en péptidos y antibióticos sin presión selectiva. Este estudio destaca el potencial de los péptidos derivados de LfcinB como agentes antimicrobianos, pero también advierte sobre la capacidad adaptativa bacteriana ante estos compuestos.

Palabras clave: Resistencia antimicrobianos, péptidos antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias resistentes a múltiples fármacos, ensayo de sensibilidad microbiana.

1. Introducción

El descubrimiento y uso de los antibióticos revolucionó la medicina moderna; sin embargo, su uso indiscriminado ha favorecido la aparición de bacterias multirresistentes (1). *Staphylococcus aureus* mostró resistencia a la penicilina en 1942, lo que llevó al desarrollo de la meticilina en 1960; no obstante, ese mismo año detectaron cepas resistentes, y en 2002 se identificaron aislados con resistencia a vancomicina (2). Por otro lado, *Escherichia coli*, originalmente comensal, ha desarrollado resistencia desde la década de 1930, incluyendo la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC,

Las BLEE son enzimas capaces de hidrolizar una amplia gama de antibióticos β -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, así como monobactámicos como el aztreonam. Estas enzimas son generalmente inhibidas por inhibidores tradicionales como el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, lo que ha permitido el uso de combinaciones antibiótico-inhibidor en ciertos casos clínicos (3).

Por otro lado, las β -lactamasas AmpC son enzimas cromosómicas o plasmídicas que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera a tercera generación y, a diferencia de las BLEE, no son inhibidas por los inhibidores clásicos de β -lactamasas, lo cual representa un desafío clínico mayor (4) (5). Lo que ha limitado las opciones terapéuticas y promovido el uso de antibióticos de última línea como carbapenémicos y polimixinas (6) (7).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae, perteneciente al microbiota intestinal de humanos y animales. Su diversidad genómica le permite actuar como comensal o convertirse en un patógeno oportunista, causando infecciones extraintestinales graves (8) (9) (10). *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, que coloniza la piel y mucosas humanas. Es responsable de infecciones leves o graves, especialmente en entornos hospitalarios debido a su virulencia y creciente resistencia a antibióticos como en los casos de resistencia a la meticilina (SARM) y vancomicina (SAVR) (11) (12) (13).

A nivel clínico, *E. coli* y *S. aureus* son patógenos de alta relevancia en Colombia. Entre 2018 y 2021, según un estudio multicéntrico realizado en 12 ciudades del país, *E. coli* fue el principal agente en infecciones urinarias (56 %) y en sangre (22 %), mientras que *S. aureus* predominó en piel y tejidos blandos (29 %). En UCI, *E. coli* representó el 12 % de los aislamientos y *S. aureus* el 9 %. Durante este período, la resistencia de *E. coli* a cefalosporinas

de tercera generación se mantuvo estable (22 % a ceftriaxona y 10 % a ceftazidima), al igual que la resistencia de *S. aureus* a clindamicina (10 %) y oxacilina (39 %) (14).

La resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*, particularmente en cepas resistentes a meticilina (SARM), se ha asociado con una mayor mortalidad en casos de bacteriemia. Según Cheung et al. (15), en un estudio que incluyó a más de 3.000 pacientes, la infección por SARM incrementó significativamente el riesgo de muerte tanto a corto plazo (7 días) como a largo plazo (90 días). Este hallazgo es consistente con estudios recientes que reportan tasas de mortalidad hospitalaria superiores en pacientes con bacteriemia por SARM en comparación con aquellos infectados con cepas sensibles (16) (17). Factores como la demora en el inicio de un tratamiento antimicrobiano efectivo, combinados debido al uso empírico de glucopéptidos antes de disponer de resultados de sensibilidad, contribuyen al aumento de la mortalidad y la selección de cepas resistentes (15) (18).

Los péptidos derivados de LfcinB han demostrado una potente actividad contra bacterias sensibles y resistentes (19) (20) (21). Un estudio evaluó tres péptidos con el motivo RRWQWR, variando en estructura y número de copias, mostrando una mayor eficacia que LfcinB (17-31) frente *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (22). No obstante, persiste la preocupación sobre su potencial para inducir resistencia (23).

Se ha documentado resistencia bacteriana a péptidos antimicrobianos (PAMs) como a nisina, pexiganan y colistina, incluyendo casos de resistencia cruzada, donde la exposición a un PAM puede generar resistencia a otros incluso con mecanismos diferentes (24). Aunque los PAM presentan un bajo potencial para inducir resistencia en comparación con antibióticos como la norfloxacin o gentamicina, se han reportado casos de resistencia a péptidos antimicrobianos humanos (25) (26) (27).

S. aureus desarrolla mecanismos para resistir a los PAMs: modificación de su membrana mediante el factor de resistencia a múltiples péptidos (MprF), que incorpora lisina y reduce la atracción de PAMs catiónicos. Además, el sistema de proteínas determinantes de superficie (Isd) le permite obtener hierro de la hemoglobina, contrarrestando la acción de la lactoferrina. La esterificación del ácido teicoico con D-alanina, regulada por el operón *dlt*, disminuye la carga negativa de la pared celular y la secreción de aureolisina, una proteasa que degrada péptidos como LL-37 péptido clave del sistema inmune, presente en macrófagos y neutrófilos, facilitando la evasión de las defensas del hospedador (28).

E. coli libera vesículas de membrana que secuestran PAMs, secreta proteasas como OmpT, modifica su lipopolisacárido (LPS) añadiendo grupos cargados positivamente, este proceso es regulado por sistemas de dos componentes como CpxRA, CprRS y PmrAB (29).

Los péptidos derivados de LfcinB (20-30) (RRWQWRMKKLG) contienen residuos catiónicos como arginina (Arg) y lisina (Lys) esenciales para su interacción con componentes cargados negativamente de la pared celular. Adicionalmente, contiene residuos hidrofóbicos como el triptófano (Trp) que permite la interacción con los fosfolípidos de la membrana celular (30). Estos péptidos han mostrado también propiedades anticancerígenas, y antifúngica (19) (31) (32); el péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal}:(RWQWRWQWR) mostró una Concentración mínima inhibitoria(CMI) de 6,25 µM y Concentración mínima inhibitoria (CMB) de 12,5 µM contra *E. coli* confirmando su actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (32) (33). El péptido ²⁶ [F]-LfcinB (20-30)₂

: $(RRWQWRFKKLG)_2K$ -Ahx presentó una CMI de 15 μM contra *E. coli* ATCC 25922, mientras que $^{26} [Nal]$ -LfcinB (20-30) $_2$: $(RRWQWR-Nal-KKLG)_2$ -K-Ahx indicó una CMI de 14,5 μM para *S. aureus* ATCC 29213 (19).

La secuencia LfcinB (20–25): (RRWQWR) corresponde a un fragmento de seis aminoácidos considerado el núcleo activo mínimo de la lactoferricina bovina, con propiedades antimicrobianas atribuibles a su riqueza en residuos catiónicos y aromáticos, como arginina (R) y triptófano (W). Por su parte, la simetría del péptido LfcinB (21–25)_{Pal} (RWQWRWQWR) potencia la interacción con las membranas al permitir una disposición más organizada sobre superficies cargadas negativamente (como las de bacterias o células tumorales). También puede mejorar la estabilidad estructural del péptido y su capacidad para insertarse en bicapas lipídicas (34).

La dimerización de péptidos derivados de LfcinB se realiza con el objetivo de incrementar su actividad biológica. Esta estrategia permite aumentar la densidad de carga positiva y la presencia de residuos hidrofóbicos, lo que mejora la interacción con las membranas celulares. Además, los dímeros exhiben mayor estabilidad frente a proteasas, mejor capacidad de penetración y multivalencia, lo cual se traduce en una mayor afinidad y eficacia terapéutica (35).

La estabilidad de la resistencia se asocia a la transmisión y mantenimiento de genes de resistencia mediante transferencia horizontal (THG) y vertical (TVG). Siendo la THG, más eficiente para diseminar resistencia entre cepas y especies (36) (37).

En ambientes no prístinos, los microorganismos pueden desarrollar o adquirir resistencia antimicrobiana en respuesta a condiciones adversas persistentes o intermitentes. La exposición subletal y prolongada a péptidos antimicrobianos genera estrés ambiental que actúa como presión selectiva, induciendo respuestas adaptativas como modificaciones en la membrana, activación de bombas de eflujo y mecanismos antioxidantes. Estos procesos no solo permiten la supervivencia bacteriana, sino que también pueden favorecer la resistencia cruzada y la persistencia de cepas resistentes en el ambiente (38) (39).

En este estudio se analizaron diversos péptidos modificados derivados de LfcinB. Una de las modificaciones más relevantes fue la sustitución del residuo de metionina (M) en la posición 26 por fenilalanina (F), un aminoácido más hidrofóbico (40). Esta modificación dio origen al péptido $^{26}[F]$ LfcinB (20–30) $_2$, el cual demostró una potente actividad citotóxica *in vitro* frente a líneas celulares de cáncer de mama, con valores de IC₅₀ inferiores a 20 μM (19). Otra modificación incluyó la sustitución de la metionina por 1-naftilalanina (1-Nal), un aminoácido no natural con mayor hidrofobicidad. El péptido resultante, $^{26}[Nal]$ LfcinB (20–30) $_2$, también exhibió una fuerte actividad citotóxica frente a células tumorales (41).

Debido al desafío que representa la resistencia bacteriana a los antibióticos y la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas, este estudio busca evaluar la resistencia bacteriana inducida por péptidos antimicrobianos derivados de LfcinB en aislados clínicos de *S. aureus* y *E. coli*, con el fin de ampliar el conocimiento sobre su potencial uso clínico.

2. Materiales y métodos

Activación bacteriana: Se usaron cepas bacterianas derivadas de aislados clínicos obtenidos en el Instituto Nacional de Cancerología: *Staphylococcus aureus* 109095, *Staphylococcus aureus* 124653, *Escherichia coli* 129797, *Escherichia coli* 1004, *Escherichia coli* 301755, suministrados por el grupo de investigación SAMP.

El almacenamiento de las cepas se realizó a una temperatura de -20°C , usando crioviales que contenían medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Glicerol al 20%, después de la descongelación se tomó una fracción para pasarla a Agar Tripticosa soya (TSA) y ser almacenadas a 4°C como cepa de trabajo.

Concentración mínima inhibitoria:

La CIM de los péptidos derivados de LfcinB se realiza mediante la técnica de microdilución en caldo en placas de 96 pozos, siguiendo las recomendaciones estándar del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (42). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Inicialmente, se distribuyeron 90 μL de caldo Mueller Hinton (CMH) estéril en los pozos B1 a H12 de la placa multipozo (Figura 1). Posteriormente, se agregaron 90 μL del péptido en el primer pozo de la fila B, seguido de diluciones seriadas en base dos a lo largo de la fila, transfiriendo 90 μL de un pozo al siguiente. Las concentraciones finales evaluadas fueron: 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A todos los pozos, con excepción del control de técnica, se les agregó 10 μL de un inóculo bacteriano ajustado previamente a una concentración de 5×10^6 UFC/mL mediante curvas de calibración.

El diseño experimental incluyó cuatro controles, también realizados por triplicado:

Control negativo : 90 μL de CMH, 90 μL de agua destilada estéril y 10 μL de inóculo bacteriano ajustado.

Control positivo : 90 μL de CMH, 90 μL del antibiótico de referencia según el microorganismo (Vancomicina 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Staphylococcus aureus* ; Ciprofloxacina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Meropenem 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Escherichia coli*), más 10 μL de inóculo ajustado. Las concentraciones de antibióticos fueron establecidas conforme a los puntos de corte del CLSI (43).

Control de técnica : 90 μL de CMH y 10 μL de agua peptonada estéril (sin inóculo ni antimicrobiano), para verificar la esterilidad del medio y reactivos.

Control de crecimiento : 90 μL de CMH más 10 μL de inóculo bacteriano, sin presencia de antimicrobianos, para confirmar la viabilidad del cultivo.

Las placas se incubaron a 37°C durante 18–24 horas. La CIM se definió como la concentración más baja del péptido en la cual no se observa crecimiento bacteriano visible, correlacionando con la lectura de la absorbancia del control de crecimiento a 620 nm.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Día 1	A	90 µL CMH +Péptido (0.25-2 CMI)	90 µL CMH +Péptido (0.25-2 CMI)	90 µL CMH +Péptido (0.25-2 CMI)	→								
	B	CT	CT	CT	→								
Día 2	C	↓											
	D		↓										
Día 3	E			↓									
	F												
Día 4	G												
	H												

Figura 3. Distribución en placa multipozo para el ensayo de inducción de resistencia bacteriana. Cada pozo contiene caldo Muller Hinton (CMH) con 10 µL de inóculo. Se incluyen concentraciones del péptido entre 0,25 y 2 veces la CMI, así como el control de técnica (CT).

Durante el experimento, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del inóculo de forma diaria para mantener densidades celulares (Figura 4). A partir de estas diluciones, se transfirieron 10 µL a nuevos pozos que contenían CMH y las concentraciones correspondientes del péptido, asegurando así una exposición continua y progresiva a lo largo del tiempo.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dil 1.1	A	90 µL CMH +10 µL Cepa	90 µL CMH +10 µL Cepa	90 µL CMH +10 µL Cepa	→								
Dil 1.2	B	↓											
Dil 1.3	C		↓										
Dil 2.1	D			↓									
Dil 2.2	E												
Dil 2.3	F												
Dil 3.1	G												
Dil 3.2	H												

Figura 4. Distribución en placa multipozo para diluciones seriadas 1/10. Cada pozo contiene caldo Muller Hinton (CMH) y diluciones 1/10 correspondientes a diferentes bacterias y días de inducción. Las posiciones están codificadas como Dil 1.1, 1.2, 1.3 (Día 1, bacterias 1, 2 y 3), Dil 2.1, 2.2, 2.3 (día 2), y así sucesivamente.

Cada cinco días, se realizaron resiembras en agar TSA con el fin de verificar la pureza del cultivo bacteriano. La inducción de resistencia se llevó a cabo durante un período de 10 días, para cada concentración y posteriormente, las cepas tratadas fueron sembradas en agar TSA para realizar nuevamente la determinación de la CMI mediante el protocolo previamente descrito.

En los aislados clínicos de *E.coli*, la sensibilización se realizó frente a los péptidos LfcinB (20–25), LfcinB (21–25)_{Pal} y ²⁶[F]-LfcinB (20–30)₂, así como a los antibióticos ciprofloxacina y meropenem. Para *S.aureus*, se emplearon los péptidos LfcinB (21–25)_{Pal} y ²⁶[F]-LfcinB (20–30)₂, y el antibiótico vancomicina como agentes inductores (Figura 5).

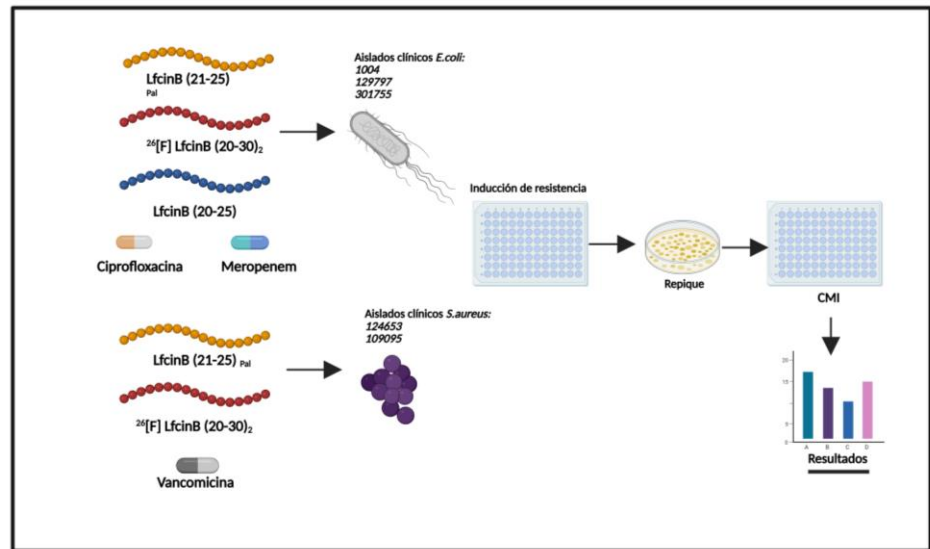


Figura 5. Esquema del método experimental para la inducción de resistencia bacteriana, elaborado en Bio Render. Se utilizaron péptidos derivados de LfcinB y antibióticos (ciprofloxacina, meropenem, vancomicina) frente a aislados clínicos de *E. coli* (1004, 129797 y 301755) y *S. aureus* (124653, 109095). El proceso incluye inducción de resistencia en placa multipozo, repique en agar y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), seguida del análisis de los resultados.

Evaluación de resistencia cruzada:

Con el fin de evaluar la resistencia cruzada, se seleccionaron las cepas que desarrollaron resistencia frente a los péptidos antimicrobianos durante el proceso de inducción. Para esta evaluación, se emplearon péptidos con estructura similar, pero que incluyeron modificaciones en su secuencia aminoacídica y en la longitud de la cadena peptídica. Las secuencias utilizadas fueron: $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-27)}_2$ y $^{26}\text{[Nal]-LfcinB (20-30)}_2$. Además, se incluyen los antibióticos de referencia ciprofloxacina y meropenem como controles para verificar posibles patrones de resistencia cruzada entre péptidos y antibióticos.

La CMI obtenida tras la exposición se comparó con la CMI inicial de cada cepa, permitiendo identificar incrementos significativos en la concentración requerida para inhibir el crecimiento bacteriano, como indicativo de resistencia cruzada.

Estabilidad de la resistencia:

Para determinar la estabilidad del fenotipo resistente en ausencia de presión selectiva, las cepas previamente clasificadas como resistentes se incubaron en CMH sin presencia de los péptidos derivados de LfcinB. En cada pase, se inocularon 10 μL de la cepa en 90 μL de CMH fresco y se incubaron durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Este procedimiento se repitió durante cinco pasos consecutivos.

Al finalizar el quinto pase, se importa nuevamente la CMI utilizando la técnica de microdilución en caldo estandarizada por el CLSI. Esta evaluación permitió establecer si la resistencia adquirida se mantenía en el tiempo o si disminuía en la ausencia del agente antimicrobiano (27).

3. Resultados

En esta investigación, se evaluó la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de LfcinB (Tabla 1). Los péptidos fueron sintetizados mediante la metodología de síntesis en fase sólida (SPPS) con estrategia de protección tipo Fmoc (Fluorenilmetoxicarbonilo) (19). La purificación se realizó por extracción en fase sólida seguida de elución en gradiente (44). La caracterización e identificación estructural se efectuó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (19). Para las pruebas de inducción de resistencia, se utiliza como péptido control la secuencia mínima activa de LfcinB (20–25) RRWQWR.

Tabla 1. Péptidos antimicrobianos derivados de la LfcinB (20–30).

Código	Secuencia
LfcinB (20-25)	RRWQWR
LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWQWR
²⁶ [F] LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRFKKLG) ₂ K-Ahx
²⁶ [F] LfcinB (20-27) ₂	(RRWQRFK) ₂ -K-Ahx
²⁶ [Nal] LfcinB(20-30) ₂	(RRWQWR-Nal-KKLG) ₂ -K-Ahx

Nota: Se muestran las secuencias utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana e inducción de resistencia bacteriana. Los péptidos fueron modificados a partir del fragmento activo de la lactoferrina bovina.

Nota: Nal = ácido 2-naftilalanina

La actividad antibacteriana se evaluó frente a tres aislados clínicos (AC) de *E. coli*, 1004 sensible, 129797 sensible a los antibióticos excepto ampicilina y 301755 presentó un patrón de resistencia indicando la presencia de una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Frente a los aislados clínicos de *S. aureus* se evaluaron dos, AC: 109095 el cual presentó resistencia penicilina y AC 124653 presentó resistencia a los antibióticos probados penicilina, eritromicina y tetraciclina (Tabla 2).

Tabla 2. Antibiograma reportado para los aislados clínicos.

Aislados clínicos de	Resistente	Susceptible
<i>E. coli</i>		
1004	No presenta resistencias	FEP, IMP, ETP, AK, MEM, CZO, AMP, TIG, CRO, GEN, CIP, SAM, CAZ/AVI, PIP/TZ, TMP/SMX
129797	AMP	FEP, IMP, ETP, AK, MEM, CZO, TIG, CRO, GEN, CIP, SAM, CAZ/AVI, PIP/TZ, TMP/SMX
301755 BLEE (+)	FEP, AMP, CRO, GEN, CIP, TMP/SMX	IMP, ETP, AK, MEM, TIG, CAZ/AVI
<i>S. aureus</i>		
109095	P	E, TE
124653	P, E, TE	

Nota: Abreviaturas: FEP: cefepima, IMP: Imipenem, ETP: Ertapenem, AK: Amikacina, MEM: meropenem, CZO: Cefazolina, AMP: Ampicilina, TIG: Tigeciclina, CRO: ceftriaxona, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, SAM: ampicilina-sulbactam, CAZ/AVI: ceftazidima-avibactam, PIP-TZ: piperacilina-tazobactam, TMP/SMX: trimetoprima-sulfametoxazol, P: penicilina, E: eritromicina, TE: tetraciclina, BLEE: betalactamasa de espectro extendido.

Concentración mínima inhibitoria y bactericida:

Los resultados obtenidos fueron consistentes con las CMI previamente reportadas en la literatura, lo cual sugiere que los péptidos evaluados conservan su eficacia frente a cepas clínicas. En particular, la actividad antimicrobiana descrita en estudios previos para los péptidos $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$, $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-27)}_2$ y $^{26}\text{[Nal]}\text{-LfcinB (20-30)}$ frente a *E. coli*, así como para $^{26}\text{[Nal]}\text{-LfcinB (20-30)}$ frente a *S. aureus* fue concordante con la bibliografía publicada (19).

Los valores de CMI obtenidos en este trabajo (Tabla 3) evidenciaron que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó la menor CMI frente a *E. coli* 1004 (17 μM), para *E. coli* 301755 y 129797 (ambas con 34 μM). En estudios previos se reportó que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presenta actividad contra *E. coli* 1004 y 301755, con valores de CMI de 17 μM y 34 μM , respectivamente (45).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ (μM) para péptidos derivados de LfcinB contra aislados clínicos de *E. coli* y *S. aureus*.

Péptido AC	LfcinB (21-25) _{Pal}	LfcinB(20-25)	$^{26}\text{[F]}\text{LfcinB (20-30)}_2$	$^{26}\text{[F]}\text{LfcinB (20-27)}_2$	$^{26}\text{[Nal]}\text{LfcinB (20-30)}$
<i>E. coli</i> 1004	25 (17)	200 (203)	100(30)	50 (18)	100 (30)
<i>E. coli</i> 129797	50 (34)	200 (203)	100(30)	50 (18)	100 (30)
<i>E. coli</i> 301755	50 (34)	200 (203)	50 (15)	25 (9)	50 (15)
<i>S. aureus</i> 124653	200 (135)	200 (203)	200 (60)	200 (72)	50 (15)
<i>S. aureus</i> 109095	200 (135)	200 (203)	200 (60)	100 (36)	50 (15)

Nota: Los valores están en $\mu\text{g/mL}$, con la concentración equivalente en μM entre paréntesis.

Entre los péptidos modificados, $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ mostró una CMI de 15 μM frente a *E. coli* 301755, y de 30 μM contra *E. coli* 1004 y 129797. El péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-27)}_2$ fue el más activo frente a *E. coli* 301755, con una CMI de 9 μM , y mostró buena actividad frente a *E. coli* 1004 y 129797 (18 μM en ambos casos). Frente a *S. aureus*, este mismo péptido presentó una CMI de 36 μM para la cepa 124653 y de 72 μM para la 109095. Por su parte, el péptido $^{26}\text{[Nal]}\text{-LfcinB (20-30)}$ exhibió la mayor eficacia contra *S. aureus* 124653, con un CMI de 15 μM . Frente a *E. coli* 301755, la CMI también fue de 15 μM , mientras que para *E. coli* 1004 y 129797 fue de 30 μM . El péptido LfcinB (20-25) mostró una CMI considerablemente mayor en todas las cepas analizadas (203 μM), lo que indicó una menor actividad antimicrobiana. Finalmente, los valores CMB, presentados (Tabla 4), reflejan tendencias similares a las observadas para las CMI, lo que respalda el efecto bactericida de los péptidos analizados. En general, los péptidos que presentaron modificaciones estructurales como la repetición de la secuencia RRWQWR y la inclusión del grupo Nal demostraron una mayor eficacia, especialmente frente a *E. coli* 301755 y *S. aureus* 124653.

Estos resultados son concordantes con estudios previos que reportan que la multimerización de secuencias bioactivas puede mejorar significativamente la interacción con las membranas bacterianas, aumentando así la eficacia antimicrobiana (46) (47). Además, la inclusión de residuos no proteicos como Nal ha demostrado incrementar la afinidad hidrofóbica del péptido, facilitando su inserción en las membranas celulares y favoreciendo la disrupción de la bicapa lipídica (48).

Tabla 4. Concentración mínima bactericida (CMB) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μM) para péptidos derivados de LfcinB contra aislados clínicos de *E. coli* y *S. aureus*.

Péptido AC	LfcinB (21-25) _{Pal}	LfcinB(20-25)	²⁶ [F]LfcinB (20-30) ₂	²⁶ [F]LfcinB (20-27) ₂	²⁶ [NaI]LfcinB (20-30) ₂
<i>E. coli</i> 1004	>200(>135)	>200 (203)	200 (60)	100 (36)	100 (30)
<i>E. coli</i> 129797	50 (34)	>200 (203)	100(30)	100 (36)	100 (30)
<i>E. coli</i> 301755	100 (67)	200 (203)	200 (60)	100 (36)	200 (59)
<i>S. aureus</i> 124653	>200 (>135)	>200 (203)	200 (60)	200 (72)	50 (15)
<i>S. aureus</i> 109095	>200 (>135)	>200 (203)	200 (60)	200 (72)	100 (30)

Nota: Los valores están en $\mu\text{g}/\text{mL}$, con la concentración equivalente en μM entre paréntesis. Los símbolos “>” indican que el valor está por encima del límite máximo.

Inducción de resistencia antibacteriana:

Se determinó la CMI inicial y su variación en número de veces y porcentual a lo largo del proceso de inducción. En particular, se observa que, a los 40 pases, todos los aislados clínicos de *E. coli* muestran un aumento porcentual significativo en la tolerancia frente a al menos uno de los péptidos derivados de LfcinB. Por ejemplo, *E. coli* 1004 incrementó su resistencia en un 200% frente a LfcinB (20–25), mientras que *E. coli* 301755 alcanzó un 300% frente a ²⁶[F]-LfcinB (20–30)₂. Los antibióticos convencionales como ciprofloxacina y meropenem presentaron incrementos aún más marcados, con variaciones del 2400% y 1500% respectivamente, lo que pone de manifiesto la rapidez con la que estos microorganismos pueden desarrollar altos niveles de resistencia frente a compuestos clínicamente utilizados. Esta comparación sugiere que, si bien los péptidos derivados de LfcinB no están exentos de generar presión selectiva, su tendencia a inducir resistencia parece ser más moderada que la observada con antibióticos tradicionales. Estos resultados resaltan el potencial de los péptidos como alternativas terapéuticas con un menor riesgo de inducción de resistencia acelerada (Tabla 5).

Tabla 5. Variación porcentual de los aislados clínicos de *E. coli* frente a los péptidos antimicrobianos y antibióticos.

Microorganismo	Antimicrobianos	CMI (i)	10	20	30	40
<i>E. coli</i> 1004	LfcinB (21-25) _{Pal}	17 μM	0%	0%	100%	100%
	Lfcin B (20-25)	203 μM	0%	0%	0%	200%
	²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	30 μM	0%	0%	0%	100%
	Ciprofloxacina	0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500%	500%	1150%	2400%
<i>E. coli</i> 129797	LfcinB (21-25) _{Pal}	34 μM	0%	0%	0%	0%
	Lfcin B (20-25)	203 μM	0%	0%	0%	200%
	²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	30 μM	0%	0%	0%	0%
	Ciprofloxacina	0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500%	500%	1150%	2400%
<i>E. coli</i> 301755	LfcinB (21-25) _{Pal}	34 μM	0%	0%	0%	0%
	Lfcin B (20-25)	203 μM	0%	0%	100%	100%
	²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	15 μM	0%	0%	0%	0%

Meropenem

0,25 µg/ml

0%

100%

300%

1500%

Nota: CMI (i) indica la concentración mínima inhibidora inicial

En *E. coli* 1004, el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó una CMI inicial de 17 µM, la cual se mantuvo constante hasta los 20 pases y aumentó 2 veces su CMI (34 µM) en el pase número 30 (Figura 6a). El péptido LfcinB (20-25) mostró una CMI inicial de 203 µM que se mantuvo estable hasta los 30 pases, pero en el pase 40 aumentó 3 veces su concentración (609 µM) (figura 6b). En *E. coli* 129797, el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} mantuvo su CMI inicial de 34 µM sin cambios y se obtuvieron los mismos resultados que en *E. coli* 1004 frente al péptido LfcinB (20-25) (Figura 6c).

Para *E. coli* 301755, el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó una CMI constante de 34 µM. El péptido LfcinB (20-25) tuvo una CMI inicial de 203 µM que se mantuvo estable hasta los 40 pases donde se duplico su valor (406 µM) (Figura 6d). Para el péptido ²⁶[F]LfcinB (20-30)₂ ninguno de los aislados clínicos presento cambios en la CMI.

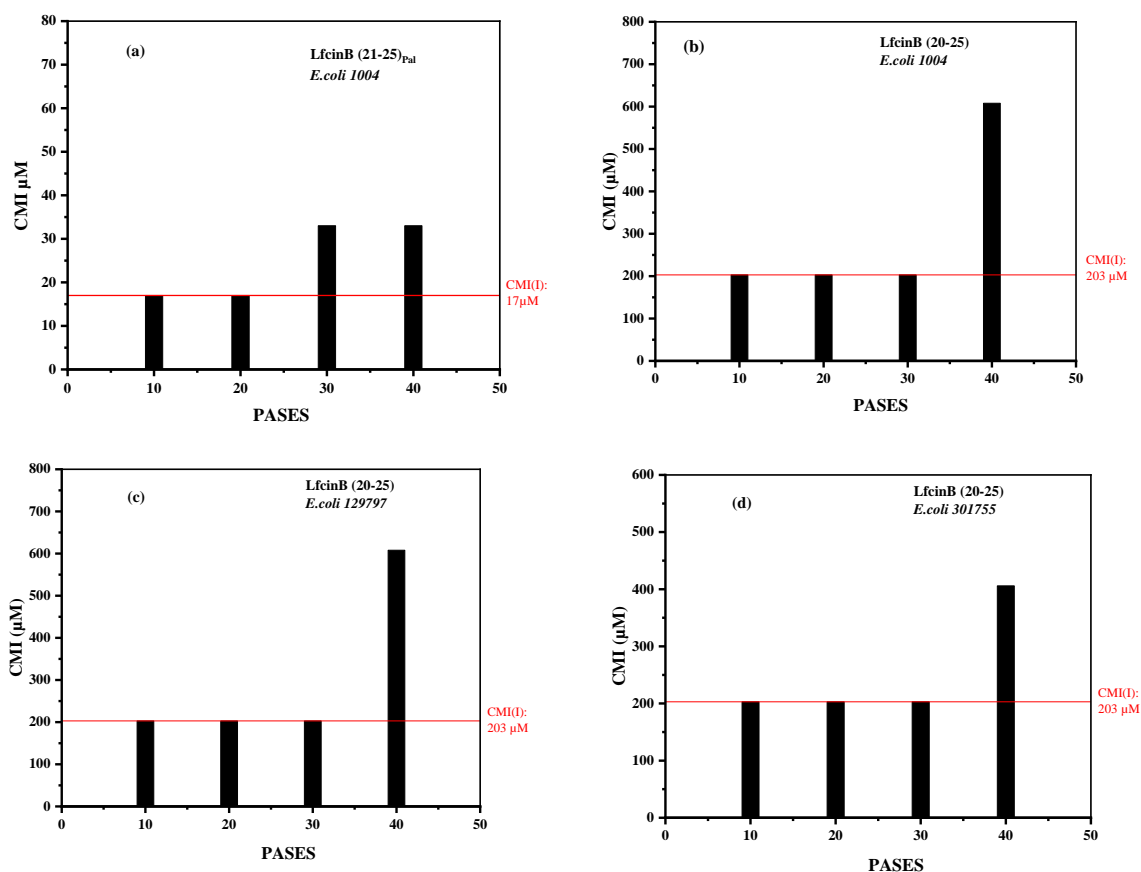


Figura 6: Evaluación de la inducción de resistencia frente a los péptidos antimicrobianos en aislados clínicos de *E. coli*, (a) *E. coli* 1004 con Lfcin B (21-25)_{Pal}, (b) *E. coli* 1004 con LfcinB (20-25), (c) *E. coli* 129797 con Lfcin B (20-25), (d) *E. coli* 301755 con Lfcin B (20-25). Nota: Línea roja demuestra la CMI inicial (CMI (i)) de las bacterias.

En cuanto a los antibióticos evaluados, la ciprofloxacina presentó una CMI inicial de 0,01µg/mL en *E. coli* 1004 aumentando 30 (0,3 µg/mL) veces su valor inicial, para *E. coli* 129797 se obtuvo el mismo resultado. Consecutivamente en *E. coli* 301755 el meropenem tuvo una CMI inicial de 0,25 µg/mL, y aumentó 16 (4 µg/mL) veces su valor inicial (figura 7).

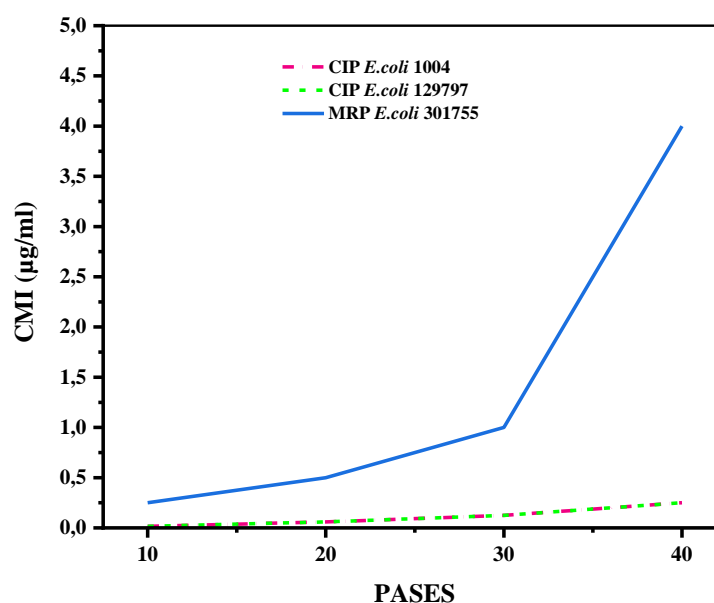


Figura 7: Evaluación de la inducción de resistencia a antibióticos: ciprofloxacina y Meropenem, en aislados clínicos. Nota: Línea punteada verde *E. coli* 129797 y Línea punteada roja en *E. coli* 1004, ambas evaluaciones de la inducción de resistencia en ciprofloxacina. Línea continua *E. coli* 301755 evaluación del Meropenem.

En los aislados clínicos de *S. aureus*, no se observaron cambios en la CMI de los péptidos ni de los antibióticos evaluados durante 30 pases consecutivos (Tabla 8).

Tabla 8. Variación porcentual de los aislados clínicos de *S. aureus* frente a los péptidos antimicrobianos y antibióticos.

Microorganismo	Antimicrobianos	CMI (i)	10	20	30
<i>S. aureus</i> 109095	LfcinB (21-25) _{Pal}	135 µM	0%	0%	0%
	²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	60 µM	0%	0%	0%
	Vancomicina	1 µg/ml	0%	0%	0%
<i>S. aureus</i> 124653	LfcinB (21-25) _{Pal}	135 µM	0%	0%	0%
	²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	60 µM	0%	0%	0%
	Vancomicina	1 µg/ml	0%	0%	0%

Nota: CMI (i) indica la concentración mínima inhibidora inicial

Estabilidad de la resistencia

Se tomaron las cepas que tuvieron incremento significativo en la CMI: (i) *E. coli* 1004 resistente (R) a LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (20-25) y Ciprofloxacina. (ii) *E. coli* 301755 Lfcin B (20-25) y meropenem.

Se obtuvo al menos el doble de la CMI inicial tras el proceso de inducción. Posteriormente, se procedió a realizar cinco pases diarios en caldo CMH sin la presencia del péptido, con el fin de evaluar si la resistencia adquirida se mantenía en ausencia de presión selectiva.

Los valores de CMI al final de este período indicaron que algunos aislamientos conservaron el fenotipo resistente. Específicamente, frente a los péptidos Lfcin B (20-25) el cual disminuyó la CMI de 609 μM a 508 μM y el péptido LfcinB (21-15)_{Pal} el cual mantuvo la CMI en 34 μM después de los pases en CMH (Figura 9a). La bacteria 301755 mantuvo la CMI adquirida (406 μM) para el péptido LfcinB (20-25). (Figura 9b), Para los antibióticos las bacterias mantuvieron la CMI después de la inducción (Figura 9c).

Estos hallazgos permiten diferenciar entre una respuesta transitoria a la presión antibacteriana y una resistencia establecida, siendo un aspecto crucial en la evaluación del potencial terapéutico y la seguridad del uso prolongado de péptidos antimicrobianos.

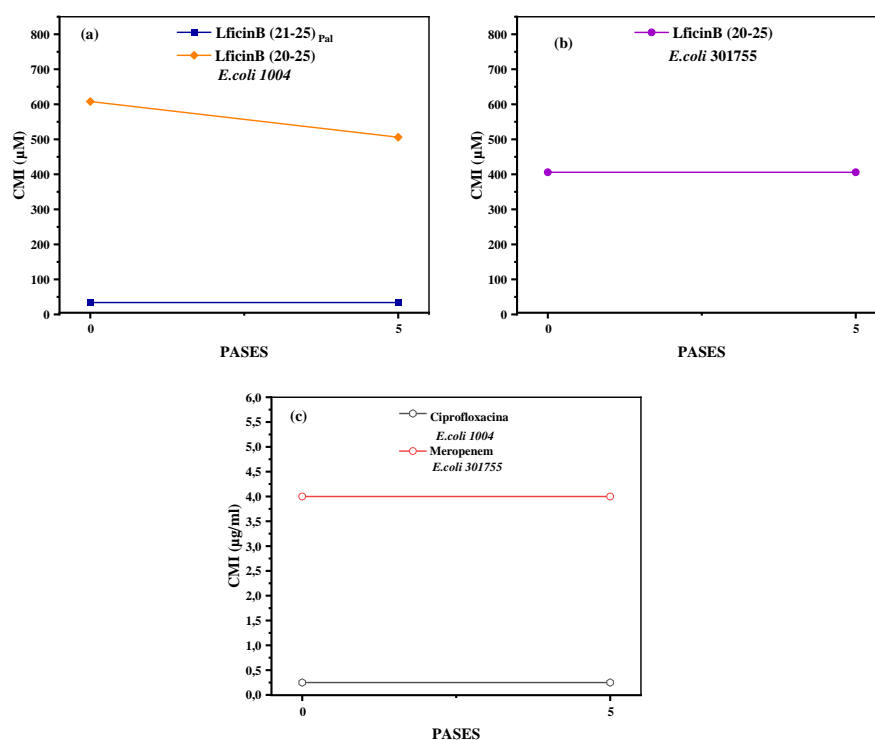


Figura 9. Estabilidad de la resistencia antimicrobiana. (a) *E. coli* 1004 resistente a LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (20-25), (b) *E. coli* 301755 resistente a LfcinB (20-25), (c) *E. coli* 1004 con aumento en la CMI para ciprofloxacina y *E. coli* 301755 resistente a vancomicina.

Este comportamiento refleja una posible resistencia al estrés, entendida como la capacidad del microorganismo de mantener el fenotipo resistente aun en ausencia del factor de presión (49). Aquellos aislamientos que tuvieron disminución CMI indicaron una pérdida del fenotipo resistente, evidenciando una respuesta transitoria y no adaptativa al péptido.

Resistencia cruzada

Las cepas resistentes se enfrentaron a otros péptidos relacionados, así como a antibióticos convencionales como ciprofloxacina y meropenem, para evaluar patrones de resistencia cruzada fenotípica.

La cepa *E. coli* 1004 R-LfcinB (20-25), no solo elevó su CMI específica (609 μ M), sino que también mostró resistencia cruzada hacia el péptido LfcinB (21-20)_{Pal}, cuyo valor CMI se duplicó de 17 a 34 μ M (Figura 10a). Esto sugiere que la similitud estructural en el motivo RWQWR compartido entre los péptidos facilita un escape adaptativo común, pero no se asocia con resistencia a antibióticos como ciprofloxacina.

Del mismo modo, se detectó resistencia cruzada hacia ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, que contiene el mismo motivo en un diseño más largo y presentado como dímero. Sin embargo, no se observa resistencia cruzada frente al dímero ²⁶[F]-LfcinB (20-27)₂, lo que sugiere que su estructura específica podría superar los mecanismos adquiridos por la bacteria frente al péptido LfcinB (20-25).

La cepa *E. coli* 1004 R-LfcinB (21-25)_{Pal} sí desarrolló resistencia cruzada al péptido LfcinB (20-25), incrementando su CMI 5 veces (1015 μ M). Sin embargo, no desarrolló resistencia a ciprofloxacina (Figura 10b).

La ciprofloxacina en los aislados clínicos se mantuvo eficaz (CMI 0,01 μ g/mL), confirmando que los mecanismos de resistencia generados por estos péptidos no afectan la sensibilidad a los antibióticos convencionales, así como *E. coli* 301755 frente al meropenem (Figura 10c).

La cepa *E. coli* 1004 con aumento en la CMI para ciprofloxacina no mostró cambios en la CMI frente a los péptidos antimicrobianos comparada con la cepa salvaje (Figura 10d). Esto indica que la resistencia a ciprofloxacina no genera resistencia cruzada hacia ninguno de los péptidos analizados, lo cual refuerza la hipótesis de que estos péptidos actúan mediante mecanismos independientes del blanco molecular de la quinolona, la resistencia a la ciprofloxacina puede surgir por mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa y la topoisomerasa IV, disminuyendo la afinidad del antibiótico en el sitio de unión (50). Este hallazgo respalda el uso de péptidos como alternativas terapéuticas incluso en bacterias multirresistentes a antibióticos clásicos.

Por otro lado, los péptidos ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y ²⁶[F]-LfcinB (20-27)₂ no se vieron afectados, lo cual sugiere que su mayor tamaño o estructura secundaria impide el escape bacteriano observado con los péptidos más cortos.

En la cepa *E. coli* 301755, productora de BLEE, tanto la inducción con péptido LfcinB (20-25) como con meropenem no generaron resistencia cruzada hacia demás péptidos (Figura 10e). Además, la CMI frente al propio péptido LfcinB (20-25) permaneció sin cambios tras la inducción con meropenem (Figura 10f). Los mecanismos de resistencia asociados a BLEE no interfieren con la actividad de estos péptidos antimicrobianos.

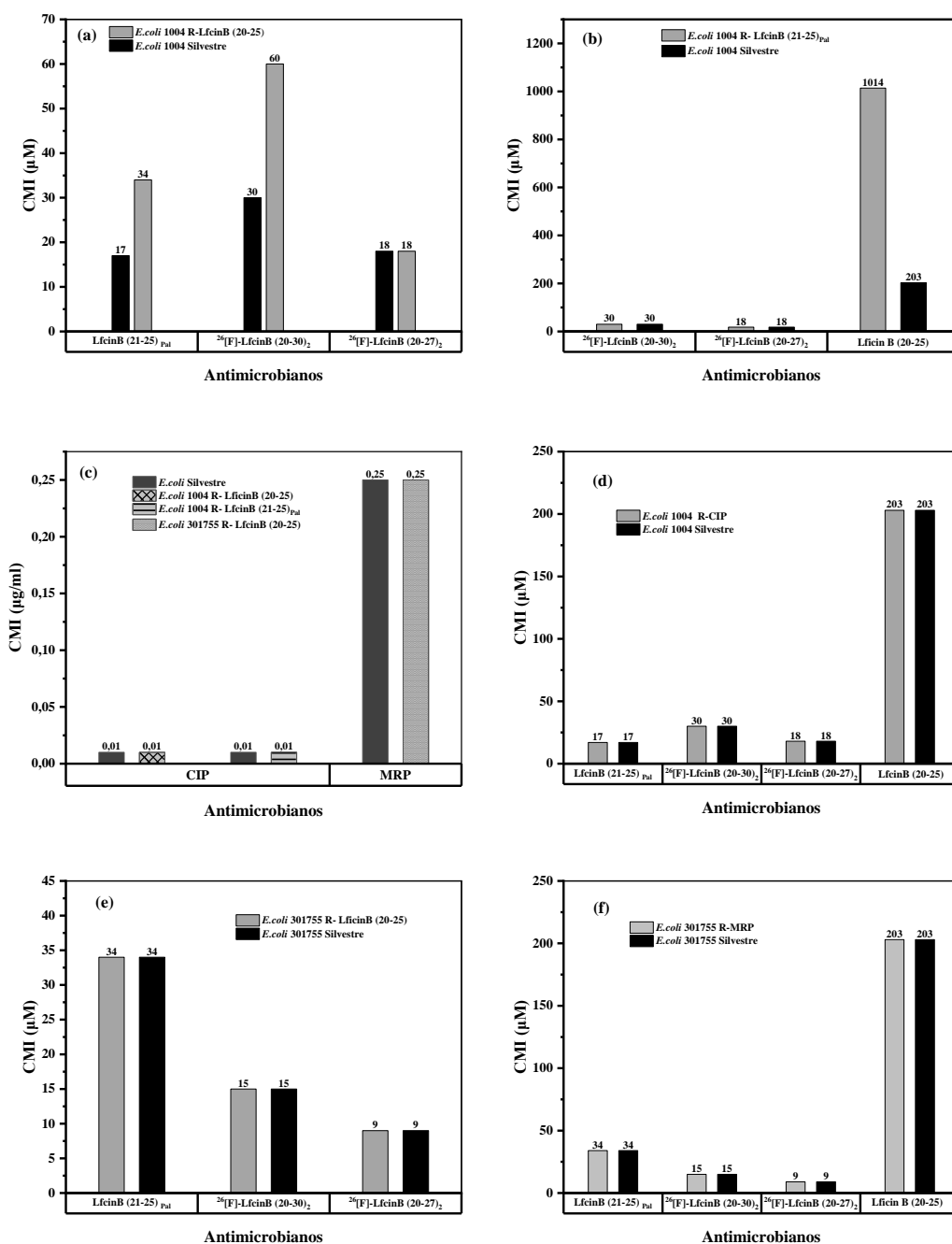


Figura 10. Evaluación de la resistencia cruzada en aislados clínicos de *E. coli* frente a los péptidos LfcinB (20-25), LfcinB (21-25)_{pad}, LfcinB, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-27)₂, ²⁶[NaI]-LfcinB (20-30). (a) *E. coli* 1004 R-LfcinB (20-25), (b) *E. coli* 1004 R-CIP, (c) *E. coli* 301755 R-Lfcin B (20-25), (d) *E. coli* 301755 R-MRP, (e) *E. coli* 1004 R-LfcinB (21-25)_{pad}, (f) Evaluación de la resistencia cruzada a antibióticos, *E. coli* 1004 R-LfcinB (20-25), *E. coli* 1004 R-LfcinB (21-25)_{pad}, *E. coli* 301755 R-LfcinB (20-25) Nota: Bacteria silvestre aquella que no fue inducida a resistencia antimicrobiana, CIP: ciprofloxacina, MRP: Meropenem, R: Resistente.

Discusión y conclusiones

Los PAM son moléculas efectoras clave del sistema inmune innato presentes en una amplia variedad de organismos, caracterizadas por su capacidad para eliminar bacterias, hongos, virus y células tumorales mediante mecanismos dirigidos principalmente a la membrana celular microbiana (51) (52). A diferencia de los antibióticos tradicionales, los PAM como los derivados de la LfcinB, actúan rápidamente, tienen un amplio espectro de actividad y muestran una menor propensión a generar resistencia (53). En particular, los péptidos derivados de la región LfcinB (20-30) han demostrado potente actividad antibacteriana frente a cepas clínicas resistentes, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas frente a patógenos multirresistentes (54) (19).

El péptido $^{26}\text{[F]LfcinB (20-27)}_2$ mostró la mayor actividad inhibitoria contra *E. coli*, con CMI de hasta 9 μM en la cepa 301755, y 18 μM en las cepas 1004 y 129797. Este resultado podría explicarse por la sustitución de un residuo en la posición 26 por fenilalanina, un aminoácido aromático hidrofóbico que promueve una mayor interacción con los componentes lipídicos de la membrana bacteriana, favoreciendo su desestabilización y permeabilización (55) (56).

El péptido $^{26}\text{[Nal]LfcinB (20-30)}_2$ también exhibió actividad antimicrobiana destacada (CMI de 15–30 μM), sugiriendo que la incorporación de aminoácidos no naturales como 1-naftilalanina (Nal) puede optimizar las propiedades hidrofóbicas y la capacidad de inserción en membranas bacterianas (57). Esta mejora en la actividad refleja el potencial del diseño racional de péptidos al introducir modificaciones en regiones clave, lo cual ha sido reportado previamente como una estrategia efectiva para aumentar su potencia y especificidad (58).

Los resultados de la CMB confirmaron que los péptidos $^{26}\text{[F]LfcinB (20-27)}_2$ y $^{26}\text{[Nal]LfcinB (20-30)}_2$ no solo inhiben el crecimiento bacteriano, sino que son capaces de inducir muerte celular en más del 99.9% del inóculo inicial, con valores de CMB cercanos o iguales a los de CMI, cumpliendo así con el criterio de efecto bactericida. ($\text{MBC/CMI} \leq 4$) (59). En cambio, el péptido LfcinB (20–25), utilizado como control, presentó tanto CMI como CMB de 203 μM o superiores, lo que reafirma que su actividad es limitada frente a los aislados clínicos analizados.

En el caso de *S. aureus*, el péptido $^{26}\text{[Nal]LfcinB (20-30)}_2$ nuevamente fue el más activo, con CMI y CMB de 15–30 μM , lo que indica un comportamiento bactericida. Esta eficacia contra cocos Gram positivos puede estar relacionada con la mayor proporción de lípidos aniónicos en sus membranas, facilitando la inserción del péptido (60). Los demás péptidos con modificaciones también mostraron actividad antimicrobiana, aunque en menor medida. Por el contrario, LfcinB (21–25)_{Pal} y LfcinB (20–25), sin modificaciones estructurales relevantes, presentaron CMI y CMB superiores a 135 μM y 203 μM , lo cual indica una menor afinidad por la membrana y, en consecuencia, menor eficacia antimicrobiana (52).

Se concluye que las modificaciones estructurales en péptidos derivados de LfcinB, particularmente la incorporación de residuos aromáticos naturales (fenilalanina) y no naturales (Nal), representan una estrategia eficaz para mejorar su actividad antimicrobiana y bactericida frente a bacterias clínicas resistentes como *E. coli* y *S. aureus*. En conjunto, estos

hallazgos refuerzan el papel de los péptidos antimicrobianos como alternativas viables y personalizables frente al aumento de la resistencia a los antibióticos convencionales.

La inducción de resistencia mediante pases seriados en presencia de concentraciones subinhibitorias representa una estrategia clave para evaluar la capacidad de adaptación de las bacterias a agentes antimicrobianos, tanto tradicionales como alternativos.

En el caso de *S. aureus* 109095, los tres antimicrobianos evaluados: LfcinB(21–25)Pal, 26 [F]-LfcinB(20–30) y vancomicina, no mostraron incremento en la CMI tras 40 pases, lo cual sugiere una baja propensión de esta cepa a desarrollar resistencia frente a estas moléculas. Este hallazgo es consistente con la dificultad de *S. aureus* para generar resistencia estable a ciertos PAM, especialmente aquellos con estructuras modificadas como los dímeros, que presentan mayor estabilidad y actividad membranolítica (61) (62). La conservación de la susceptibilidad a vancomicina también confirma que no hubo presión selectiva hacia resistencia heterogénea o intermediaria, un fenómeno de creciente preocupación en entornos clínicos (63).

E. coli mostró una respuesta más variable. La exposición prolongada al péptido control LfcinB(20–25) generó un aumento de la CMI de 203 μ M a 609 μ M en las cepas 1004 y 129797, ya 406 μ M en 301755. Estos incrementos son indicativos de una adaptación gradual del patógeno ante la presión selectiva del péptido. Es probable que este efecto esté asociado a mecanismos como la modificación de la carga superficial de la membrana externa o el aumento de la expresión de bombas de eflujo, procesos ya descritos de bacterias Gram negativas frente a PAMs (64) (65). En particular, los péptidos cortos y lineales como LfcinB(20–25) pueden ser más susceptibles a evadir por adaptaciones locales de la membrana bacteriana, al carecer de la robustez estructural que ofrecen los dímeros.

Por otro lado, la estabilidad observada en el CMI frente a 26 [F]-LfcinB(20–30)₂ a lo largo de los 40 pases en los tres aislados clínicos de *E. coli* resalta el potencial de este péptido como agente antimicrobiano resiliente ante la presión evolutiva. Su estructura dimerizada y la incorporación de fenilalanina aromática en la posición 26 posiblemente favorecen una interacción más fuerte con las membranas bacterianas, reduciendo la posibilidad de escape adaptativo (51).

Finalmente, la inducción con ciprofloxacina evidencia una clara evolución hacia resistencia, con aumentos secuenciales del CMI desde 0,01 μ g/mL hasta 0,25 μ g/mL en los 40 pases. Este patrón es representativo de la presión selectiva característica de los antibióticos convencionales, donde mutaciones en la diana (*gyrA*/*parC*) y la sobreexpresión de bombas de eflujo son responsables del fenotipo resistente (66) (67). En comparación con los péptidos antimicrobianos, cuya actividad es frecuentemente multimodal, los antibióticos como ciprofloxacina presentan una única diana molecular, facilitando la aparición de resistencia por mutación puntual (68) (69) (70).

Los datos observados refuerzan el potencial de los péptidos derivados de LfcinB como candidatos antimicrobianos seguros frente a la presión selectiva. La resistencia inducida fue baja o inexistente en la mayoría de los casos, especialmente en péptidos modificados como 26 [F]LfcinB (20–30)₂, lo cual los posiciona como alternativas terapéuticas de bajo riesgo evolutivo. A diferencia de antibióticos convencionales que pueden ser vulnerables a mecanismos específicos de evasión, estos péptidos ejercen una acción fisicoquímica directa sobre la membrana bacteriana, dificultando la emergencia de resistencia (71). Este perfil favorable concuerda con lo reportado por Hancock et al. (2021), quienes destacan que los péptidos antimicrobianos pueden considerarse como herramientas clave en la era

post-antibiótica, al combinar actividad bactericida con un bajo potencial de resistencia (72).

La evaluación de resistencia cruzada es un componente esencial para determinar si la exposición prolongada a un antimicrobiano induce mecanismos de defensa que también afectan la eficacia de otros compuestos. En este estudio, se examinó si *E. coli* 1004 y 301755, previamente expuestos a péptidos derivados de LfcinB a antibióticos, presentando cambios en su sensibilidad frente a otros antimicrobianos, incluyendo péptidos monoméricos, dímeros y antibióticos convencionales como ciprofloxacina y meropenem

En *E. coli* 1004, que presentó un aumento en la CMI frente al péptido LfcinB (21–25)_{Pal}, se evaluó la CMI frente a otros péptidos. La CMI se mantuvo sin variación para el dímero ²⁶[F]-LfcinB (20–27)₂ (18 μM), lo que sugiere ausencia de resistencia cruzada hacia esta variante. Sin embargo, para LfcinB (20–25) se observará un aumento significativo de la CMI de 203 μM a 1015 μM, lo que podría indicar una resistencia cruzada específica relacionada con secuencias más cortas o menos estructuradas del péptido, aunque esta tendencia no se replica de forma generalizada. La CMI frente a ciprofloxacina (0.01 μg/mL) no presentó cambios, descartando un fenómeno de resistencia cruzada entre péptidos y antibióticos de tipo fluoroquinolona.

En el caso de *E. coli* 1004 expuesta a LfcinB (20–25), se observará un aumento moderado en la CMI del dímero ²⁶[F]-LfcinB (20–30)₂ (de 30 μM a 60 μM), mientras que el dímero ²⁶[F]-LfcinB (20–27)₂ y ciprofloxacina no muestran alteraciones en la susceptibilidad. Esto refuerza que los mecanismos de adaptación generados por exposición prolongada a un péptido específico no necesariamente comprometen la eficacia de variantes estructuralmente modificadas, especialmente si estas tienen una mayor estabilidad conformacional, como los dímeros, que tienden a resistir la degradación proteolítica y mantener mejor su bioactividad (73) (74).

La cepa *E. coli* inducida con ciprofloxacina no presentó variación en la CMI frente a ninguno de los péptidos probados, lo que indica que los mecanismos de resistencia inducidos por fluoroquinolonas (eg, mutaciones en girasas, bombas de eflujo) no afectan la actividad de los péptidos derivados de LfcinB. Este hallazgo es consistente con informes que muestran que los péptidos antimicrobianos tienden a interactuar directamente con la membrana bacteriana, un blanco distinto y no compartido con la mayoría de los antibióticos convencionales, reduciendo así el riesgo de resistencia cruzada (52) (75).

Por otro lado, *E. coli* 301755 resistente al péptido ²⁶[F]-LfcinB (20–30)₂ no mostró cambios en la susceptibilidad frente a otros péptidos ni a meropenem. Además, *E. coli* 301755 con resistencia inducida a meropenem mantuvo CMI estable frente a todos los péptidos probados. Esto respalda la hipótesis de que los péptidos antimicrobianos derivados de LfcinB no comparten mecanismos de acción ni vías de resistencia con los carbapenémicos, lo que resulta clínicamente prometedor ante la creciente resistencia a antibióticos de amplio espectro (76).

Los resultados obtenidos indican que, tras la interrupción de la presión selectiva durante cinco pases en caldo sin antimicrobianos, los perfiles de resistencia en los aislados clínicos de *E. coli* se mantuvieron estables frente a la mayoría de los péptidos y antibióticos evaluados. Este hallazgo tiene implicaciones relevantes tanto para la comprensión de los mecanismos de resistencia como para el diseño de estrategias terapéuticas.

Estos resultados sugieren que la presión selectiva con péptidos antimicrobianos puede inducir modificaciones fenotípicas o genotípicas estables. Estos pueden incluir cambios en la composición de membrana externa, activación sostenida de sistemas de respuesta a estrés como *PhoPQ* o *PmrAB* (51) (77).

Las cepas expuestas a ciprofloxacina (1004) y meropenem (301755) mantuvieron su CMI máxima alcanzada (0.25 y 4 µg/mL respectivamente) tras 5 pases en caldo sin el fármaco, lo que concuerda con lo observado en estudios previos donde la exposición prolongada a quinolonas o carbapenémicos puede inducir resistencia genética irreversible, mediada por mutaciones en *gyrA/parC* o expresión de o expresión de β-lactamasas tipo carbapenemasa (78) (79).

A diferencia de los antibióticos, los péptidos derivados de LfcinB parecen inducir resistencia menos estable, lo que indica que su mecanismo de acción (principalmente disrupción de membrana y translocación no específica) puede provocar respuestas adaptativas transitorias o parcialmente reversibles, como alteraciones en carga superficial, regulación de bombas de eflujo o modificación de LPS (80) (81) (82) (83).

Este comportamiento es positivo desde el punto de vista clínico, ya que sugiere que los péptidos antimicrobianos pueden ejercer presión sin generar resistencia estable o irreversible, lo que los convierte en candidatos más seguros a largo plazo en el contexto del control de infecciones resistentes.

Bibliografía

1. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*. 2020 Diciembre; 21(12).
2. Selvarajan R, Obize C, Sibanda T, Abia A, Long H. Evolution and Emergence of Antibiotic Resistance in Given Ecosystems: Possible Strategies for Addressing the Challenge of antibiotic resistance. *Antibiotics*. 2023; 12(1).
3. Paterson D BR. β-Lactamasas de espectro extendido: una actualización clínica. *American Society For Microbiology*. 2005; 18(4).
4. Philippon A AG,JG. β-lactamasas de tipo AmpC determinadas por plásmidos. *American Society For Microbiology*. 2002 Enero; 46(1).
5. Jhon Bryan Mina Ortiz JEQCESPNRAVRWALV. Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos: Betalactamasas AmpC. *Dialnet*. 2021 JULio; 7(3).
6. Pokharel P, Dhakal S, Dozois C. The Diversity of Escherichia coli Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*. 2023 Enero; 11(2).
7. Martín S. Antibióticos de última generación. *Offarm*. 2011 Diciembre; 30(6).
8. Molina NB OSLMBJSM. Caracterización molecular de Escherichia coli diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina.. *Revista Argentina De Microbiología*. 2023 Julio; 56(1).
9. López L. Estudio de factores de virulencia en Escherichia coli. *Uva.es*. 2021.
10. Braz V, Melchior K, Moreira C. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020 Diciembre; 10.

11. Lessa M I, Moura P S, da Silva Pone M. Características clínicas, demográficas y perfil de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado en muestras clínicas de pacientes pediátricos en un hospital terciario de Río de Janeiro: estudio longitudinal de 7 años. *BMC Infectious Diseases*. 2024 Septiembre; 24.
12. Pasachova J, Ramírez S, Muñoz L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*. 2019; 17(32).
13. Rasheed N, Hussein N. *Staphylococcus aureus*: An Overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity Short Title: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: An overview. 2021.
14. De La Cadena E, Pallares C, García B, Porras J, Villegas M. Actualización sobre la resistencia antimicrobiana en instituciones de salud de nivel III y IV en Colombia entre enero del 2018 y diciembre del 2021. *Biomédica*. 2023 Diciembre; 43(4): p. 457-73.
15. Cheung G, Bae J, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*.. *Virulence*. 2021 Enero; 12(1).
16. Adeiza S, Aminul I. Meta-meta-análisis del riesgo de mortalidad asociado con SAMR en comparación con la bacteriemia por SAMS. *Infez Med*. 2024 Junio; 32(2).
17. Riche C, Casso R, Falci D, Ramirez M, Dias C. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad en pacientes bacteriémicos por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en el sur de Brasil. *PLOS ONE*. 2023 Abril; 18(4).
18. Alhunaif S, Almansour S, Almutairi R, Alshammari S, Alkhonain L, Alalwan B, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Bacteremia: Epidemiology, Clinical Characteristics, Risk Factors, and Outcomes in a Tertiary Care Center in Riyadh, Saudi Arabia. *Cureus*. 2021 Mayo; 13(5).
19. Cuero Amu K. Péptidos derivados de la secuencia RRWQWRMKKLG: Evaluación de la actividad antibacteriana contra cepas ATCC Gram positivas y Gram negativas. Universidad Nacional de Colombia. 2024.
20. Lica J, Gucwa K, Heldt M, Stupak A, Maciejewska N, Ptaszyńska N, et al. La lactoferricina B combinada con antibióticos exhibe selectividad leucémica y actividad antimicrobiana. *Molecules*. 2024; 29(3).
21. Vergis J, Singh S, Pathak R, Kumar M, Ramajaneya S, Vasantrya N, et al. Explotación de la lactoferricina (17-30) como posible candidato antimicrobiano y antibiofilm contra *Escherichia coli* enteroagregativa multirresistente. *Frontier*. 2020 Septiembre; 11.
22. Vega S, Martínez D, Chalá M, Vargas H, Rosas J. Design, Synthesis and Evaluation of Branched RRWQWR-Based Peptides as Antibacterial Agents Against Clinically Relevant Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *Front Microbiol*. 2018 Marzo; 9.
23. Lica J, Gucwa K, Heldt M, Stupak A, Maciejewska N, Ptaszyńska N, et al. La lactoferricina B combinada con antibióticos exhibe selectividad leucémica y actividad antimicrobiana. *Molecules*. 2024; 29(3).
24. Hong J, Hu J, Ke F. Experimental Induction of Bacterial Resistance to the Antimicrobial Peptide Tachyplesin I and Investigation of the Resistance Mechanisms. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2016 Septiembre; 60(10).
25. Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015 Diciembre; 33(10).
26. Rončević T, Puizina J, Tossi A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *International Journal Of Molecular Sciences*. 2019 Noviembre; 20(22).
27. Samuelsen Ø, Haukland H, Jenssen H, Krämer M, Sandvik K, Ulvatne H, et al. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*. 2005 Mayo; 579.

28. Assoni L, Milani B, Carvalho M, Nepomuceno L, Waz N, Guerra M, et al. Resistance mechanisms to antimicrobial peptides in Gram-Positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Octubre; 11.
29. Duperthuy M. Antimicrobial peptides: virulence and resistance modulation in Gram-Negative bacteria. *Microorganisms*. 2020 Febrero; 8(2).
30. Grueso Mariaca D. Determinación de la actividad antibacteriana de péptidos derivados de la secuencia rrwqwr de lactoferricina bovina.. Repositorio Uicolmayor. 2019 Nov.
31. Aguirre G, Márquez T, Pineda H, Vargas Y, Ceballos A, Rivera Z, et al. Péptidos quiméricos derivados de lactoferricina y buforina II bovina: actividad antifúngica contra cepas de referencia y aislados clínicos de *Candida* spp. *Antibiotics*. 2022; 11(11).
32. Huertas N, Monroy Z, Medina R, Castañeda J. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules*. 2017 Junio; 22(6).
33. Rodríguez ATB. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO PALINDROMICO LfcinB (21-25)Pal RWQWRWQWR Y SUS ANÁLOGOS. Repositorio UNAL. 2023.
34. Barragan A. Evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la secuencia LfcinB (21-25)Pal: RWQWRWQWR frente a líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama. Repositorio Universidad Nacional De Colombia. 2019.
35. Martínez KJC. Síntesis y cribado de péptidos modificados derivados de lactoferricina bovina como fármacos citotóxicos contra líneas de cáncer de colon. Repositorio Universidad Nacional De Colombia. 2024 Julio.
36. Petrungaro G, Mulla Y, Bollenbach T. Antibiotic resistance: Insights from evolution experiments and mathematical modeling. *Current Opinion in Systems Biology*. Science Direct. 2021 Diciembre; 28.
37. Liu F, Luo Y, Xu T, Lin H, Qiu Y, Li B. Current examining methods and mathematical models of horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the environment. *Frontiers in microbiology*. 2024 Abril; 15.
38. Chukwu KB, Abafe OA, Amoako D, Essack SY, Abia AL. Las concentraciones ambientales de antibióticos, biocidas y metales pesados no inducen resistencia antimicrobiana fenotípica en *Escherichia coli*. *Science Direct*. 2023 Noviembre.
39. Bagra K, Bellanger X, Merlín C, Singh G, Berendonk TU, Klümper U. El estrés ambiental aumenta el éxito de invasión de bacterias resistentes a los antimicrobianos en las comunidades microbianas de los ríos. *Science Direct*. 2023 Diciembre; 904.
40. Méndez N. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA LACTOFERRICINA BOVINA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. Repositorio UNAL. 2016.
41. Insuasty D. Implementación y optimización de la síntesis de péptidos diméricos derivados de la secuencia LfcinB (20-30) con potencial actividad anticancerígena contra el cáncer de mama. Repositorio Universidad Nacional De Colombia. 2023 Julio.
42. Weinstein M. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI. 2018 Enero; 32(2).
43. CLSI. Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 35.^a ed. Suplemento M100 del CLSI. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. 2025.

44. Cepeda DSI, Castañeda HMP, Mayor AVR, Castañeda JEG, Villamil MM, Medina RF, et al. Purificación de péptidos sintéticos mediante extracción en fase sólida con elución en gradiente: una metodología sencilla, económica, rápida y eficiente. *Molecules*. 2019 Marzo; 24(7).
45. Botina AT. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PÉPTIDO PALINDRÓMICO LfcinB (21-25)Pal RWQWRWQWR Y SUS ANÁLOGOS. Repositorio Universidad Nacional de Colombia. 2023.
46. Matsuzaki K. Control de la selectividad celular de los péptidos antimicrobianos. Elsevier. 2009 Agosto; 1788(8).
47. Huertas N, Vargas Y, Gómez A, Hernández E, Leal , C , et al. Los péptidos sintéticos derivados de la lactoferrina bovina exhiben actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 y *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*. 2017; 22(3).
48. Cuero K, Bonilla L, Vargas Y, Leal A, Parra C, López A, et al. Péptidos lineales y polivalentes con potente actividad antimicrobiana contra aislados clínicos de *E. coli* sensibles y resistentes a múltiples fármacos. *Chemistry & Biodiversity*. 2024 Noviembre.
49. Samuelsen Ø, Haukland H, Jenssen H, Krämer M, Sandvik K, Ulvatne H, et al. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*. 2005 Mayo; 579(16).
50. Jessica A. Collins AAO,PFC,NO. Resistencia a fluoroquinolonas mediada por dianas en *Neisseria gonorrhoeae* : acciones de la ciprofloxacina contra la girasa y la topoisomerasa IV. *ACS Infectious Diseases*. 2024 Marzo; 10(4).
51. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Péptidos de defensa del huésped antimicrobianos: funciones y potencial clínico. *Nature Reviews sobre el descubrimiento de fármacos*. 2020 Febrero; 19.
52. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Péptidos antimicrobianos: una categoría emergente de agentes terapéuticos. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6(194).
53. Lian K, Zhang M, Liang X, Zhou L, Shi Z, Tang Y. El papel y los mecanismos de los péptidos antimicrobianos en la lucha contra la resistencia a múltiples fármacos en bacterias. *Fronteras en Microbiología*. 2022 Junio; 13.
54. Haney E, Straus S, Hancock R. Reevaluación del panorama de péptidos de defensa del huésped. *Front Chem*. 2019; 7(43).
55. Hancock R, Sahl H. Péptidos antimicrobianos y de defensa del huésped como nuevas estrategias terapéuticas antiinfecciosas. *Nat Biotechnol*. 2006; 24 (1551–1557).
56. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Péptidos antimicrobianos: clasificación, diseño, aplicación y avances de la investigación en múltiples campos. *Front Microbiol*. 2020 Octubre; 11(582779).
57. Ageitos J, Sánchez A, Calo P, Villa T. Péptidos antimicrobianos (AMP): compuestos antiguos que representan nuevas armas en la lucha contra las bacterias. *Biochem Pharmacol*. 2017 Junio; 133(117-138).
58. Bahar A, Ren D. Péptidos antimicrobianos. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Noviembre; 6(12).
59. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda S. Métodos para evaluar in vitro la actividad antimicrobiana: una revisión. *J Pharm Anal*. 2016 Abril; 6(2).
60. Brogden K. Péptidos antimicrobianos: ¿formadores de poros o inhibidores metabólicos en bacterias? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Marzo; 3(238-250).
61. Hamoen L, Kuipers O, Zachariah C. cciones antimicrobianas de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, se deben a la interrupción de la síntesis de la pared celular. *Mol Microbiol*. 2003 Septiembre; 49(5).
62. Yeaman M, Yount N. Mecanismos de acción y resistencia de los péptidos antimicrobianos. *Pharmacol Rev*. 2003 Marzo; 55(1).

63. Flórez K. Determinación del potencial de virulencia en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia a meticilina (MRSA) que presenta el fenotipo de resistencia heterogénea a vancomicina (HVISA). Repositorio Unbosque. 2021.
64. Lázár V, Martins A, Spohn R, Daruka L, Grézal G, Fekete G, et al. Las bacterias resistentes a los antibióticos muestran una sensibilidad colateral generalizada a los péptidos antimicrobianos. *Nat Microbiol*. 2018 Junio; 3(6).
65. Grassi L, Maisetta G, Esin S, Batoni G. Combination strategies to enhance the efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Nat Microbiol*. 2017; 7(5).
66. Li G, Zhang S, Liu K, Li B, Chen S, Tang Y. Mecanismos de resistencia a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist*. 2022 Mayo; 15(2235).
67. Rusu D, Borda V, Cornea V. Perspectivas actuales sobre los mecanismos de resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas: una revisión. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Marzo; 12(3).
68. Di Napoli M, Castagliuolo G, Pio S, Di Nardo I, Russo T, Antonini D, et al. Estudio de la actividad antimicrobiana del péptido humano SQQ30 contra bacterias patógenas. *Antibiotics*. 2024; 13.
69. Zhong C, Zhang F, Yao J, Zhu Y, Zhu N, Zhang Y, et al. Péptidos antimicrobianos con estructuras simétricas contra bacterias resistentes a múltiples fármacos al tiempo que alivian la resistencia a los antimicrobianos. *Biochemical pharmacology*. 2021.
70. Yasir M, Dutta D, Willcox M. Activity of Antimicrobial Peptides and Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Molecules*. 2020; 25.
71. Cardoso M, O'Driscoll T, De la Fuente-Nunez C, Hancock R. The AMP Challenge: Limits and Perspectives. *Front Chem*. 2020; 8(595536).
72. Hancock R, Haney E, Gill E. Inmunología de los péptidos de defensa del huésped: más allá de la actividad antimicrobiana. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16(5).
73. Ageitos J, Sánchez-Pérez M C, Villa T. Péptidos antimicrobianos (AMP): Compuestos antiguos que representan nuevas armas en la lucha contra las bacterias. *Farmacología Bioquímica*. 2017; 133(117).
74. García-Castañeda J, Cuero-Amu K, Bonilla-Velásquez L, Vargas-Casanova Y, Leal-Castro A, Parra-Giraldo C, et al. Péptidos lineales y polivalentes con potente actividad antimicrobiana contra aislados clínicos de *E. coli* sensibles y resistentes a múltiples fármacos. *Chemistry & biodiversity*. 2024.
75. Andersson D, Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal concentrations. *rug Resist Updat*. 2016; 23(43).
76. Santos R, Figueiredo C, Azevedo N, Braeckmans K. Péptidos antimicrobianos en la lucha contra las bacterias multirresistentes. *Frontiers in Microbiology*. 2022; 13(899586).
77. Fernández L, Hancock R. Resistencia adaptativa y mutacional: papel de las porinas y las bombas de eflujo en la resistencia a fármacos. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(2).
78. Boucher H. Virus dañinos, sin medicamentos: ¡no a ESKAPE! Actualización de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas. *Clin Infect Dis*. 2009 Enero; 48(1).
79. Jacoby G. Mecanismos de resistencia a las quinolonas. *Clin Infect Dis*. 2005; 41.
80. Barragán A, Insuasty D, Cárdenas K, López J, Ochoa A, Umaña A, et al. Péptidos derivados de LfcinB: el cambio específico y puntual de un aminoácido en secuencias monoméricas y dimericas aumenta la citotoxicidad selectiva en líneas celulares de cáncer de colon. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022.

-
81. Vargas Y, Rodríguez A, Cárdenas K, Leal A, Muñoz L, Fierro R, et al. Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Advances*. 2019; 9.
 82. Hossain F, Dohra H, Yamazaki M. Efecto del potencial de membrana en la entrada del péptido antimicrobiano de 6 residuos derivado de la lactoferricina B en células individuales de *Escherichia coli* y vesículas lipídicas. *Journal of Bacteriology*. 2021; 203.
 83. Liu Y, Han F, Xie Y, Wang Y. Actividad antimicrobiana comparativa y mecanismo de acción de péptidos sintéticos derivados de la lactoferricina bovina. *Biometals*. 2011 Mayo; 24.