



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
MOLECULAR

“Efecto de Lactoferrina bovina y Lactoferrina quimera en aislados clínicos de bacterias planctónicas y biofilms de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos”

TESIS

Que presenta:

I.B.Q. KARELY JAZMÍN CAMACHO RAMIREZ

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de tesis:

DRA. NIDIA MARIBEL LEÓN SICAIROS
DR. URIEL ALBERTO ANGULO ZAMUDIO

Comité Tutorial:

DR. VICENTE ADRIAN CANIZALEZ ROMÁN
DR. HÉCTOR MANUEL FLORES VILLASEÑOR
DR. JORGE ADALBERTO VELÁZQUEZ ROMÁN

Culiacán, Sinaloa, mayo de 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología celular, de la Unidad de Investigación, de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Nidia Maribel León Sicairos (Profesora e Investigadora, SNI-III del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la UAS) y se llevó a cabo bajo la tutoría del Dr. Uriel Alberto Angulo Zamudio (Profesor e Investigador del CIASaP, SNI-C) como parte del proyecto titulado “Efecto de Lactoferrina bovina y Lactoferrina quimera en aislados clínicos de bacterias planctónicas y biofilms de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos”.

Para cursar la maestría, la estudiante Karely Jazmín Camacho Ramírez, aceptó la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con CVU 1080304, para la obtención de grado de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular.

Le agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa, por financiar parte de este proyecto de investigación por parte del “PROGRAMA Y FOMENTO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN” PROPAPI 2022 PRO_A3_037 (NMLS).

Agradecimientos

Agradecida primero que nada con mi universidad, La Universidad Autónoma de Sinaloa, por brindarme tan maravillosas oportunidades, con Dios por poner en mi camino a la Dra. Nidia León Sicaños quien es la responsable directa de que este proyecto se concretara, deseo externar el profundo agradecimiento que siento por recibirme tan calurosamente desde el primer momento y no permitir que me sintiera sola jamás, muchas gracias por todo el conocimiento que emana y comparte con tanta sencillez y empatía, pero sobre todo muchas gracias por dejarme sentir su amiga, además de su alumna, le agradezco también reservar a Lorena Félix para mí, la responsabilizo de tan bonita amistad y le agradezco a ella todo su apoyo en esta travesía también, al Dr. Uriel Angulo Zamudio, pues su apoyo y guía han sido fundamentales para mí, gracias a la vida que me ha permitido llegar hasta aquí rodeada de tanta dicha y gente que directa e indirectamente colaboró para que esto fuera posible, GRACIAS.

Dedicatoria

Ésta tesis es resultado de más de un año de trabajo, de esfuerzos, aprendizajes, pero sobre todo, de un sueño, un sueño alimentado por una madre maravillosa a quien debo todo lo que soy, Madre, te dedico esta tesis como materialización de un sueño realizado gracias a tu apoyo y entereza, le agradezco a la vida cada vivencia que nos trajo juntas aquí, a mis hermanos por ser el mejor ejemplo siempre y en todo, a mi mejor amiga y cómplice, gracias por no dudar nunca de mí, y a todas las mujeres fuertes y valientes presentes en mi vida que me inspiraron a ponerme grandes metas y nunca rendirme.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
I. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
II. MARCO TEÓRICO.....	3
A. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
B. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>S. aureus</i>	5
C. FACTORES DE VIRULENCIA.....	7
1. Componentes de la pared celular.....	7
2. Peptidoglicano	8
3. Ácidos teicoicos o polisacáridos A:	10
4. Cápsula externa o glucocálix.....	10
5. Proteínas de la superficie celular de <i>S. aureus</i>	11
6. Enzimas.....	14
1) Catalasa	15
2) Coagulasa	16
3) Hialuronidasa	17
4) Penicilinasa	18
5) Otras enzimas	18
7. Toxinas.....	19
1) Hemolisina	19
2) Leucocidina de Panton-Valentine.....	19
3) Toxinas exfoliativas o epidermolíticas	20
4) Enterotoxinas	21
D. PATOGENIA.....	22
E. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	23
F. RESISTENCIA A METILCILINA.....	24
G. BIOFILMS.....	27
1. Quorum sensing en <i>S. aureus</i>	33
2. El sistema <i>agr</i>	35
H. LACTOFERRINA	36
I. LACTOFERRINA QUIMERA	45
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48

IV. JUSTIFICACIÓN.....	49
V. OBJETIVOS.....	50
Objetivo general	50
Objetivos específicos	50
VI. HIPÓTESIS.....	51
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
A. LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA.....	52
B. CEPAS BACTERIANAS	52
C. OBTENCIÓN DEL INOCULO.....	52
D. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE <i>S. aureus</i> ATCC 25923 Y MRSA EN PRESENCIA DE BLF Y LF QUIMERA.....	53
E. ENSAYO DE UNIÓN DE LA MEMBRANA DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METILCILINA POR LA BLF Y LFQ	54
F. ENSAYO PARA IDENTIFICAR CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA MEMBRABA DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METILCILINA POR BLF Y LF QUIMERA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	55
G. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METILCILINA TRATADAS CON BLF Y LF QUIMERA USANDO EL CRITERIO DE INCLUSIÓN DE IODURO DE PROPIDIO.....	55
H. ESTANDARIZACIÓN DE BIOFILMS DE <i>S. aureus</i> ATCC 25923 Y MRSA56	
I. EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN BIOFILMS DE <i>S. aureus</i> ATCC 25923 Y MRSA	57
J. ESTABLECIMIENTO DEL SINERGISMO ENTRE BLF Y AMPICILINA EN CEPAS DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METILCILINA.	57
K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
VIII. RESULTADOS.....	59
A. LACTOFERRINA BOVINA INHIBE LA VIABILIDAD DE CULTIVOS PLANCTÓNICOS DE <i>S. aureus</i> ATCC 25923 Y MRSA	59
B. LF Y LF QUIMERA DAÑAN CEPAS DE <i>S. aureus</i>	63
C. LACTOFERRINA BOVINA Y EL PÉPTIDO LACTOFERRINA QUIMERA DISGREGAN BIOFILMS DE <i>S. aureus</i>	66
D. LACTOFERRINA BOVINA PRESENTA SINERGISMO PARCIAL CON EL ANTIBIÓTICO AMPICILINA EN BIOFILMS FORMADOS POR MRSA	69
IX. DISCUSIÓN	73
X. CONCLUSIONES	84
XI. REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la membrana de <i>S. aureus</i>	9
Figura 2. Proteínas de superficie de <i>S. aureus</i>	12
Figura 3. Mecanismo bacteriano para generar resistencia a los antibióticos. ..	26
Figura 4. Formación de biofilm.	29
Figura 5. Componentes de un biofilm.....	32
Figura 6. Sistema regulador de genes accesorio (<i>agr</i>) en <i>Staphylococcus</i>	34
Figura 7 Estructura de La lactoferrina	38
Figura 8. Mecanismo de acción del efecto directo o bactericida de la Lactoferrina en bacterias Gram negativas.....	42
Figura 9. Estructura tridimensional de la Lactoferrina quimera.	47
Figura 10. Lactoferrina bovina (bLF) inhibe el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	60
Figura 11. Lactoferrina bovina (bLF) inhibe el crecimiento de <i>S. aureus</i> resistente Metilcilina (MRSA).....	62
Figura 12. bLF y LF quimera presentan actividad bactericida sobre MRSA.....	65
Figura 13. bLF disgrega biofilms formados por <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	67
Figura 14. Lactoferrina bovina no disgrega biofilms formados por MRSA.....	68
Figura 15. bLF presenta sinergismo parcial con biofilms formados por MRSA	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proteínas de superficie de <i>S. aureus</i>	13
Cuadro 2. Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de la bLF en combinación con ampicilina en biofilms de <i>S. aureus</i>	72

I. RESUMEN

Introducción: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria Gram positiva, forma parte normal de la flora de los humanos, pero puede tornarse patógena y producir múltiples enfermedades, entre ellas infecciones en la piel e inclusive bacteriemia. La problemática global relacionada con *S. aureus* es que es un patógeno altamente resistente, especialmente a los beta-lactámicos lo que llevó a generar cepas resistentes a metilcilina o MRSA (por sus siglas en inglés). La resistencia a los fármacos de *S. aureus* aunado con su capacidad de formar biofilms, ha llevado a esta bacteria a ser un problema global con altas tasas de morbi-mortalidad y con gran dificultad para tratarla. Es por ello, que son necesarios tratamientos nuevos, y una opción podría ser la lactoferrina (LF) y sus péptidos sintéticos derivados. Objetivo: Evaluar la actividad microbicida de lactoferrina bovina y el péptido lactoferrina quimera en bacterias planctónicas y biofilms de *Staphylococcus aureus* cepas ATCC y un aislado clínico resistente a antibióticos. Materiales y Métodos: Se realizaron cinéticas de crecimiento en cepa ATCC 25923 y MRSA, en presencia y ausencia de LF bovina (bLF) y LF quimera, adicionalmente; se realizaron ensayos de unión a la membrana (bLF y LF quimera en MRSA), y microscopia electrónica para ver daños en *S. aureus*, y finalmente ensayos de inclusión de yoduro de propidio para determinar la actividad bactericida de bLF y LF quimera en bacterias planctónicas. En biofilms se realizaron ensayos de destrucción establecidos durante 12 y 24 h y se trataron durante 5 h con bLF y LF quimera para determinar la actividad anti-biofilm. Finalmente, se realizaron ensayos de sinergismo en biofilms de MRSA, con bLF y ampicilina para determinar una posible actividad sinérgica utilizando la formula FICI. Resultados: bLF inhibió el crecimiento en más del 80% de cultivos ATCC de *S. aureus*, mientras que bLF y LF quimera inhibieron más del 60% de los cultivos de MRSA en estado planctónico. El mecanismo de acción para generar la actividad bactericida de bLF y LF quimera fue mediante la unión de la membrana a MRSA, la desestabilización de ésta; permitiendo cambios morfológicos y lisis de las bacterias. Respecto a los biofilms, solamente bLF presentó actividad anti-biofilm en la cepa ATCC 25923, mientras que en los de MRSA ningún tratamiento mostró actividad. Finalmente, en los ensayos de sinergismo, cinco combinaciones de bLF con ampicilina mostraron sinergismo parcial en biofilms de MRSA. Conclusiones: La actividad bactericida, anti-biofilms y de sinergismo que mostró especialmente la bLF sobre ambas cepas de *S. aureus* la ubica como un serio prospecto con potencial para la profilaxis y terapéutica para las infecciones ocasionadas por *S. aureus* sensible o resistente a antibióticos.

Palabras claves: *S. aureus*, MRSA, *lactoferrina*, LF quimera, biofilms, sinergismo.

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a Gram-positive bacterium, that is normal part of the human flora, but it can become pathogenic and produce multiple diseases, including skin infections, even bacteremia. The global problem related to *S. aureus* is that it is a highly resistant pathogen, especially to beta lactams, which led to the generation of strains resistant to methicillin or MRSA. The resistance to drugs of *S. aureus*, coupled with its ability to form biofilms, has led this bacterium to be a global problem with high rates of morbidity and mortality and with great difficulty to treat. That is why alternative treatments are necessary and one option could be lactoferrin (LF) and its derivative synthetic peptides. Objective: To evaluate the microbicidal activity of bovine Lactoferrin and Lactoferrin chimera peptide in planktonic bacteria and biofilms of *Staphylococcus aureus* ATCC strains and a clinical isolate resistant to antibiotics. Materials and Methods: Growth kinetics in strain ATCC 25923 and MRSA in the presence and absence of bovine LF (bLF) and chimera LF, additionally, membrane binding assays (bLF and chimera LF with MRSA), structural changes of *S. aureus* and propidium iodide inclusion assays were carried out to determine the bactericidal activity of bLF and LF chimera in planktonic bacteria. Biofilm destruction assays set for 12 and 24 h and treater for 5 h with bLF, LF chimera were performed to determine anti-biofilm activity. Finally, synergism assays in MRSA biofilms between bLF and ampicillin were carried out on the MRSA strain to determine the synergistic activity using the FICI formula. Results: bLF inhibited the growth of more than 80% of the *S. aureus* ATCC strain, while bLF and chimera LF inhibited more than 60% of MRSA cultures in the planktonic state. The mechanism of action to generate the bactericidal activity of bLF and LF chimera was through the binding of the membrane to MRSA, the destabilization of this allowing morphological changes and the lysis of the bacteria. Regarding the biofilms, only bLF showed anti-biofilm activity in the biofilms of the ATCC 25923 strain, while in those of MRSA no treatment showed activity. Finally, in synergism assays, five combinations of bLF with ampicillin showed partial synergism in MRSA biofilms. Conclusions: The bactericidal, anti-biofilm and synergistic activity that bLF especially showed on both strains of *S. aureus* places it as a serious prospect as a complementary alternative for infections caused by antibiotic-sensitive or resistant *S. aureus*.

Keywords: *S. aureus*, MRSA, lactoferrin, LF chimera, biofilms, synergism.

II. MARCO TEÓRICO

A. *Staphylococcus aureus*

El cirujano escocés Alexander Ogston identificó por primera vez en 1880 una bacteria presente en el pus de heridas quirúrgicas de partes blandas. Debido a que crecía en colonias parecidas a racimos, en 1882 este mismo cirujano las nombró "*Staphylococcus*", del griego "Staphylo", que representa racimo de uvas (Pasachova Garzón, Ramírez Martínez, & Muñoz Molina, 2019).

Para el año de 1884, otro cirujano Anton J. Rosenbach identificó dos linajes de *Staphylococcus* y las clasificó de acuerdo a las coloraciones observadas en las colonias siendo *Staphylococcus aureus*, del latín "*aurum*" para el pigmento color oro o dorado, y *Staphylococcus albus* (hoy *Staphylococcus epidermidis*), del latín "albus" para el pigmento blanco (Pasachova Garzón et al., 2019). En 1940, el antibiótico de elección para tratar estas infecciones era la penicilina. No obstante, con el paso de los años y al uso desmedido de los antibióticos, algunas cepas adquirieron resistencia no solo a la penicilina, sino también a la metilcilina y al grupo de los β -lactámicos; adicionalmente, se han identificado cepas con resistencia a macrólidos y lincosamidas (Pasachova Garzón et al., 2019), incluso en algunos países se ha reportado resistencia al trimetoprima y a las sulfonamidas (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014) (García, Gay, Fontanil, & Nieto, 2011). Históricamente, la resistencia a los antibióticos ha sido una de las principales características de *S. aureus*, pero cuenta con múltiples factores de virulencia que a continuación se discutirán.

S. aureus está clasificada como un coco Gram positivo de 0.5 a 1 μm de diámetro divididos en tres planos para formar grupos de células irregulares. En extendidos de pus, se ha observado que los cocos aparecen solos, en pares, en racimos, o en cadenas cortas (Cervantes-García et al., 2014). La morfología de esta bacteria se caracteriza por formar colonias lisas, brillantes y convexas. Poseen un pigmento interno de color amarillo-naranja a blanco porcelana o bien color dorado. La mayoría de las cepas de *S. aureus* habitualmente son anaerobias facultativas por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con o sin oxígeno, no presenta movilidad ni forma cápsula (García et al., 2011).

Respecto a la bioquímica de este patógeno, para su identificación esta bacteria es β hemolítico, catalasa y coagulasa positiva, fermenta glucosa, lactosa y maltosa (García et al., 2011). *S. aureus* forma parte de la microbiota de los seres humanos encontrándose principalmente en piel, nasofaringe, pliegues inguinales y área axilar (Castro-Orozco et al., 2010). Sin embargo, este patógeno oportunista cuando encuentra condiciones favorables causa infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos, vasos sanguíneos), invade incluso dispositivos médicos. Por tanto, también ha sido relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), como hemos mencionado anteriormente (Cheung, Bae, & Otto, 2021).

B. EPIDEMIOLOGÍA DE *S. aureus*

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos causante de un gran rango de infecciones clínicas a nivel mundial. Esta bacteria es responsable de endocarditis infectiva, así como también de infecciones en huesos, articulaciones, tejido liso y a nivel pleuro-pulmonar, y en infecciones de dispositivos médicos tales como catéteres, en procesos invasivos, etc. (Lakhundi & Zhang, 2018).

En las pasadas dos décadas hemos sido testigos de cambios importantes en la epidemiología de *S. aureus*, primero: el crecimiento de infecciones asociadas al cuidado de la salud, en especial las endocarditis y las asociadas a dispositivos médicos, y segundo: el aumento en infecciones en tejido liso y piel adquiridas en la comunidad causadas por cepas con factores de virulencia y resistencia a los antibióticos β -lactámicos, sobre todo a metilcilina (Lakhundi & Zhang, 2018).

Las infecciones por MRSA afectaban con más frecuencia a individuos en contacto con instituciones sanitarias. No obstante, se ha reportado que, desde finales de la década de los noventa, las infecciones por MRSA adquiridas en la comunidad han llegado a ser habituales. En general, estas infecciones afectan a huéspedes inmunocompetentes y su gravedad varía desde infecciones cutáneas superficiales y los abscesos de tejidos blandos hasta la enfermedad invasiva, incluida neumonía necrosante, piomiositis, osteomielitis, sepsis grave y la muerte (García et al., 2011).

Según uno de los reportes del centro National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS), en Estados Unidos de América se identificó a esta bacteria en hospitales de tercer nivel, un incremento de la prevalencia de MRSA de

un 4 % en 1980 hasta a un 55 % en 2001. Sin embargo, para algunos hospitales se ha reportado una frecuencia de resistencia de hasta 80 % (Guo, Song, Sun, Wang, & Wang, 2020). En Estados Unidos se ha estimado que el 1.5% de la población esta colonizada con MRSA, con incidencia de 20-30 casos por cada 100 000 habitantes por bacteriemia ocasionada por este patógeno (Laupland et al., 2013). Respecto a la mortalidad, se ha demostrado que es tres veces más frecuente en personas de 65 años, siete veces más frecuente en personas de 75 años y 20 veces más frecuente en personas de 85 años y más. La tasa de mortalidad por MRSA puede llegar a ser hasta del 30% (Chang et al., 2003).

Respecto a otros países, en Colombia se realizó una investigación de prevalencia de *S. aureus* metilcilina resistente en niños escolares de Cartagena en el año 2010, donde se determinó una prevalencia de colonización de MRSA en niños desde el 9 al 31% entre (media 24 %) (Castro-Orozco et al., 2010).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 a 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados hasta un 50 % (Ponce-de-León et al., 2010). Es importante mencionar que estos elevados números de incidencia, prevalencia y mortalidad de *S. aureus* es debido a que cuenta con múltiples factores de virulencia para evadir el sistema inmune, colonizar y generar daño en el paciente, mismo que serán descritos a continuación.

C. FACTORES DE VIRULENCIA

S. aureus es el principal agente etiológico causante de bacteriemia nosocomial a nivel mundial, principalmente porque se ha vuelto resistencia a los antibióticos, y a la adquisición de factores de patogenicidad, repercutiendo con ello en virulencia y del patógeno. Ejemplo de ello es la gran variedad de proteínas las cuales pertenecen a las moléculas de la matriz adhesiva (MSCRAMM), entre las cuales se encuentran las proteínas de unión a la fibronectina, proteínas de unión al fibrinógeno (factor Clumping) y toxinas (α y β), presentes en la superficie de la bacteria cuya función es la colonización e invasión celular al hospedero y favorecer la formación de biopelículas (Pasachova Garzón et al., 2019). El conjunto de estos mecanismos de patogenicidad y virulencia se encuentra íntimamente relacionado con la capacidad de *S. aureus* de persistir en el huésped y en el ambiente, contrarrestando factores adversos tales como componentes del sistema inmune y a los antimicrobianos (Beceiro, Tomás, & Bou, 2012; Lowy, 1998).

1. Componentes de la pared celular

La pared celular de *S. aureus* posee carbohidratos, así como proteínas de superficie involucradas en la adhesión de la bacteria a tejidos del hospedero humano, en la Figura 1 se muestra la estructura clásica de la pared celular de una bacteria Gram positiva. Cerca de 24 proteínas se encuentran en la pared celular de *S. aureus*, siendo las más importantes proteínas de unión a colágeno (*CBP*), fibrinógeno (*FbBP*) y fibronectina (*FnBP*), entre otras (Pasachova Garzón et al.,

2019), las cuales serán descritas más adelante. La función de estas adhesinas de *S. aureus* es obviamente facilitar la unión a componentes de las células del huésped; por consiguiente, a los subendotelios y a los coágulos formados por fibrina, finalizando entonces con el establecimiento de este patógeno a los tejidos que invade, paso crucial para la infección (Sutton et al., 2021).

2. Peptidoglicano

Un componente esencial y muy importante para la virulencia y patogenicidad de *S. aureus* es el peptidoglicano, una matriz de polisacárido compuesta de subunidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNac) (Romaniuk & Cegelski, 2018). El peptidoglicano se puede describir como una cadena de unión cruzada con puentes de pentaglicina, específicos de *S. aureus*. Además, también tiene ácidos teicoicos, que son polímeros que contienen grupos fosfatos. Algunos están unidos al peptidoglicano y son secuencias de ribitol-fosfato, mientras que otros se unen a los lípidos de la membrana citoplásmica de *S. aureus* y son del tipo glicerol-fosfato. Cabe aclarar que estas moléculas son distintivas de *S. aureus*, pero están presentes en diferentes formas en todas las especies del género (Du et al., 2021). La función de este componente celular es darle la forma característica a *S. aureus*; adicionalmente, brindarle integridad a la bacteria en estrés osmótico.

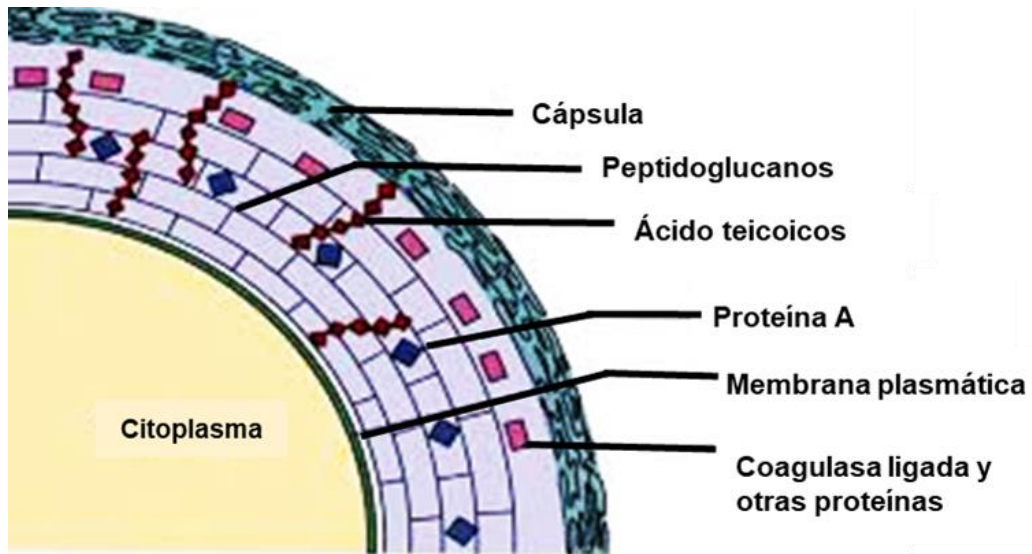


Figura 1. Estructura de la membrana de *S. aureus*. Se observa que la pared bacteriana contiene tres componentes principales: ácidos teicoicos, el peptidoglucanos y la proteína A. El peptidoglucano, posee la cadena de unión cruzada con puentes de pentaglicina, específicos de *S. aureus*. Tomado y modificado de Borraz, 2005.

3. Ácidos teicoicos o polisacáridos A:

Los ácidos teicoicos de *S. aureus* se definen como polímeros de polialcohol (glicerol o ribitol) unidos mediante enlaces fosfodiéster. Estos ácidos se encuentran en la pared celular de las Gram positivas, tales como especies de *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, y *Staphylococcus*, extendiéndose sobre la superficie de la capa de peptidoglicano (Rohde, 2019). Estos polímeros de fosfato específicos de especie se unen covalentemente al peptidoglicano de la pared celular de las bacterias o bien a los lípidos de la membrana. Notablemente, este componente es el más abundante de la pared celular y participa en la unión de los *Staphylococcus* a las superficies de las mucosas a través de las proteínas mencionadas anteriormente en el texto. Por lo tanto, estas moléculas tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos, por otro lado cargan negativamente la pared celular, participan en la estabilidad y arquitectura de la estructura de la pared celular de estas bacterias (Visansirikul, Kolodziej, & Demchenko, 2020).

4. Cápsula externa o glucocálix

Algunas de las cepas de *S. aureus* se encuentran recubiertas de cápsula mucoide, ésta se forma principalmente por polisacáridos externos. Está cubierta incrementa la capacidad de adherencia al hospedero. Así mismo, evita que sea reconocido y evada el efecto fagocítico del sistema inmune (Hurtado, De la Parte, & Brito, 2002). Actualmente son 11 los serotipos capsulares de *S. aureus*, de ellos, los que tienen las cápsulas más gruesas son el 1 y el 2. No obstante; aparentemente este factor no

se asocia con enfermedad. Se ha sugerido que los serotipos 5 y 8 son los responsables de la mayor parte de las infecciones en humanos, específicamente el serotipo 5 se asocia a la mayoría de las cepas de MRSA (Visansirikul et al., 2020).

5. Proteínas de la superficie celular de *S. aureus*

Es importante mencionar que *S. aureus* contiene componentes de superficie microbiana que reconocen componentes de la matriz extracelular. *S. aureus* forma grumos en presencia de plasma, esta es una de las características más importantes y merece una mención especial. Nuevamente, esta habilidad está relacionada con las proteínas de adhesión al fibrinógeno, ya que forman una especie de entramado o red entre la bacteria y el fibrinógeno del hospedero, lo que a su vez ocasiona aglutinación. La afinidad que presenta la proteína de unión a fibrinógeno es muy alta, ya que aun cuando hay muy poca concentración de fibrinógeno la aglutinación o grumos son visibles. Este factor está dado por dos proteínas la *ClfA* y la *ClfB*. A ambas proteínas se les ha vinculado directamente con la endocarditis invasiva producida por *S. aureus* al unirse al fibrinógeno presente en este sitio anatómico del hospedero (Miller & Bassler, 2001). Así como estas proteínas de superficie existen otras proteínas que tienen funciones muy definidas en *S. aureus*, las cuales se engloban en la Figura 2 y Cuadro 1.

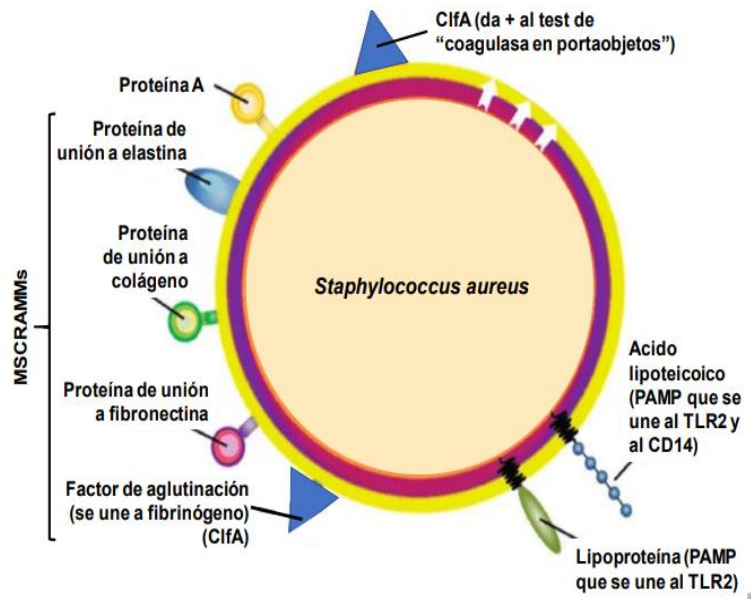


Figura 2. Proteínas de superficie de *S. aureus*. Tomado de (Camussone, 2013).

Cuadro 1. Proteínas de superficie de *S. aureus*.

Proteína de superficie de <i>S. aureus</i>	Función	Referencia
Factor de agrupamiento B	Adhesión a células de las fosas nasales y de la piel, colonización. Evasión del sistema inmune.	(V. K. Ganesh et al., 2011)
Proteína repetida de aspartato de serina C	Adhesión y colonización a células nasales. Formación de biofilms.	(Feuillie et al., 2017)
Proteína repetida de aspartato de serina D	Adhesión a células nasales y evasión del sistema inmune.	(Corrigan, Miajlovic, & Foster, 2009)
Proteína repetida de aspartato de serina E	Evasión del sistema inmune y degradación del C3b	(Sharp et al., 2012)
Proteína de unión a fibronectina A y B	Adhesión a la matriz extracelular	(Bingham et al., 2008)
Proteína de unión al colágeno	Adhesión a los tejidos ricos en colágenos, evasión de la activación del complemento	(Zong et al., 2005)
Proteína A	Inhibe opsonización, inflamación y participa en la infección endovascular	(Graille et al., 2000)
Proteína de superficie G de <i>S. aureus</i>	Adhesión a células epiteliales, formación de biofilms.	(Roche, Meehan, & Foster, 2003)
IsdB	Adquisición y consumo de hierro	(Zapotoczna, Jevnikar, Miajlovic, Kos, & Foster, 2013)
IsdH	Adquisición y consumo de hierro	(Visai et al., 2009)

Adicionalmente, de todas las proteínas de superficie de *S. aureus* previamente mencionadas para colonizar al huésped, ésta bacteria cuenta con otras proteínas para provocar daño en el huésped posteriormente a su colonización, entre ellas están las enzimas.

6. Enzimas

S. aureus produce varias enzimas, proteasas, lipasas y hialuronidasas que destruyen tejidos. Estos productos bacterianos pueden facilitar la diseminación de la infección a los tejidos adyacentes, a pesar de que su papel en la patogenicidad no está bien definido.

S. aureus puede ejercer diferentes mecanismos para su subsistencia y protección contra los antibióticos, la cual utilizan una serie de mecanismos llamados de resistencia, que podemos resumir como inactivación enzimática del antibiótico, mecanismo en la que la bacteria genera una sustancia (enzima) que altera o destruye la estructura química de la molécula antibiótica (ej. betalactamasas para los antibióticos betalactámicos, aciltransferasas para los aminoglicosidos o cloranfenicol) (Vestergaard, Frees, & Ingmer, 2019).

La β -lactamasa es una enzima que inactiva la penicilina. Las proteínas fijadoras de penicilina son enzimas localizadas en la membrana citoplasmática implicadas en el ensamblaje de la pared bacteriana (Oteo & Belén Aracil, 2015).

Resumiendo lo anterior, *S. aureus* genera acumulo de pus, a nivel localizado, no obstante; puede diseminarse y establecer otros focos de infección mediante el sistema vascular, pudiendo ocasionar cuadros de reacción inmunológica severa, shock por toxinas las cuales tienen el potencial de inducir una rápida respuesta similar a un veneno. Por tanto; se describe con frecuencia en infecciones por *S. aureus* cuadros focales como foliculitis, inflamación como respuesta al acumulo de pus (agua, leucocitos, tejido necrótico) alrededor de folículos pilosos, forunculosis, que es un área purulenta sobre el folículo piloso y forma un saco de pus circundado por células reclutadas después de la señalización para la inducción de inflamación; y abscesos purulentos que compromete varios niveles de tejido incluso pudiendo llegar a hueso, los que resultan sumamente dolorosos (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015).

1) Catalasa

La catalasa es enzima de microorganismos que poseen citocromos, de hecho, se encuentra en todos ellos. Las bacterias que sintetizan esta enzima hidrolizan peróxido de hidrogeno en sitios acuosos y oxigeno gaseoso, que se libera en forma de burbujas. *Streptococcus* y *Staphylococcus* que contienen catalasa y su común denominador es que son las principales causantes de las enfermedades de origen infeccioso en el hombre y los animales. Ambos tipos de bacterias son clasificadas como cocos Gram positivos. A pesar de que a menudo tienen diferente morfología, cuando se examina con un microscopio, a veces es difícil determinar si la infección

es por *Streptococcus* o *Staphylococcus* después de la tinción de Gram positivo (El Haj, Lichtenberg, Nielsen, Bjarnsholt, & Jensen, 2021).

La importancia de la prueba de la catalasa hace que sea fácil distinguir entre *Streptococcus* y *Staphylococcus*, ya que *Staphylococcus* es catalasa positivo y *Streptococcus* son catalasa negativo (El Haj et al., 2021). Para los investigadores la catalasa es una de las enzimas involucradas en la destrucción del peróxido de hidrógeno, el cual es un compuesto altamente tóxico y generado en los procesos metabólicos de la célula. Esta enzima en *S. aureus* es una proteína tetramérica presentando grupos hemo y moléculas de NADPH en su estructura generado durante el metabolismo celular, esto responde a la categoría de las oxidorreductasas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno y agua. La catalasa también utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso (Céspedes Miranda, Hernández Lantigua, & Llópez Janer, 1996).

2) Coagulasa

La coagulasa es una enzima que como mencionamos anteriormente es producida por varios microorganismos patógenos, ya que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. Así mismo, tiene utilidad en el laboratorio ya que se usa para diferenciar entre diferentes cepas de *Staphylococcus*. Un resultado coagulasa positivo indica que una muestra contiene *S. aureus* (McAdow, Missiakas, & Schneewind, 2012). Por otro lado, la coagulasa reacciona con la protrombina en la

sangre, dando lugar a un complejo llamado estafilotrombina. La función de este complejo está implicada en la conversión del fibrinógeno a fibrina, evento que termina en la coagulación de la sangre. La coagulasa representa un factor de virulencia muy importante para esta bacteria, ya que actúa como un activador de protrombina que convierte el fibrinógeno a fibrina, llevando alteraciones en la coagulación y por lo tanto a daño en el hospedero (Crosby, Kwiecinski, & Horswill, 2016).

3) Hialuronidasa

La enzima hialuronidasa es la encargada de destruir el ácido hialurónico y por lo tanto le permite a *Staphylococcus* su fácil diseminación en el hospedero. El gen que codifica para esta enzima se encuentra en el cromosoma y al igual que en *S. aureus* otras bacterias también contienen esta enzima, como es el caso de *Streptococcus pneumoniae* (Ibberson et al., 2014).

Durante la colonización por *S. aureus*, la hialuronidasa rompe los ácidos hialurónicos del tejido conectivo, facilitando que las proteínas de *S. aureus* puedan tener acceso fácilmente en los tejidos y finalizar el proceso de colonización. De esta manera, *S. aureus* también puede liberar otras enzimas y proteínas involucradas en el daño al hospedero.

4) Penicilinas

Las penicilinas son antibióticos del grupo de los betalactámicos empleados en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias *S. aureus* sensibles. Las llamadas penicilinasas o β -lactamasas, permite la modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), lo que lleva a la evasión del efecto de la penicilina en *S. aureus*, convirtiéndola en MRSA. Genéticamente, esta resistencia es debida a la presencia del gen *mecA*; la resistencia a las penicilinas es uno de los fenómenos más importantes de esta bacteria, tema que se complementará más adelante (Turner et al., 2019).

5) Otras enzimas

S. aureus producen varias enzimas, dentro de las cuales se destacan las proteasas, lipasas entre otras que destruyen tejidos. Estos productos bacterianos pueden facilitar la diseminación de la infección a los tejidos adyacentes. La mayoría de las cepas de *S. aureus*, además sintetizan otras enzimas como nucleasas y proteasas, las cuales destruyen los tejidos del hospedero, enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y estafiloquinasas. Por otro lado, la fibrinolisisina se encarga de disolver los coágulos de fibrina. Las lipasas ayudan a la supervivencia de *S. aureus* en regiones sebáceas y las nucleasas/DNAsas, ayudan a esta bacteria a obtener nucleótidos (Tam & Torres, 2019).

7. Toxinas

1) Hemolisina

La toxina hemolisina es un pequeño polipéptido de 3 kDa producido por la gran mayoría de las cepas de *S. aureus*, también por *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*. Se produce en la fase de crecimiento tardío. HlyA es un importante factor de virulencia producido por cepas uropatógenas de *Escherichia coli*. Su expresión se correlaciona con una mayor severidad de las infecciones producidas por estas cepas con mayor prevalencia de daño renal y bacteriemia (Mehmeti, Bytyqi, Muji, Nes, & Diep, 2017), se han identificado cuatro denominadas alfa, beta, gamma y delta. Poseen capacidad hemolítica y citolíticas actuando sobre determinadas células eucariotas del huésped como leucocitos, macrófago, plaquetas y fibroblastos. La toxina alfa es la mejor estudiada. Parece intervenir en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el balance iónico (Zhang, Hu, & Rao, 2017).

2) Leucocidina de Pantón-Valentine

La leucocidina de Pantón-Valentine (por sus siglas: LPV) es una exotoxina producida por diferentes cepas de *S. aureus*. Las infecciones por *S. aureus* con esta exotoxina ocasiona infecciones rápidas y graves de partes blandas, provocando neumonía necrosante. Esta toxina está codificada por los genes *LukS/LukF* (Leistner et al., 2022), y es sintetizada por el 2-3% de las cepas, está compuesta por dos

subunidades proteicas (la F y S), que se sintetizan independientemente, y actúan en forma sinérgica sobre las membranas fagocíticas. Se une a los fosfolípidos de la membrana de los leucocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que destruyen la célula al alterar la permeabilidad celular. Es importante mencionar que la LPV actúa en la membrana externa de los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos y los macrófagos. Ambas subunidades inducen la apertura de los canales de calcio y, en consecuencia; producen la liberación de calcio y de mediadores inflamatorios, lo que deriva en apoptosis y necrosis (Qu et al., 2022).

3) Toxinas exfoliativas o epidermolíticas

Las toxinas exfoliativas son enzimas que degradan residuos de serina. La principal función de estas proteínas es catalizar la destrucción de la proteína desmogleína-1, proteína crucial en la adhesión de queratinocitos del estrato granuloso en constituyente de la epidermis. Estas toxinas se relacionan principalmente con el síndrome de piel escaldada por *Staphylococcus*, un proceso secundario a la dermatitis exfoliativa ocasionado por estas enzimas. La prevalencia de cepas productoras de estas toxinas varía geográficamente, pero generalmente es inferior al 5-10%. Actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin citólisis ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran ni leucocitos ni *Staphylococcus* (Gismene et al., 2022).

4) Enterotoxinas

La enterotoxina B estafilocócica (EBE) es una exotoxina producida por *S. aureus*. Es una de las toxinas responsables de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus* en humanos, son producidas por el 30-50% de las cepas de *s. aureus*. Se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I) siendo el serotipo A el más común de todos ellos. Estas actúan como un antígeno, induciendo la liberación de citosinas por macrófagos y linfocitos T. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales y a altas concentraciones tiene efecto citotóxico. Tiene una transmisibilidad alta, La enterotoxina B de *S. aureus* es altamente tóxica y se puede adquirir por inhalación e ingestión. Debido a esto, podría ser administrada en los alimentos, en el agua o en aerosol en bioterrorismo (Song et al., 2016). Por otro lado, son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis, esta toxina se ha asociado al síndrome de shock tóxico (Yamasaki et al., 2021).

El síndrome de shock tóxico (SST) es causado por bacterias cocoides productoras de exotoxinas. Las cepas de *S. aureus* que producen la toxina TSS-1 (TSST-1) o exotoxinas relacionadas y ciertas cepas de *Streptococcus pyogenes* producen al menos 2 exotoxinas potencialmente mortales (Yamasaki et al., 2021). Tienen un periodo de incubación tras la ingestión, entre 4 y 10 h. No obstante, a partir de que una persona se infecta con estas cepas, los síntomas generalmente aparecen luego de 3 a 12 h. Las importantes tasas de morbilidad ocurren luego de la

ingestión o la exposición a aerosoles. La morbilidad tan alta por infecciones con estas cepas ocurre posteriormente de la inhalación, y oscila entre el 50 % y el 80 %, e inclusive un poco más. Dependiendo de la dosis de toxinas ingeridas, sería la severidad de los signos clínicos y sus consecuencias, así como también dependerá de las vías de contagio. Por ejemplo, es más severa y mortal la infección vía aerosoles comparada con la ingestión en personas infectadas en forma natural por intoxicación alimentaria (Bae et al., 2021).

D. PATOGENIA

S. aureus es una bacteria que lleva a cabo la invasión directa en la piel y mucosas, es por ello que su localización más frecuente es en tejidos blandos. Muchas de las infecciones por *S. aureus* inicia por una herida, o bien catéteres o algún dispositivo médico. Por otro lado *S. aureus* al ser parte de la flora de los humanos, no se puede descartar que ataque al paciente cuando este se encuentre con el sistema inmune deprimido. El primer paso en la patogenia de esta bacteria es la adhesión al huésped, pero esto no sería posible si mediante su cápsula y algunas proteínas de la superficie celular (que se citan en el Cuadro 1) evada la inmunidad del paciente. Una vez evadiendo la inmunidad, *S. aureus* procede a colonizar al huésped, para ello a través de sus enzimas hialuronidasa expone los receptores superficiales de las células para que esta bacteria pueda colonizar. En este punto las proteínas de superficie como lo son las proteínas repetidas de aspartato y serina ayudan a la adhesión y colonización del huésped (Cheung et al., 2021).

Colonizado el huésped, *S. aureus* comienza a liberar sus toxinas como hemolisina y las otras previamente mencionadas. Este fenómeno provocará daño a las células del huésped, ocasionando así las enfermedades características de esta bacteria; por supuesto, depende de la localización de la bacteria es la enfermedad que estará ocasionando (Olarte et al., 2010).

La patogenia de esta bacteria no para en este punto, para esta bacteria no basta con el daño que realiza en un determinado tiempo, sino que *S. aureus* cuenta con diversos mecanismos para persistir en el huésped y seguir ocasionado daño de manera crónica, entre ellos se encuentra la resistencia a los antibióticos y la formación de biofilms, temas que serán descritos a continuación.

E. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Las bacterias desarrollan al menos cuatro mecanismos para generar resistencia a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas diana (PBPs), alteración de la membrana externa, producción de enzimas con capacidad de inactivar (betalactamasas) y bombas de flujo para explosión de los antibióticos, como lo muestra la Figura 3 (Castellano González & Perozo-Mena, 2010).

Los investigadores Castellano y cols., (2017) colocan a *S. aureus* el cual es un microorganismo que revierte la acción de los agentes antimicrobianos, adquiriendo o

adaptándose a través de diferentes mecanismos a todos los antibióticos disponibles para la profilaxis o terapéutica de las infecciones que ocasiona. De los mecanismos previamente mencionados, *S. aureus* se caracteriza por estos tres de ellos, específicamente a los β -lactámicos: 1) resistencia mediada por enzimas (tales como la penicilinasasa o β -lactamasa) las cuales desactivan al antibiótico; 2) resistencia intrínseca, debido a la inactivación de los antibióticos y la modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) (Castellano González & Perozo-Mena, 2010).

La resistencia a los β -lactámicos es una de las principales características de *S. aureus*, de hecho, es por ello por lo que ha sido catalogada como una de las 10 bacterias más peligrosas a nivel mundial según la OMS, debido a esta resistencia. La resistencia a este grupo de antibióticos, específicamente a la metilcilina, ha llevado a darle un nuevo nombre a este grupo de bacterias llamadas *S. aureus* resistente a metilcilina o MRSA (por sus siglas en inglés)

F. RESISTENCIA A METILCILINA

Como un dato histórico se señala que la resistencia a las penicilinas apareció en la década de los 50's, lo cual llevó a la generación de nuevos antibióticos como lo son las cefalosporinas, penicilinas sintéticas, entre ellas la metilcilina. Un año después del lanzamiento de la metilcilina, se asiló el primer MRSA y en 1963 se reportó el primer brote hospitalario, desde ese momento al día de hoy se ha reportado en todo el mundo este patógeno (Liebowitz, 2009).

Los mecanismos moleculares mediante el cual esta bacteria genera resistencia a los β -lactámicos es el siguiente: primeramente, la producción de la enzima β -lactamasa, también por la presencia de proteínas ligadas a la penicilina (PBP por sus siglas en inglés) modificadas y finalmente, los fenómenos de tolerancia. Sin embargo, hablando específicamente en la resistencia a metilcilina, *S. aureus* crea una nueva proteína PBP (conocida como PBP2a o PBP2), la cual exhibe poca afinidad a la metilcilina y otros β -lactámicos evadiendo así el efecto del antibiótico. Desde el punto de vista genético, el gen *mecA* es el responsable de la resistencia a metilcilina, la expresión de este gen depende de otros dos más el *mecR1*, que regula la transcripción, y el *mecI*, que codifica la proteína represora, al intentar generar un proceso catalítico en la membrana el antibiótico, genera la activación de *mecA* (Peacock & Paterson, 2015). Sin embargo, la resistencia de esta bacteria no es solamente por los mecanismos previamente mencionados, sino también por su capacidad para formar biofilms o biopelículas.

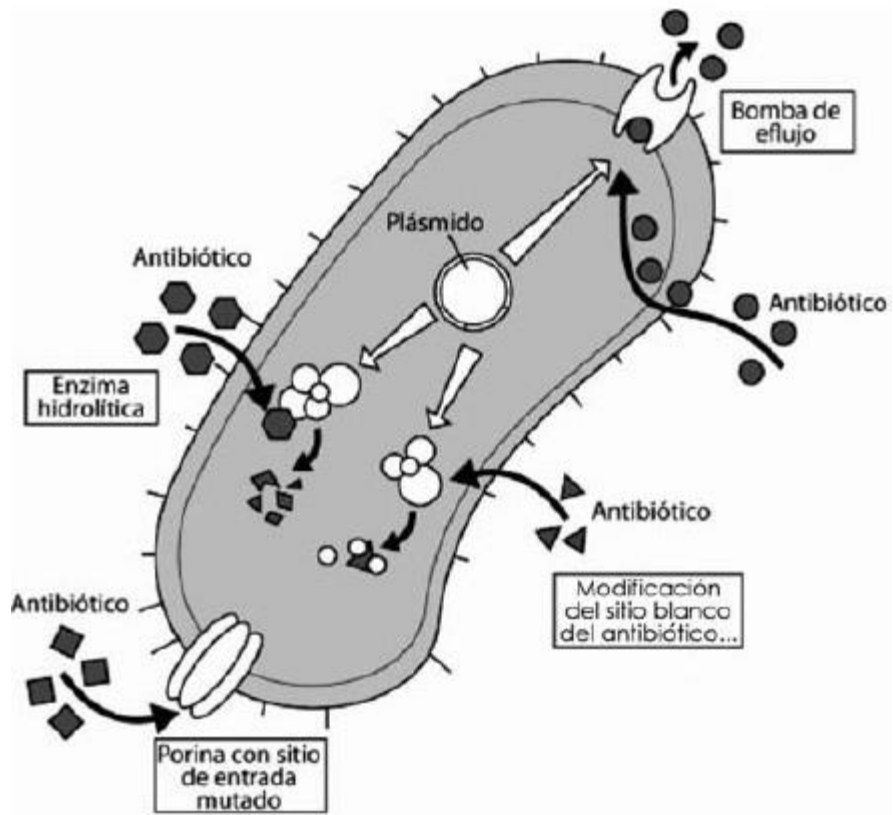


Figura 3. Mecanismo bacteriano para generar resistencia a los antibióticos.

G. BIOFILMS

Se han utilizado muchas definiciones diferentes para los biofilms o biopelículas. La mayoría define la biopelícula como una comunidad microbiana de células que está incrustada en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que han producido, la cual les brinda protección a las bacterias contra agentes externos, ya sean antibióticos o células del sistema inmune. Algunos investigadores restringen el término "biopelícula" a los agregados adheridos a una superficie, que pueden ser bióticos o abióticos. Para otros, los agregados bacterianos que flotan libremente también representan biopelículas. Las células en una biopelícula muestran característicamente un fenotipo, con respecto al metabolismo, la transcripción de genes y la producción de proteínas, que es diferente del que se observa durante el crecimiento planctónico (Yin, Wang, Liu, & He, 2019).

El desarrollo de biopelículas se ha estudiado exhaustivamente *in vitro* utilizando muchas configuraciones y microorganismos diferentes. Comúnmente, se describe como un proceso de 3 etapas principales: adherencia o colonización, proliferación / maduración y desprendimiento (dispersión) como se muestra en la Figura 4. La adhesión que es la primera etapa de formación de la biopelícula, en esta etapa las bacterias emiten señales para unirse y establecerse, las condiciones ambientales como la temperatura, osmolaridad, pH, presencia de hierro y oxígeno, son importantes para que se lleve a cabo este proceso entre las bacterias y la superficie que desean colonizar. Por otro lado, también interviene la polaridad y las

interacciones hidrofóbicas presentándose una mayor unión en superficies rugosas e hidrofóbicas como el látex y el plástico (O'Toole, Kaplan, & Kolter, 2000).

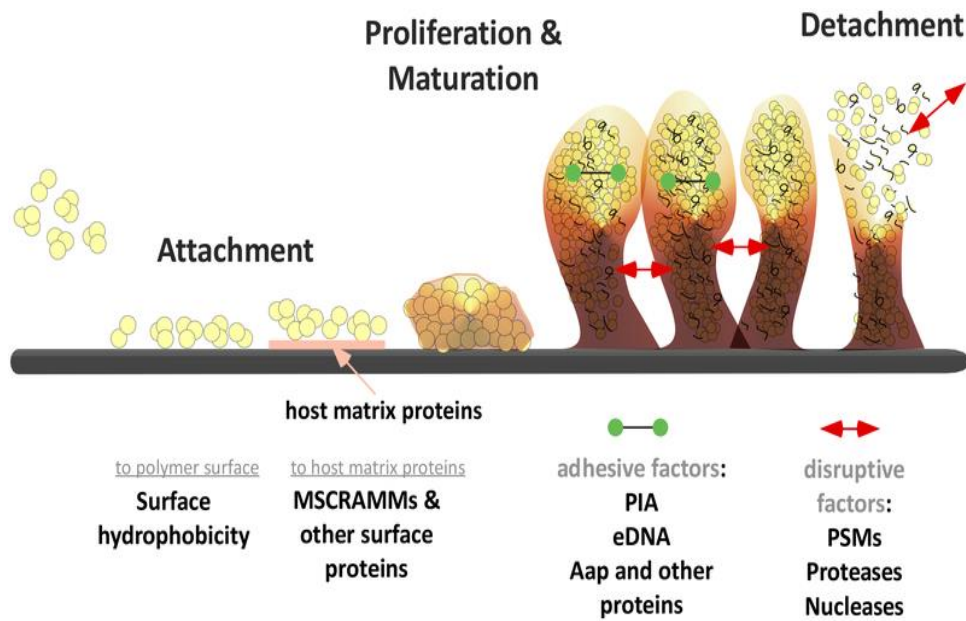


Figura 4. **Formación de biofilm.** Un biofilm o biopelícula se constituye de aproximadamente 15% de células y un 85% de matriz extracelular. Esta matriz generalmente se forma por exopolisacáridos, que tiene canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes, y residuos. Tomado de Lasa, I., y cols., (2005).

En el caso de *S. aureus*, para que se lleve a cabo la primera etapa que es la adhesión ya sea en superficie inerte o viva, intervienen las proteínas de superficie (polisacárido/adhesinas capsulares PS/A), autolisinas y fibrillas poliméricas extracelulares. No obstante, la función de estos compuestos no solamente es unirse al huésped, sino también exponer los receptores del huésped para que se lleve a cabo la unión, y a evadir los mecanismos de inmunidad del hospedero. Generalmente después del proceso de adhesión, comienzan a formar los biofilms mediante la producción de exopolisacáridos (Solano, Echeverz, & Lasa, 2014). En ésta etapa el polisacárido de adhesina intercelular (PIA) es catalizado por enzimas del operón *ica*, el cual posee los genes *icaR* (regulador) *icaADBC* (biosintéticos), siendo el PIA un componente de suma importancia en los biofilms, junto con el DNA extracelular (DNAe) quien le brinda estabilidad, soporte y es un medio de comunicación para los biofilms, adicionalmente se utiliza como una fuente de carbono cuando los nutrimentos se encuentran escasos. Otros componente dentro de los biofilms, son proteína solubles, lípidos, vesículas provenientes del exterior de las bacterias, en la Figura 5 se muestran los componentes de un biofilms (McCarthy et al., 2015).

Una vez adheridas las bacterias al huésped, comienza la maduración de la biopelícula, donde hay crecimiento y división celular, las células resultantes se diseminan por el lugar colonizado y forman una matriz extracelular (Lister & Horswill, 2014). La última etapa de formación de la biopelícula es la separación, ocurre cuando el nicho se encuentra sobresaturado o escasean los nutrientes, por lo tanto

es insuficiente y debido a esto, por medio de señales químicas comienza el desprendimiento de partes de la biopelícula bacteriana para colonizar nuevas superficies (Lister & Horswill, 2014).

La formación de biopelículas *in vivo* está sujeta a varios factores como lo son las interacciones con las defensas innatas del huésped, además de la interacción con los antibióticos durante la terapia con antibióticos. Las defensas innatas del huésped consisten principalmente en fagocitos, por neutrófilos y macrófagos, y péptidos antimicrobianos (AMP), que forman parte de los mecanismos de destrucción intracelular que emplean los fagocitos (Lister & Horswill, 2014). Se ha estimado que las biopelículas proporcionan una tolerancia entre 10 y 1000 veces mayor a los efectos de los antibióticos (Lister & Horswill, 2014).

La disminución de la eficacia anti-biofilm de los antibióticos se debe a la poca penetración y los cambios de las bacterias dentro de los biofilms. Por ejemplo, la reducida actividad proliferativa y metabólica de las bacterias en los biofilms las hace más tolerantes a los antibióticos en general. Por último, se ha demostrado que los biofilms contienen más células latentes llamadas "persistentes" que son resistentes a los antibióticos, en comparación con la mayoría de la población bacteriana (Pang, Raudonis, Glick, Lin, & Cheng, 2019). La formación de los biofilms depende de un mecanismo sumamente eficiente llamado Quorum sensing, encargado de censar el ambiente y desencadenar la formación de biofilms.

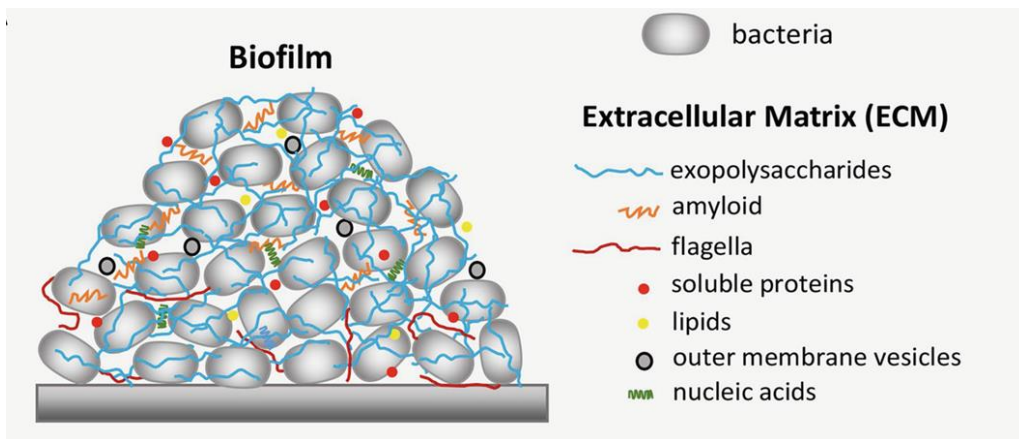


Figura 5. Componentes de un biofilm. Los biofilms no solamente están compuestos por el exopolisacáridos, sino también por DNA extracelular, proteínas solubles, lípidos, entre otros.

1. Quorum sensing en *S. aureus*.

El sistema Quorum Sensing (QS) es la capacidad que tienen las bacterias en estado planctónico para detectar otros miembros de la misma especie, asimismo regular la expresión diferencial de genes. Esto implica la utilización de moléculas intermediarias para la regularización de la expresión de genes, moléculas como autoinductores los cuales se ven relacionados con la densidad y el número de las células (Warrier, Satyamoorthy, & Murali, 2021).

En el Quorum sensing (QS) de *S. aureus* participan el locus *agr*, el cual está constituido por RNAII y RNAlII dependientes de dos promotores, el P2 y el P3. El RNAII contiene 4 genes (*agrB*, *agrD*, *agrC*, y *agrA*), el gen *agrB* cumple funciones tales como controlar la densidad bacteriana necesaria y además activa la fosforilación. En consecuencia, este junto con el gen *agrD* están implicados en la producción de autoinductores, que a su vez con la proteína *agrC* promueven la transcripción de RNAII y RNAlII, Figura 6 (P. S. Ganesh et al., 2022).

El operón P2 codifica (a través de RNAII) el mecanismo de señalización, mientras que la transcripción del operón P3, RNAlII, actúa como la molécula efectora del locus *agr* (P. S. Ganesh et al., 2022).

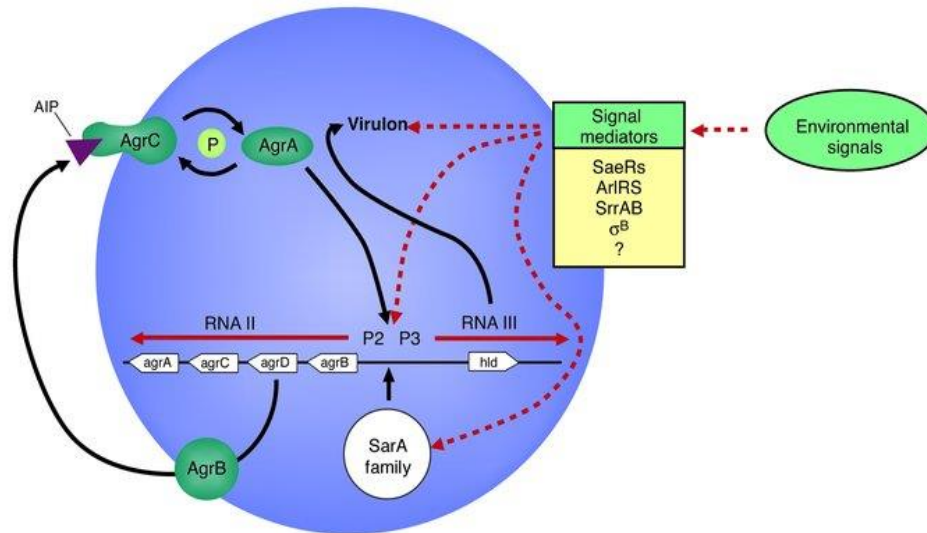


Figura 6. Sistema regulador de genes accesorio (*agr*) en *Staphylococcus*. El regulador genético accesorio (*agr*) sistema en *Staphylococcus*. El operón P2 codifica (a través de RNAII) el mecanismo de señalización, mientras que la transcripción del operón P3, RNAIII, actúa como la molécula efectora de la *agr* lugar. Se enumeran reguladores adicionales de los genes de virulencia y respuesta de quórum, descritos en el texto. Las vías reguladoras potenciales utilizadas por las señales ambientales están indicadas por las líneas rojas discontinuas. Tomado de J ClinInvest. 2003.

2. El sistema *agr*

El locus *agr* tiene un tamaño de 3.5 kb y consta de dos unidades RNAII y RNAIII, cuya transcripción es impulsada por los promotores P2 y P3, respectivamente. El intermediario sintetizado por el sistema *agr* para modular la formación de biofilms es llamado péptido autoinductor (PAI). El PAI tiene 7-9 aminoácidos de longitud y contiene un anillo característico de tiolactona entre la cisteína localizada centralmente y el terminal C. El producto del gen *agrB* del RNAII es una endopeptidasa transmembrana la cual se encarga de la introducción de la modificación de tiolactona, la escisión C-terminal y la exportación de la PAI en el medio extracelular (Massimi et al., 2002). Los genes *agrC* y *agrA* del RNAII codifican un sistema de transducción de señales de dos componentes que involucra un sensor de histidina quinasa *agrC*, una proteína transmembrana que se fosforila tras la unión de PAI, y su regulador de respuesta asociado-AgrA. Al ser activado por fosforilación dependiente de *agrC*, *agrA* se une a la región promotora P2 para RNAII y a la región promotora P3 para RNAIII. El evento final desencadena en el censo del medio ambiente y la atracción entre las bacterias para la adhesión y formación de los biofilms

La importancia del sistema *agr* en el QS radica en que este regula los factores de virulencia *S. aureus*, por lo tanto, cualquier alteración en este sistema puede afectar la virulencia de este patógeno (Azara et al., 2022; Derakhshan, Navidinia, & Haghi, 2021). Como se mencionó previamente, *S. aureus* sensible o resistente a los beta-lactámicos, cuenta con múltiples herramientas para colonizar, atacar y persistir

en el huésped. Los tratamientos actuales han perdido eficacia ante esta bacteria por la resistencia que tienen en contra de los antibióticos y la capacidad para formar biofilms, es por ello por lo que soluciones alternativas son necesario. Recientemente, las proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana del sistema inmunológico han capturado la atención de los investigadores para atacar las infecciones bacterianas, dentro de estas opciones se encuentra la lactoferrina (LF) y sus péptidos sintéticos derivados.

H. LACTOFERRINA

La LF es una glicoproteína multifuncional, considerada parte de la respuesta inmune innata. En 1993, fue descrita por Sørensen, sin embargo, la glicoproteína no fue estudiada a profundidad hasta que se aisló de la leche bovina (bLF) (Wang, Timilsena, Blanch, & Adhikari, 2019). A partir de dichos estudios es que conocemos su estructura, función y aplicaciones. Entre sus funciones se encuentra su actividad microbiostática y su actividad microbicida de amplio espectro, también se le conocen propiedades antitumorales, antioxidantes y nutricionales (Dierick, Vanrompay, Devriendt, & Cox, 2021; Rascón-Cruz et al., 2021).

La LF es una glicoproteína monomérica con un peso molecular de 80 kDa, compuesta por una cadena polipeptídica de 703 restos de aminoácidos. Fue descubierta por primera vez hace más de 60 años y nombrada “la proteína roja de la

leche” debido a su característico color rojo intenso por la presencia de iones de Fe^{3+} (Lönnerdal & Iyer, 1995; Nuijens, van Berkel, & Schanbacher, 1996).

La estructura tridimensional de la LF está formada por dos dominios simétricos (lóbulos N y C) o lóbulos conectados entre sí por una región central o bisagra, como lo muestra la Figura 7. Gracias a esta forma, la LF es capaz de unir una molécula de hierro en cada lóbulo o (dos en total) (Wang et al., 2019). Estos lóbulos se subdividen en dominios, N1 y N2 del extremo amino, y C1 y C2 del extremo carboxilo. Existe un sitio fijador de hierro localizado en cada uno de los lóbulos N y son idénticos entre sí. La LF se puede encontrar en 2 isoformas, cuando se encuentra libre de hierro es conocida como apo-lactoferrina, y cuando se encuentra saturada con estos átomos es conocida como Holo-lactoferrina (Fleet, 1995; Soboleva et al., 2019).

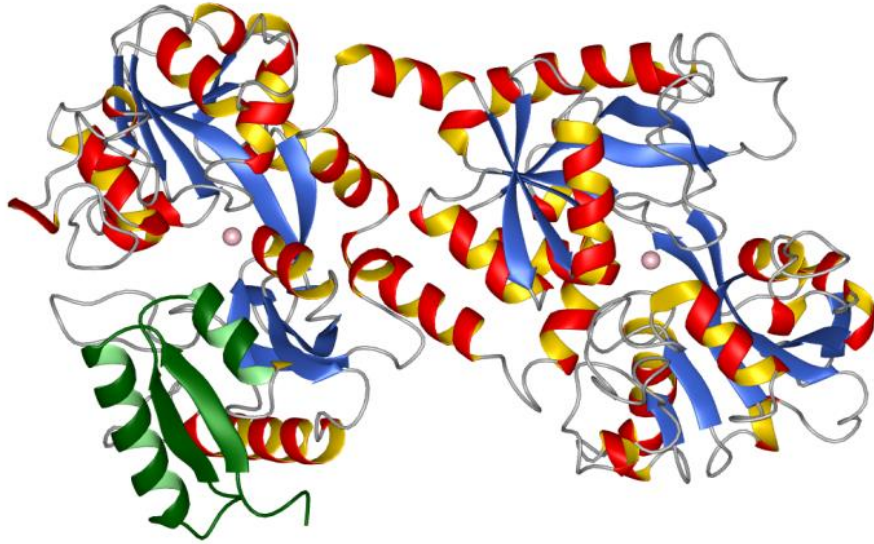


Figura 7 Estructura de La lactoferrina. Tomado de Rodríguez, 2005.

La LF se encuentra principalmente en el calostro y la leche de los mamíferos tales como en bovino, ratón, camello, entre otros, ya que es sintetizada por la glándula mamaria en respuesta de la hormona prolactina. Debido a que la lactoferrina es producida por las células acinares y glándulas secretoras, la podemos encontrar en las secreciones de mucosas, por ello es común encontrarla en secreciones pulmonares, vaginales y fluidos corporales como lágrimas, saliva y otras (Masson, Heremans, & Prignot, 1965). Es importante mencionar que la LF también es secretada por los gránulos secundarios de los neutrófilos, ya que se sintetiza y almacena en los gránulos de estas células durante su transición de promielocito a mielocito. Es por ello que puede variar las concentraciones en plasma de la LF, de manera fisiológica tenemos 0.4-2.0 mg/L de LF en plasma, pero cuando el paciente entra en un proceso infeccioso, los neutrófilos se activan y se desgranulan, secretando LF en su forma libre (apo-lactoferrina) al torrente sanguíneo y alcanza niveles de hasta 200 mg/L (Levay & Viljoen, 1995). La concentración de LF en humano va de mayor a menor, en el calostro de (7-15 mg/ml), leche (1.2 mg/ml), lágrimas (2.2 mg/ml), líquido seminal (0.44-1.92 mg/ml), moco vaginal (62.9-218 µg/mg de proteína), moco bronquial (28.7-41.7 µg/ml) y líquido amniótico (2-32 µg/ml) (Bullen, 1981).

Debido a sus características estructurales, la LF cuenta con una gran cantidad de funciones, por ello es conocida como una proteína multifuncional, entre ellas anti-inflamatoria, inmunomodulador, regulador, regular génico, antitumoral, entre otros. Un ejemplo de su actividad sería el siguiente: en el año 2012, Zheng Y. y colaboradores encontraron que la LF no sólo brinda protección contra el cáncer, sino

que también ayuda a que no se lleve a cabo la metástasis (paso de células tumorales vía sanguínea a otros órganos) (Zheng, Chen, Guo, Ma, & Li, 2010). También se ha demostrado que la LF regula las células del sistema inmune (Sekine et al., 1997). Una de las funciones más recientes que se le ha atribuido a la LF, es su efecto en la pandemia más grande de estos días, en la obesidad, donde juega un papel importante en la activación de lipólisis estimulada por receptores de lipoproteínas (Ahmad et al., 2012).

Pero uno de los efectos más importantes de la LF es el efecto microbicida. Se ha reportado que la LF cuenta un importante efecto fungicida, viricida, parasiticida y bactericida. El más importante es el último mencionado y se ha demostrado contra diferentes patógenos como *E. coli*, *S. aureus* (Flores-Villasenor et al., 2010), *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* (Leon-Sicairos et al., 2009), entre otros. Para llevar a cabo esto, se ha descrito que la LF presenta dos efectos importantes frente las bacterias, uno de ellos es un efecto indirecto o también conocido como bacteriostático, el cual consiste en secuestrar el hierro existente en el medio, para que las bacterias no lo puedan utilizar y así cesar el crecimiento de estas dentro del hospedero (Teraguchi, 1994). El segundo es un efecto directo o bien conocido como bactericida, éste efecto se lleva a cabo debido a la interacción de cargas entre la LF y la membrana bacteriana, ya que la LF es una proteína catiónica que interactúa con componentes de carga negativa de las membrana de las bacterias, en caso de las bacteria Gram negativas con los lipopolisacáridos de la membrana y en las Gram positivas con los ácidos teicoicos, removiéndolos de la membrana y generando la

inestabilidad de esta, y como resultado final, la lisis de las bacterias (Fig. 8) (Arnold, Russell, Champion, Brewer, & Gauthier, 1982).

La LF es una proteína catiónica con carga positiva neta, lo cual le ayuda a interactuar con componentes cargados negativamente que se encuentran en la membrana de las bacterias. Uno de los mecanismos de acción directos de la LF se lleva a cabo una vez que ocurre la interacción de cargas entre la LF y la membrana de la bacteria, dependiendo si es Gram positiva o Gram negativa (Orsi, 2004).

LF también inhibe el crecimiento de bacterias resistentes a los antibióticos. La actividad bacteriostática es indirecta y se da por el secuestro o retención de átomos de hierro (Fe^{3+}) del entorno o nicho biológico. Por lo tanto, se evita el crecimiento y proliferación bacteriana, así como la expresión de factores de virulencia dependientes de Hierro. Por otro lado, la actividad bactericida directa se atribuye a la interacción de LF con la parte exterior de la bacteria la cual contiene una serie de moléculas de carga negativa. Los investigadores constataron en 1988 que la LF daña seriamente la membrana exterior de bacterias Gram negativas. La glicoproteína se une con el lipopolisacárido (LPS), Consecuentemente, ocurre lisis celular (Ellison, 1994).

Diversos estudios evidencian como al dañar la membrana de la bacteria la LF aumenta la efectividad de las sustancias antibióticas naturales como la lisozima, cathelicidinas, entre otros; y a los antibióticos farmacéuticos como la rifampicina. LF además previene la adhesión de las bacterias a las células corporales, ya que actúa como pseudoreceptor del sitio blanco de las bacterias y estas no pueden interaccionar porque el receptor ya está interactuado con LF. Sobre todo, en

infecciones crónicas las bacterias tienen la tendencia de formar una biopelícula (una capa de bacterias organizadas muy adhesiva en la superficie de la mucosa) que dificulta la erradicación comparado con bacterias en crecimiento planctónico (Drago-Serrano, de la Garza-Amaya, Luna, & Campos-Rodríguez, 2012).

En ensayos con animales han comprobado el efecto de la LF en infección estomacal de la bacteria *Helicobacter pylori*, infección sistémica de *S. aureus* e infección de las vías urinarias con *Escherichia coli*. Ensayos con humanos han constatado que la LF inhibe la colonización de la *Helicobacter pylori*; la LF (200 mg. al día) además aumenta la efectividad de la terapia triple (2 antibióticos y un protector estomacal). La terapia triple era eficaz para la erradicación de la *H. pylori* en el 71-77% de los casos. En combinación con la LF la efectividad aumentaba hasta el 100% (Ciccaglione et al., 2019; Conte et al., 2022).

Por otro lado, la LF tiene una potente actividad antiviral, incluidos tanto virus ARN y ADN, patógenos para el ser humano y animales (entre otros virus Hepatitis (tipo B, C y G), rotavirus, virus Herpes (tipo 1 y 2), virus Influenza, HIV, Hantavirus, Poliovirus, Adenovirus, Enterovirus, Metamegalovirus, y virus sinticial respiratorio humano (VRS) (Kell, Heyden, & Pretorius, 2020).

La LF estimula la capacidad del sistema inmunológico para hacer frente a las infecciones y al desarrollo tumoral. Beneficia el sistema inmune a través del crecimiento de las bifidobacterias, de las conocidas como Natural Killer y

favoreciendo la actividad de los neutrófilos. Además de la actividad antimicrobiana, la LF estimula las defensas del huésped. Después de la ingestión de la LF, se inmunomodula tanto la respuesta (*in situ*) intestinal, como (indirecta) la respuesta sistémica (vía migración de células inmunes y las citoquinas vía torrente sanguíneo) (Caccavo et al., 2002).

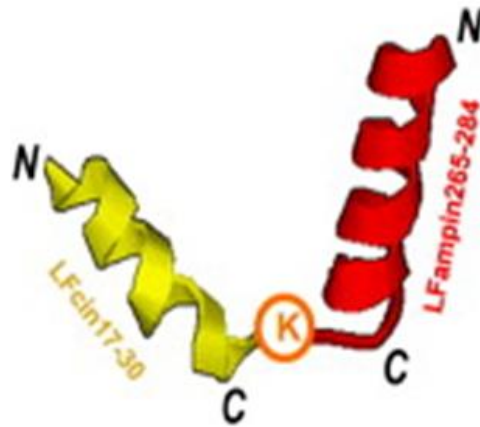
I. LACTOFERRINA QUIMERA

Como toda proteína en la leche, la LF es digerida por la enzima pepsina a través de su paso por el tracto gastrointestinal, y como resultado de ese rompimiento de los enlaces peptídicos se obtienen diferentes péptidos con actividad bactericida, derivados del extremo amino terminal (Tomita et al., 1991). Gracias a este descubrimiento se han sintetizado diferentes péptidos. Uno de los péptidos sintéticos de mayor importancia por su efecto bactericida son la Lactoferricin 17-30 y Lactoferrampina 265-284 (Bolscher et al., 2006; van der Kraan et al., 2004). Tiempo después, el grupo de trabajo del Dr. Bolscher unió estos péptidos de carga positiva, para crear una molécula llamada lactoferrina quimera (Fig. 9), la cual mostró mayor efecto antimicrobiano en comparación con sus péptidos constitutivos (Bolscher et al., 2009).

La LF quimera es un péptido catiónico, con carga neta mayor a sus péptidos de origen. Por este motivo, es más activo e interacciona fuertemente con modelos de membranas de patógenos y células tumorales en las cuales su principal característica es contener cargas negativas, y lo más importante e interesante; en

experimentos cuando se agregaron concentraciones de sal no se perdió su actividad bactericida o fungicida. El efecto de estos péptidos ha sido probado en diferentes bacterias por el grupo de trabajo de la Dra. León-Sicairos, por ejemplo; *E. coli*, *S. aureus* (Flores-Villaseñor H. et al., 2010), *V. parahaemolyticus* (Leon-sicairos N. et al., 2008), entre otros. Se sospecha que el mecanismo de acción es similar al de la proteína nativa y que la LF quimera es el péptido que presenta mayor poder bactericida, debido a su poderosa carga positiva, la gran afinidad a las membranas de las bacterias y por su conformación tridimensional, semejante a la LF nativa. Estas propiedades la hacen altamente efectiva, inclusive es mejor microbicida que la LF nativa.

Existen diferentes LF quimeras dependiendo la secuencia de los péptidos que la compongan. Sin embargo, la secuencia con la que se trabajó en este proyecto ha demostrado tener actividad bactericida en contra múltiples bacterias Gram positivas como Gram negativas (Acosta-Smith et al., 2017; Flores-Villaseñor et al., 2012; Leon-Sicairos et al., 2014; Leon-Sicairos et al., 2009)



LF quimera

Figura 9. Estructura tridimensional de la Lactoferrina quimera.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

S. aureus es un colonizador asintomático del 30% de todos los seres humanos, sin embargo, en las condiciones adecuadas puede volverse patógeno. La resistencia a los antibióticos contribuye al éxito de *S. aureus*. MRSA en particular ha surgido como una causa generalizada de infecciones adquiridas tanto en el hospital como en la comunidad. Actualmente, MRSA es responsable de 10 veces más infecciones que todos los patógenos Gram negativos multi-resistentes (MDR) combinados. En consecuencia, MRSA fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los doce patógenos prioritarios que amenazan la salud humana. Además de los mecanismos de resistencia tradicionales, una característica especial de la patogénesis de *S. aureus* es su capacidad para sobrevivir tanto en superficies bióticas como abióticas en estado de biopelícula, lo que complica su eliminación. En general, estas infecciones afectan a huéspedes inmunocompetentes y su gravedad varía desde las cutáneas superficiales y los abscesos de tejidos blandos hasta la enfermedad invasiva, incluida neumonía necrosante, piomiositis, osteomielitis, sepsis grave y la muerte. Todo esto ha repercutido en un aumento en los costos por atención, pero sobre todo costos en vidas humanas. Por lo tanto, se justifica la investigación para hacer frente a infecciones debidas a MRSA, razón por la cual este protocolo de investigación trata sobre el estudio de la posible actividad bactericida y antibiofilms de LF y LFquimera en cepas de referencia y aislados clínicos MR de *S. aureus* tanto en cultivos plantónicos como en biofilms.

IV. JUSTIFICACIÓN

S. aureus es un organismo adaptable con la capacidad de desarrollar resistencia a una variedad de antibióticos. La terapia de las infecciones estafilocócicas enfrenta muchas dificultades, no solo por la resistencia de la bacteria a los antibióticos y la multiplicidad de factores de virulencia que produce, sino también por su capacidad para formar biopelículas. Razón por la cual, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para un tratamiento eficaz, como lo son el uso de anticuerpos y algunas proteínas con propiedades bactericidas, tal es el caso de lactoferrina y el péptido LF quimera. En esta investigación nos enfocaremos en evidenciar las alternativas viables para combatir efectivamente a *S. aureus*. Una de las más relevantes y exploradas es LF y su péptido sintético LF quimera que se ha demostrado que ambos tienen actividad antimicrobiana en contra de diversas bacterias. Se propone estudiar a LF y LF quimera ya que se ha demostrado que estas moléculas presentan actividad microbioestática y microbicida en contra de múltiples patógenos. Adicionalmente, se ha demostrado que tienen la capacidad de inhibir la formación de biofilms o bien disgregar los ya formados y bLF tiene capacidad de actuar y potenciar su actividad en presencia de otros antibióticos. Por lo anteriormente mencionado, en caso de que LF y el péptido tengan propiedades microbicidas en *S. aureus* se podrá contar con nuevos compuestos con potencial para el tratamiento o prevención de infecciones por esta bacteria, incluso aun en aquellas que resistentes a metilcilina o a las que tienen la capacidad de formar biopelículas.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad microbicida de Lactoferrina bovina y el péptido Lactoferrina quimera en bacterias planctónicas y biofilms de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC y un aislado clínico resistente a antibióticos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de la Lactoferrina bovina y Lactoferrina quimera sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina en estado planctónico.
2. Determinar si el efecto de la Lactoferrina bovina y el péptido LF quimera es bactericida o bacteriostático en *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina en estado planctónico.
3. Evaluar la actividad anti-biofilm de la Lactoferrina bovina y el péptido LF quimera sobre biofilms de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y MRSA.
4. Determinar si existe efecto sinérgico entre Lactoferrina bovina y el antibiótico ampicilina sobre biofilms MRSA.

VI. HIPÓTESIS

Lactoferrina bovina y el péptido Lactoferrina quimera tienen efecto microbicida en bacterias planctónicas y biofilms de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y un aislado clínico resistente a antibióticos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA

La proteína lactoferrina de origen bovino (bLF) que se utilizó tiene una saturación de hierro aproximadamente de 20%, se adquirió de Abial Biotech (España). La contaminación por lipopolisacárido y la concentración de hierro se evaluaron antes de ser utilizados. LF quimera se obtuvo mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando química Fmoc, como se describió anteriormente (Acosta-Smith et al., 2017; Flores-Villaseñor et al., 2012; Leon-Sicairos et al., 2014; Leon-Sicairos et al., 2009).

B. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *S. aureus* utilizadas en este proyecto fueron la cepa ATCC 25923 y una cepa de origen clínico resistente a metilicina (MRSA). La primera fue obtenida del cepario del CIASaP de la Universidad Autónoma de Sinaloa y la segunda de ellas fue donada amablemente por el Dr. Eduardo Llausás Magaña del Hospital Pediátrico de Sinaloa.

C. OBTENCIÓN DEL INOCULO

Las cepas de *S. aureus* ATCC como MRSA se inocularon en una placa de medio de cultivo agar Luria Bertani (LB) sin hierro (el hierro fue removido mediante resina chelex-100 Biorad) durante toda la noche a 37 °C. Una vez obtenido el crecimiento de las cepas, se inocularon en un medio LB líquido sin hierro hasta obtener una densidad óptica de 0.01 a longitud de onda de 630 nm y se incubaron durante 12h a 37 °C. Se tomaron lecturas cada 30 min para establecer la fase de crecimiento

logarítmico de las bacterias. Obtenida la fase logarítmica de las bacterias se hicieron diluciones seriadas y conteo en placa para conocer la densidad bacteriana. Finalmente, las bacterias en su fase logarítmica se almacenaron a -80°C en medio de cultivo adicionado con glicerol, para posteriormente ser usadas en diferentes experimentos.

D. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE *S. aureus* ATCC 25923 Y MRSA EN PRESENCIA DE BLF Y LF QUIMERA

La actividad antimicrobiana de bLF y LF quimera sobre cepas de *S. aureus* ATCC y MRSA se determinó mediante cinéticas de crecimiento. Primeramente, se tomaron bacterias previamente congeladas y se llevaron a 1×10^4 UFC/ml, después se incubaron en una microplaca de 96 pozos (Corning, Nueva York, Estados Unidos) conteniendo medio LB sin hierro con los tratamientos a concentraciones de 500 μ M de bLF y 20 μ M LF quimera. Como controles, se usaron bacterias en LB sin tratamiento como control de crecimiento y como control de inhibición de crecimiento se utilizó vancomicina a 49 μ g/mL, los cultivos se incubaron a 37 °C durante, durante diferentes tiempos (2, 4 y 5 h) para evaluar la actividad antimicrobiana de los tratamientos.

Para evaluar la viabilidad de las bacterias previamente tratadas se utilizó el método de conteo bacteriano, en la presente técnica se tomaron 100 μ l de los cultivos y se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS 1x) una vez realizadas las diluciones se procedió a extender en placas de

medio LB sin hierro, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó conteo de las colonias y los resultados se expresaron en UFC/ml.

E. ENSAYO DE UNIÓN DE LA MEMBRANA DE *S. aureus* RESISTENTE A METILCILINA POR LA BLF Y LFQ

La interacción de la bLF y LF quimera fue analizada con las técnicas de microscopia confocal. Para ello, *S. aureus* resistente a metilcilina a la densidad de 1×10^4 UFC/ml, se incubó durante toda la noche a 37°C en medio LB. Después de esto, las bacterias se lavaron con PBS por centrifugación a 2500 rpm/ 5 min, se retiró el sobrenadante y se agregó p-formaldehído al 4% para fijar las bacterias. Posteriormente, se lavó 4 veces con PBS e inmediatamente las bacterias se trataron con lo siguiente: LF quimera (acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y a concentración de 2 μ M), y con LF a una concentración de 5 μ M, se dejó incubar durante 30 min a 37°C en agitación suave. Una vez cumplido el tiempo, las muestras se lavaron durante 4 veces con PBS y centrifugación suave. En el caso de las muestras acopladas a fluorescencia, las muestras se procesaron para ser analizadas por microscopia confocal, mientras que las bacterias incubadas con LF se sometieron a otros pasos, se incubaron durante 5 min con Tritón X-100 al 0.05%, se lavaron nuevamente, después se añadió un anticuerpo anti-lactoferrina hecho en conejo (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), en una concentración de 1:100, las bacterias se dejaron durante 1 h a 37°C y posteriormente se lavaron de nuevo y se agregó un anticuerpo secundario anti-conejo hecho en ratón y acoplado a FITC, se dejó incubar en las condiciones antes mencionadas. Finalmente, las

muestras se lavaron, se procesaron para ser analizadas mediante microscopía confocal. Las muestras ya procesadas se enviaron al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) para que sean visualizadas en el microscopio confocal.

F. ENSAYO PARA IDENTIFICAR CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA MEMBRABA DE *S. aureus* RESISTENTE A METILCILINA POR BLF Y LF QUIMERA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Para poder visualizar el efecto de LF y LF quimera a nivel celular, se diseñó un experimento por microscopia electrónica, para el cual se utilizaron una gran cantidad de bacterias en su fase logarítmica y se pusieron en contacto con los tratamientos: bLF y LF quimera (20 μ M) y SDS al 5%, se incubó por 5 horas a 37°C en LB sin hierro, posterior se lavó 4 veces con PBS filtrado con membrana al 0.22 y se centrifugo después de cada lavado, posteriormente se fijaron las bacterias con glutaraldehído al 0.5% en agitación suave por 1 hora a 37°C, después las bacterias se lavaron 4 veces con PBS filtrado y se prepararon las muestras con dos lavados más de PBS para ser analizadas por el microscopio electrónico.

G. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD *S. aureus* RESISTENTE A METILCILINA TRATADAS CON BLF Y LF QUIMERA USANDO EL CRITERIO DE INCLUSIÓN DE IODURO DE PROPIDIO.

Para llevar a cabo este ensayo, se obtuvieron bacterias ya tratadas de los ensayos de inhibición de 5 h con bLF y LF quimera (20 μ M), tritón como control de permeabilidad y bacterias sin tratamientos como control negativo. Las bacterias se

centrifugaron y se desechó el sobrenadante, posteriormente se lavaron 4 veces con PBS filtrado con membrana 0.22 y se centrifugó después de cada lavado, después se incubó con Ioduro de propidio en una concentración de 10 µg/ml, durante 10 minutos en a 4°C, una vez cumplido el tiempo se lavó 4 veces con PBS filtrado, se fijó con p-formaldehído al 4% durante 1 h a 37°C y al final se lavó nuevamente con PBS filtrado y las preparaciones se procesaron para ser analizadas por microscopía de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania).

H. ESTANDARIZACIÓN DE BIOFILMS DE *S. aureus* ATCC 25923 Y MRSA

La estandarización de la formación de biofilms de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA se llevó a cabo en placas de cultivo de 24 pozos (Corning). Las bacterias previamente congeladas se inocularon en medio LB caldo sin hierro durante 24 h a 37 °C para la formación de los biofilms. Finalmente, para cuantificar la biomasa del biofilm, estos se lavarán con PBS suavemente sin tocar el fondo de los pozos, después los biofilms se sometieron a sonicación por 15 segundos (Branson, Texas, Estados Unidos), posteriormente se realizaron 20 exhaustivos lavados con PBS, luego se realizaron diluciones seriadas, las cuales se sembraron en LB agar, incubándose durante 24 h a 37 °C. Los resultados se expresaron como UFC/mL.

I. EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA Y LACTOFERRINA QUIMERA EN BIOFILMS DE *S. aureus* ATCC 25923 Y MRSA

Para determinar el efecto de bLF y LFquimera en los biofilms de *S. aureus* ATCC y MRSA, se formaron biofilms durante 24 h como se mencionó previamente, luego se realizará un lavado con PBS 1X para remover las bacterias no adheridas, y posteriormente se añadió medio líquido LB sin hierro junto con los siguientes tratamientos: 500 μ M de bLF y 20 μ M LF quimera. Biofilms de bacterias en medio LB sin tratamiento se tomaron como control de crecimiento y biofilms tratados con vancomicina 49/mL se tomarán como control de destrucción de biofilms. Los biofilms junto con los tratamientos se incubaron a 37°C durante 5h. La cuantificación de la biomasa se realizó como se mencionó previamente.

J. ESTABLECIMIENTO DEL SINERGISMO ENTRE BLF Y AMPICILINA EN CEPAS DE *S. aureus* RESISTENTE A METILCILINA.

Para determinar si bLF presentan efecto sinérgico con ampicilina, se realizó un ensayo sobre biofilms de MRSA. Para esto, se utilizarán cultivos bacterianos previamente congelados y se formarán los biofilms durante 24 h a 37 °C. Una vez establecido el biofilm maduro, se realizó un lavado con PBS para eliminar bacterias planctónicas. Posteriormente, se adicionó medio LB caldo sin hierro y se utilizaron los siguientes tratamientos: ampicilina (16, 32, 64 y 128 μ g/mL) en combinación con 50, 100, 150 y 200 μ M de bLF. Como control de crecimiento se utilizaron biofilms sin tratamientos y ciprofloxacino 32 μ g/mL, así como SDS al 5% como controles de destrucción de biofilms. Los biofilms junto con los tratamientos se incubaron durante

5 h a 37 °C. Pasando el tiempo, los biofilms se cuantificaron como se mencionó previamente.

Para determinar el efecto sinérgico entre tratamientos, se utilizó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI, por sus siglas en inglés, Fractional Inhibitory Concentration Index).

El cual dicta la siguiente fórmula: $FICI = \frac{(CMI \text{ de fármaco A en combinación})}{(CMI \text{ fármaco A solo}) + (CMI \text{ de fármaco B en combinación})} / \frac{(CMI \text{ fármaco B solo})}{(CMI \text{ fármaco B solo})}$.
Donde, CMI es concentración mínima inhibitoria.

Si el FICI es <0.5 el efecto es sinergismo, si es >0.5 pero <1 es sinergismo parcial, si es 1, el efecto es aditivo, >1 pero <4 el efecto es indiferente y >4 , antagonismo (Han et al., 2016).

K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los experimentos presentados en este trabajo se realizaron y se representaron en gráficas como la media y desviación estándar de una serie de dos experimentos utilizando el software SigmaPlot versión 9.0. Para evaluar la significancia estadística de los resultados se aplicaron la prueba ANOVA y T-student, tomando en cuenta como estadísticamente significativos aquellos con un valor de $P < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

A. LACTOFERRINA BOVINA INHIBE LA VIABILIDAD DE CULTIVOS PLANCTÓNICOS DE *S. aureus* ATCC 25923 Y MRSA

En primer lugar, se estableció la actividad antimicrobiana de bLF y LF quimera en cultivos planctónicos de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25023 y un aislado clínico MRSA. En los experimentos, se utilizaron cultivos de *S. aureus* (1×10^4 UFC/ml), los cuales se incubaron junto con bLF (500 μ M) y LF quimera (20 μ M). El antibiótico vancomicina (49 μ g/ml) se utilizó como control negativo de crecimiento, y las cepas de *S. aureus* en medio de cultivo se utilizaron como control positivo de crecimiento. Los cultivos con o sin tratamientos se incubaron por 2, 4 y 5 h a 37 °C en las condiciones y concentraciones antes mencionadas.

El mejor resultado se aprecia en cultivos bacterianos planctónicos tratados con bLF a las 4 y 5 h, ya que la viabilidad de los cultivos disminuyó hasta aproximadamente 20%, en comparación con la inhibición presentada a las 2 h, que fue de 55%, aproximadamente (Figura 10). Por otro lado, en los cultivos tratados con LF quimera la viabilidad disminuyó hasta 52% pero solo en el tratamiento durante 2 h y a una concentración de 20 μ M. Estos datos nos permiten concluir que bLF a 500 μ M y durante 4 h de tratamiento presenta su mayor actividad en cultivos plantónicos de *S. aureus* ATCC 25023. Los cultivos sin tratar, como era de esperarse presentaron una viabilidad de aproximadamente 100% mientras que los controles tratados con vancomicina presentaron una viabilidad cercana al 0 %. Estos resultados fueron estadísticamente significativos.

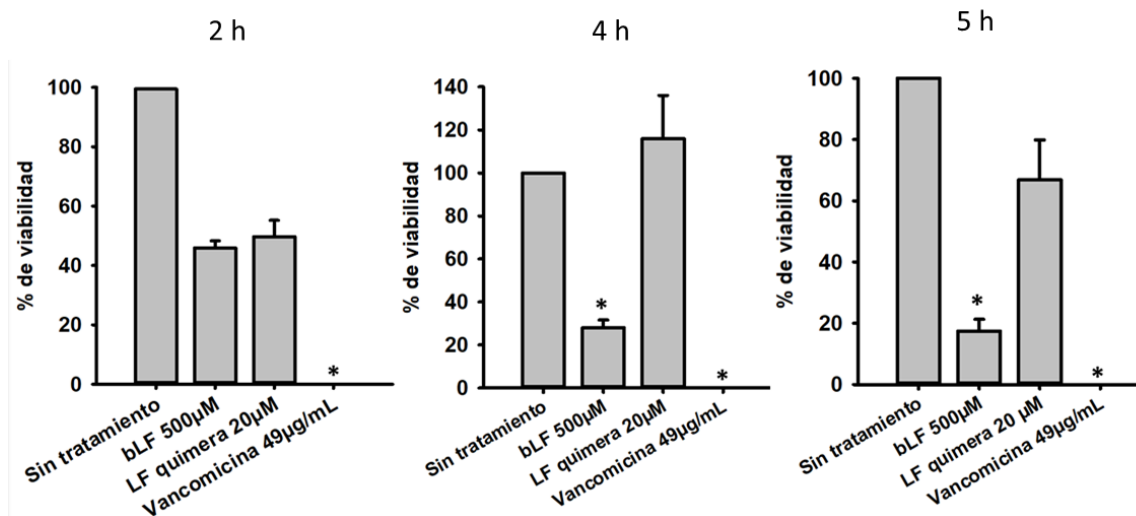


Figura 10. Lactoferrina bovina (bLF) inhibe el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923. Cultivos de *S. aureus* (1×10^4 UFC/ml) se incubaron con bLF (500 μ M) y LF quimera (20 μ M). Como control negativo de crecimiento de utilizaron cultivos tratados con el antibiótico vancomicina (49 μ g/ml), y como control positivo de crecimiento se utilizaron cultivos sin tratamiento. Los cultivos se incubaron durante 2, 4 y 5 h a 37 °C en medio LB sin hierro. Pasado este tiempo, las muestras se procesaron, se realizaron diluciones seriadas y extensión en placa para determinar la viabilidad en cada uno de los tratamientos. En las imágenes se muestra la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se aplicó la prueba estadística ANOVA para el cálculo de la significancia estadística (* indica diferencia estadística vs sin tratamiento) ($p < 0.05$).

En la cepa resistente a metilcilina (MRSA) (Figura 11), en los resultados se puede observar que al igual que la cepa de referencia ATCC, la cepa MRSA también sucumbió al tratamiento con bLF y el péptido LF quimera, ya que los cultivos tratados en las mismas condiciones y concentraciones también perdieron su viabilidad hasta llegar a un 30-35%, comparado con el 100% de viabilidad de cultivo sin tratar y con el 0% de los cultivos tratados con vancomicina.

Estos datos nos indican que tanto bLF como el péptido LF quimera tiene actividad bactericida en cultivos planctónicos de la cepa ATCC 25026 y MRSA.

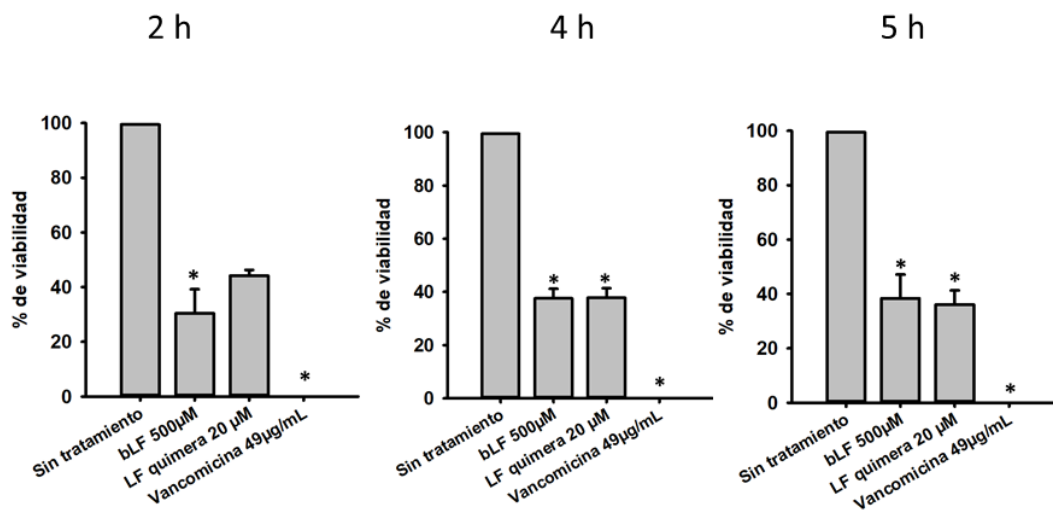


Figura 11. Lactoferrina bovina (bLF) inhibe el crecimiento de *S. aureus* resistente Metilcilina (MRSA). Cultivos de MRSA (1×10^4 UFC/ml) se incubaron con bLF (500 μ M) y LF quimera (20 μ M). Como control negativo de crecimiento se utilizaron cultivos tratados con el antibiótico vancomicina (49 μ g/ml), y como control positivo de crecimiento se utilizaron cultivos sin tratamiento en medio de cultivo sin hierro. Los cultivos se incubaron durante 2, 4 y 5 h a 37 °C en medio LB sin hierro. Pasado este tiempo, las muestras se procesaron y se realizaron diluciones seriadas y extensión en placa para determinar la viabilidad en cada uno de los tratamientos. En las imágenes se muestra la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se aplicó la prueba estadística ANOVA para el cálculo de la significancia estadística (* indica diferencia estadística vs sin tratamiento) ($p < 0.05$).

B. LF Y LF QUIMERA DAÑAN CEPAS DE *S. aureus*

Previamente, se han documentado las bases para explicar los mecanismos bactericidas de LF y el péptido LF quimera. El mecanismo de actividad bactericida directo sobre la membrana ocurre con la unión de proteínas y péptidos cargados positivamente a los componentes negativos de la membrana de patógenos, mediante la interacción con las cargas negativa y positivas se ha documentado que existe la posterior liberación de componentes estructurales de membrana, pérdida de la permeabilidad selectiva de las células, entrada de agua y lisis. Para comprobar este mecanismo de acción en *S. aureus*, se realizaron una serie de ensayos con bLF y LF quimera en cultivos plantónicos de *S. aureus*.

Primeramente, para comprobar la interacción de bLF o LF quimera con las membranas celulares de MRSA, se realizaron ensayos de microscopia confocal. En los paneles A de la Figura 12 se pueden observar resultados de microscopia confocal utilizada para verificar la interacción de lactoferrina (bLF) y el péptido Lactoferrina quimera (LF quimera) con MRSA, ya que después de un tiempo de incubación de puede ver la marca del colorante FITC (Verde) sobre las bacterias, en contraste con baterías no tratadas, las cuales solo emiten su fluorescencia basal y sólo se observa un recuadro negro sin florescencia. Esto indica que la LF y el péptido LF quimera interaccionan con la bacteria.

En la Figura 12 paneles B, se observan los recuadros de los resultados obtenidos con las bacterias tratadas con bLF y el péptido LF quimera a las concentraciones a las cuales fueron bactericidas (Figura 10 y 11). En los resultados,

podemos observar que las bacterias tratadas con bLF y LF quimera presentan severos daños a nivel ultraestructural con respecto a bacterias sin tratar y a bacterias tratadas con el detergente SDS. Las bacterias sin tratar son cocos Gram positivos agrupados de dos, divididos por un septo, el cual se aprecia en las bacterias sin tratar. Las bacterias tratadas con el colorante SDS se observa cómo han perdido su forma tipo coco, parte de la tinción, el septo en la mayoría de los casos, y se ven las células con aspecto mucoso, al igual que las células tratadas con bLF y el péptido LF quimera. Estos resultados nos indican que bLF y LF quimera causan daños en MRSA.

Finalmente, la inclusión del colorante yoduro de propidio en los paneles C se observa solamente en el último recuadro que fue el cultivo tratado con el detergente tritón, que permeabiliza membranas biológicas dejando pasar el colorante. Además, se observa claramente que en los cultivos tratados con bLF y LF quimera hubo inclusión del colorante yoduro de propidio (color rojo), lo que indica que efectivamente las células son permeabilizadas después de incubarse con estos, en contraste con las bacterias no tratadas que solo exhiben su fluorescencia basal la cual es indetectable. En conjunto, los datos nos indican que la bLF y el péptido LF quimera interactúan con *S. aureus*, y que esta interacción termina en un efecto bactericida, porque se observó unión a las células, daños a nivel ultraestructural y pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas de MRSA, Figura 12.

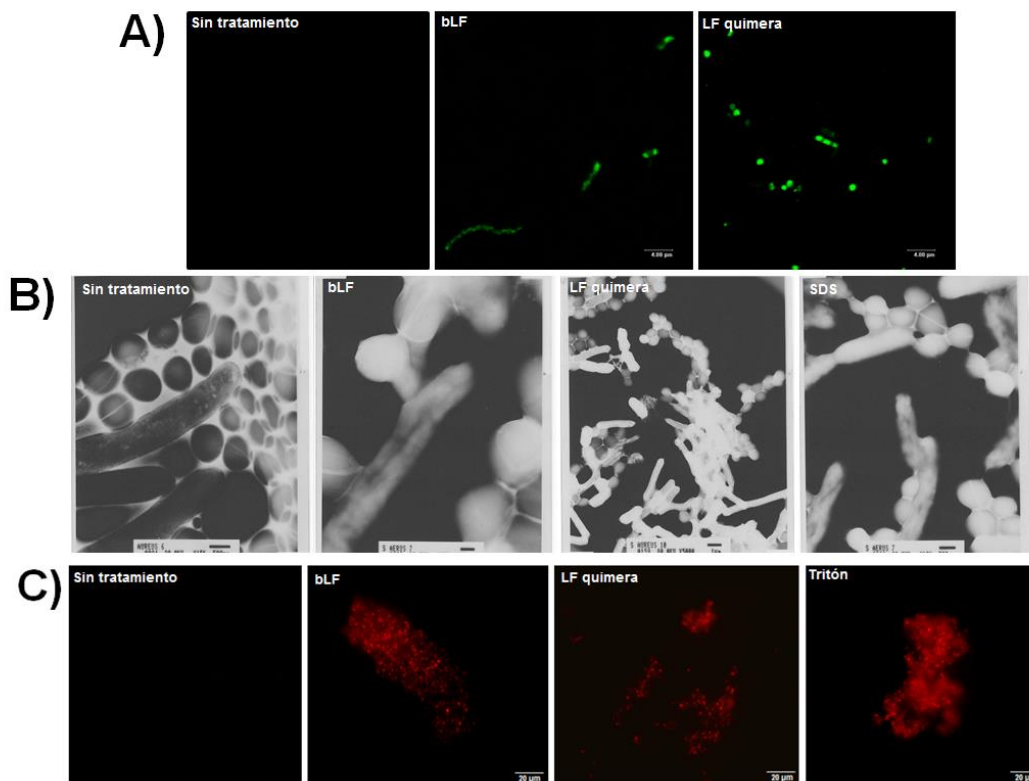


Figura 12. bLF y LF quimera presentan actividad bactericida sobre MRSA. A) Ensayo de microscopía confocal, unión o interacción de 2 μM de bLF y LF quimera acoplados a FITC (color verde) a las bacterias MRSA. B) Ensayo de microscopía electrónica, en dichos ensayos se observan los cambios morfológicos ocasionados en MRSA por el tratamiento con 20 μM de bLF y LF quimera, como control de daño morfológico se utilizó SDS (detergente que solubiliza membranas) y como control de forma, tamaño e integridad celular se utilizaron MRSA sin tratamiento. C) Ensayos de microscopia de fluorescencia para determinar la inclusión de yoduro de propidio (rojo) en células permeabilizadas. 20 μM de bLF y LF quimera se incubaron con MRSA durante 2 h a 37°C. La inclusión de yoduro de propidio (bacterias en color rojo) muestra que las membranas de MRSA se permeabilizaron por el tratamiento con bLF y LF quimera, lo cual permite la inclusión del colorante (color rojo), y en consecuencia, provoca la lisis de la bacteria. Como control de solubilización de componentes membranales se utilizó el detergente tritón, y como control de integridad de membrana cultivos de MRSA sin tratamientos. Los experimentos se realizaron por duplicado y las imágenes son representativas de todos los campos analizados. El tamaño de la barra se representa en las series de imágenes.

C. LACTOFERRINA BOVINA Y EL PÉPTIDO LACTOFERRINA QUIMERA DISGREGAN BIOFILMS DE *S. aureus*

Una vez demostrado que bLF y el péptido LF quimera presentan actividad en ensayos planctónicos de *S. aureus* cepa de referencia y resistente a metilcilina, el siguiente paso era investigar si tenían efecto en biofilms de ellas.

En los resultados de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 13), se puede observar que en biofilms formados durante 12 o 24 h e incubados con los tratamientos durante 5 h, la capacidad de disgregar los biofilms en más del 75% en biofilms de 12h ($p: <0.05$) y más del 85% en biofilms de 24 h tratados por bLF en comparación a aquellos sin tratamiento ($p: <0.05$). En lo que respecta a LF quimera, disgregó cerca del 30% de los biofilms de *S. aureus* ATCC 25923 formados durante 12h y el 50% de aquellos formados durante 24 h en comparación a los biofilms no tratados (Figura 13).

Por otro lado, los mismos tratamientos y a las mismas concentraciones de bLF y LF quimera y vancomicina, no tuvieron actividad estadísticamente significativa en los biofilms establecidos durante 12 h de la cepa MRSA (Figura 14). En los biofilms formados durante 24, a pesar de que bLF disgregó cerca 60% de los biofilms, tampoco se tuvo significancia estadística en los datos de bLF y LF quimera. Por su parte, vancomicina disgregó más del 80% de los biofilms en comparación a los no tratados (Figura 14).

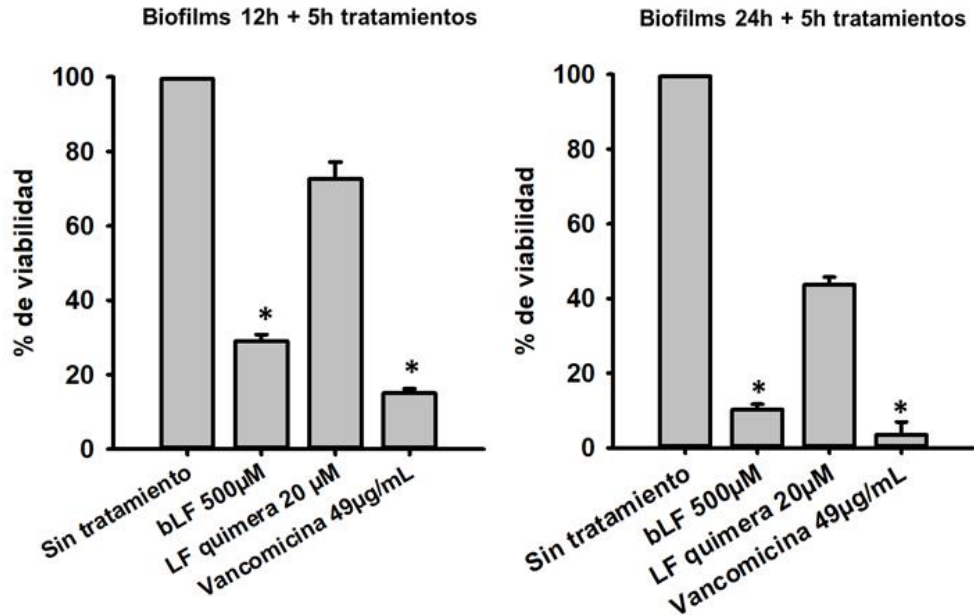


Figura 13. bLF disgrega biofilms formados por *S. aureus* ATCC 25923. Cultivos de *S. aureus* (1×10^4 UFC/ml) se incubaron durante 12 y 24 h para la permitir formación de biofilms. Posteriormente, los cultivos se incubaron con los siguientes tratamientos: bLF (500 µM) y LF quimera (20 µM). Como control de inhibición de biofilms se utilizó vancomicina (49 µg/ml) y como control positivo de formación de biofilms se tomaron en cuenta cultivos sin tratamientos. Las muestras se incubaron durante 5 h a 37 °C en medio LB sin hierro. Finalmente, las muestras se sonicaron y se realizaron diluciones seriadas y extensión en placa para determinar los resultados. En las gráficas, se muestra la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se aplicó la prueba estadística ANOVA para el cálculo de la significancia estadística (* = diferencia estadística vs sin tratamiento) ($p < 0.05$).

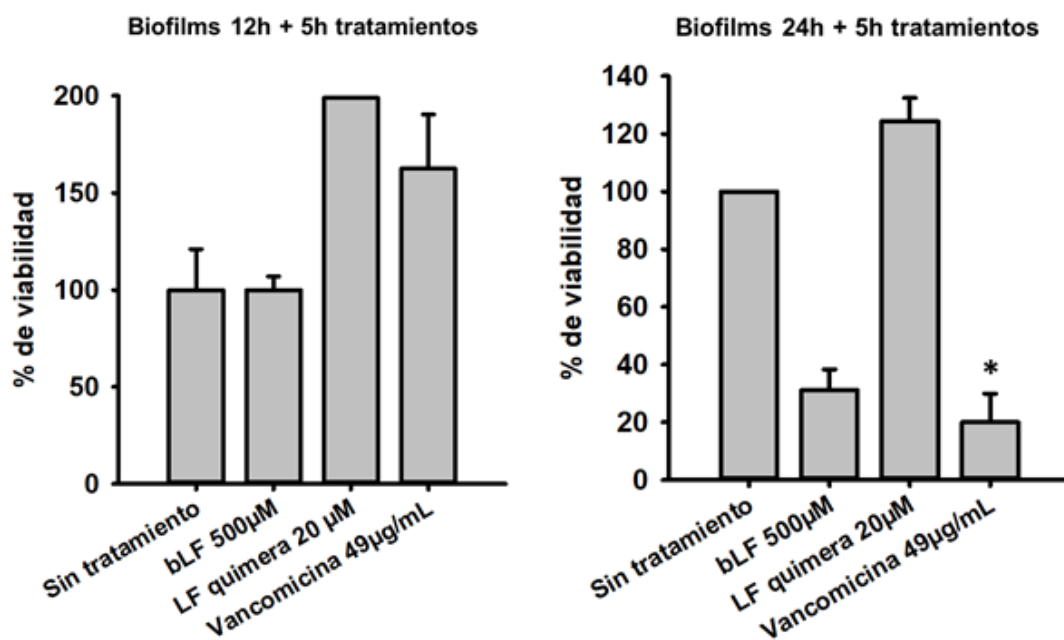


Figura 14. Lactoferrina bovina no disgrega biofilms formados por MRSA. Cultivos de MRSA (1×10^4 UFC/ml) se incubaron durante 12 y 24 h para la formación de biofilms. Posteriormente, se agregaron los siguientes tratamientos: bLF (500 µM) y LF quimera (20 µM), como control negativo de biofilms de utilizó vancomicina (49 µg/ml) y cultivos sin tratamientos como control positivo de biofilms. Los cultivos se incubaron durante 5h a 37 °C en medio LB sin hierro. Sonicación, diluciones seriadas y extensión en placa se realizaron para determinar los resultados. Se muestra la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se aplicó la prueba estadística ANOVA para el cálculo de la significancia estadística (* = diferencia estadística vs sin tratamiento) ($p < 0.05$).

D. LACTOFERRINA BOVINA PRESENTA SINERGISMO PARCIAL CON EL ANTIBIÓTICO AMPICILINA EN BIOFILMS FORMADOS POR MRSA

Una vez demostrada la actividad bactericida y anti-biofilms de la bLF sobre las dos cepas de *S. aureus* (ATCC y MRSA), el siguiente paso fue determinar su actividad sinérgica en la cepa MRSA. Como se mencionó anteriormente, el sinergismo es el efecto potenciado de dos moléculas combinadas sobre un blanco, el cual se determina por la FICI. En este caso se probó bLF y el antibiótico ampicilina al cual MRSA es resistente. Los tratamientos fueron probados en biofilms de MRSA formados durante 24h tratados durante 5h. Se probaron 4 concentraciones de bLF menores de la que presentó actividad anti-biofilms (50, 100, 150 y 200 μM) junto con 4 concentraciones de ampicilina (16, 32, 64 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los resultados del experimento de sinergismo entre bLF y ampicilina se muestran en la Figura 15. Como se puede observar, los biofilms de MRSA son resistentes a todas las concentraciones de ampicilina. Por otro lado, la combinación de bLF 50 μM con casi todas las concentraciones de ampicilina disgregó más del 90% de los biofilms ($p < 0.05$), excepto con 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. bLF 100 μM solamente en combinación con ampicilina 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó actividad anti-biofilm disgregando más del 80% de estos ($p < 0.05$). bLF 150 μM disgregó más del 80% de los biofilms de MRSA en combinación con 32, 64 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, respectivamente ($p < 0.05$). Finalmente, bLF 200 μM disgregó más del 90% los biofilms de MRSA en combinación con todas las concentraciones de ampicilina ($p < 0.05$). Por parte de ciprofloxacino y SDS 5%, disgregaron más del 98% de los biofilms de MRSA, como

lo muestra la Figura 15. Todos los tratamientos fueron comparados con los biofilms sin tratamiento.

Posteriormente de determinar la actividad anti-biofilms de la bLF y ampicilina combinados en MRSA, se aplicó la fórmula de la FICI de Han y cols., en todas las combinaciones de las concentraciones de bLF y ampicilina (Cuadro 2). De todas las combinaciones probadas, seis de ellas presentaron sinergismo parcial, el resto efecto indiferente. Las combinaciones con sinergismo parcial fueron: bLF 50 μ M + 16 (FICI: 0.66), 32 (FICI: 0.69) y 128 μ g/mL ampicilina (FICI: 0.84), respectivamente, bLF 100 μ M + 64 μ g/mL ampicilina (FICI: 0.56) y bLF 150 μ M + 32 (FICI: 0.94) y 64 μ g/mL ampicilina (FICI: 0.84), respectivamente, Cuadro 2.

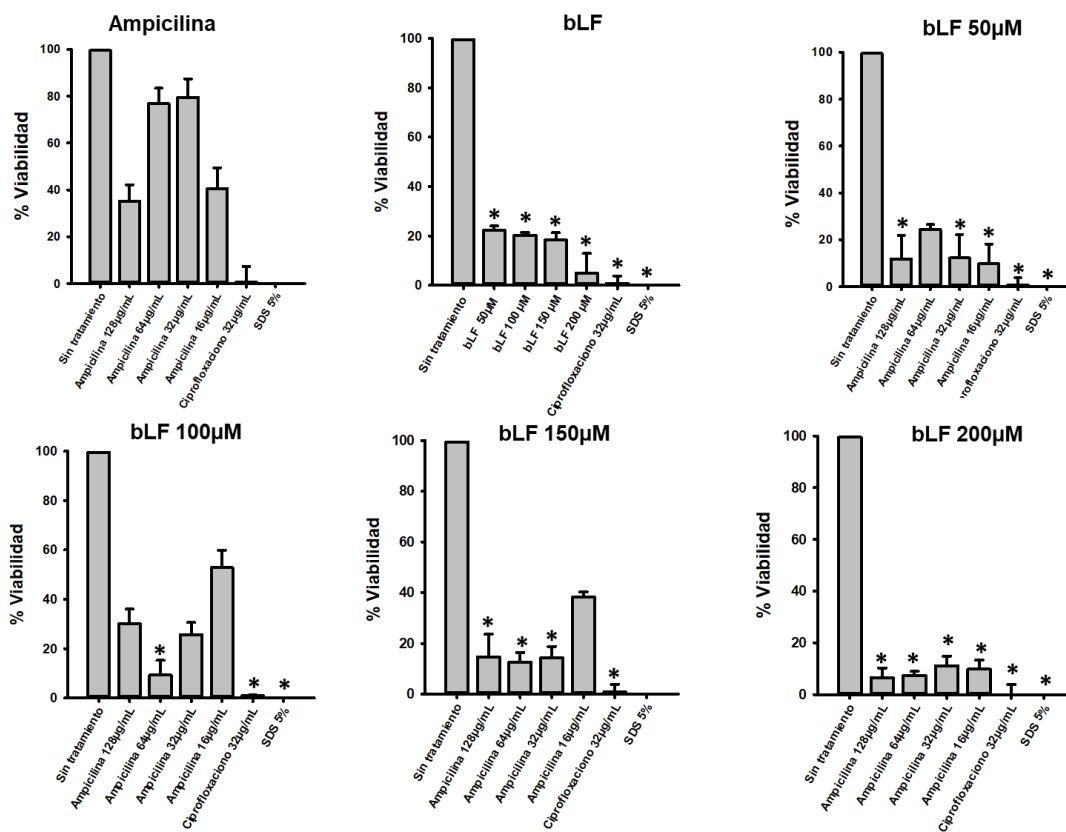


Figura 15. bLF presenta sinergismo parcial con biofilms formados por MRSA. Cultivos de *S. aureus* (1×10^4 UFC/ml) se incubaron durante 24h para la formación de biofilms, posteriormente se agregaron de manera conjunta bLF (50, 100 y 150 μ M) y ampicilina (16, 32, 64 y 128 μ g/ml), como control negativo se utilizó ciprofloxacino (32 μ g/ml) y SDS al 5%, cultivos sin tratamientos como control positivo durante 5h a 37°C en medio LB sin hierro. Sonicación, diluciones seriadas y extensión en placa se realizaron para determinar los resultados. Se muestra la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se aplicó la prueba estadística ANOVA para el cálculo de la significancia estadística (* = diferencia estadística vs sin tratamiento) ($p < 0.05$).

Cuadro 2. Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de la bLF en combinación con ampicilina en biofilms de *S. aureus*.

Concentraciones ampicilina (µg/mL)	Concentraciones bLF (µM)							
	50		100		150		200	
	FICI	Interpretación	FICI	Interpretación	FICI	Interpretación	FICI	Interpretación
16	0.66	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	3.81	Efecto indiferente	2.95	Efecto indiferente	2.45	Efecto indiferente
32	0.69	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	1.54	Efecto indiferente	0.94	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	2.52	Efecto indiferente
64	1.39	Efecto indiferente	0.56	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	0.84	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	1.67	Efecto indiferente
128	0.84	<u><i>Sinergismo parcial</i></u>	2.27	Efecto indiferente	1.18	Efecto indiferente	1.66	Efecto indiferente

FICI: <0.5 el efecto es sinergismo, si es >0.5 pero <1 es sinergismo parcial, si es 1, el efecto es aditivo, >1 pero <4 el efecto es indiferente y >4, antagonismo. Palabras subrayadas y cursivas indican sinergismo parcial.

IX. DISCUSIÓN

La humanidad durante siglos se ha enfrentado a múltiples tipos de enfermedades, de las más importantes son las enfermedades infecciosas, un claro ejemplo es la pandemia que nos aqueja actualmente por el virus SARS-CoV-2 responsable de la COVID-19 (Fernandes et al., 2022). Sin embargo, a través de los años los seres humanos han enfrentado diversas batallas contra patógenos, que hoy en día se han cataloga como de importancia en salud pública mundial, entre ellos se encuentra *S. aureus* (Lucero et al., 2009). La importancia de este patógeno radica en su capacidad de generar infecciones, especialmente en los nosocomios, adicionalmente a su habilidad para generar resistencia a los antibióticos. Como se mencionó anteriormente, *S. aureus* puedes colonizar diversas partes de nuestro organismo para ocasionar infecciones, hasta en dispositivos médicos formando biofilms, haciendo más aún más complejo su erradicación (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). La habilidad de esta bacteria para colonizar diversas superficies, la resistencia a antibióticos que genera y su capacidad para formar biofilms, convierte a *S. aureus* en una amenaza sumamente importante para los seres humanos, sin importar edad o género. Debido a lo anteriormente descrito, se han desarrollado nuevos antibióticos o bien identificando moléculas con actividad antimicrobiana, como los es la LF y sus péptidos sintéticos derivados.

Como se describió previamente, debido a sus características estructurales, la LF ha presentado actividad bacteriostática o bactericida en contra diferentes bacterias (Lönnerdal & Iyer, 1995; Valenti, Berlutti, Conte, Longhi, & Seganti, 2004),

es por ello que, en el presente proyecto de investigación se propuso el uso de esta proteína de origen bovino y su péptido LF quimera para erradicar *S. aureus* en su estado planctónico, biofilms e identificar el efecto sinérgico con un antibiótico.

De manera general, los resultados en la presente investigación fueron los siguientes: bLF y LF quimera inhibieron el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA a diferentes tiempos, el mecanismo por el cual se llevó a cabo dicha actividad aparentemente fue por la unión tanto de bLF ó LF quimera con la superficie de las bacterias, alterando la permeabilidad membranal de la bacteria, produciendo cambios en la estructura de esta y finalmente, produciendo la lisis de *S. aureus*. Adicionalmente, bLF disgregó biofilms de la cepa ATCC, pero no de la MRSA. Finalmente, bLF presentó sinergismo parcial con el antibiótico ampicilina en biofilms de MRSA. Los resultados previamente mencionados, se discutirán a continuación.

En el presente estudio bLF y LF quimera inhibieron más del 70% de los cultivos de *S. aureus* ATCC (Fig. 10), este dato coincide con algunos estudios. Diarra MS y cols., (2003) también demostraron la inhibición del crecimiento de *S. aureus* aislado de una muestra clínica de mastitis bovina, bLF inhibió cerca de 3 unit/log de los cultivos de *S. aureus* en comparación a los sin tratamiento (Diarra et al., 2003). Redwan ER y cols., (2016), observaron la inhibición total de *S. aureus* sensible a metilcilina utilizando 0.75 mg/ml de LF de origen humano y de camello durante 3 h (Redwan et al., 2016). En lo que respecta a LF quimera, nuestro grupo de trabajo demostró que con la concentración de 20 μ M se obtiene actividad inhibitoria en los cultivos de *S. aureus* sensible a metilcilina (Flores-Villaseñor et al., 2010). Estos datos coinciden con lo obtenido en nuestra investigación.

La inhibición del crecimiento de cultivos bacterianos por parte de bLF y LF quimera, se ha observado en otras bacterias Gram positivas por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* en las cuales bLF y LF quimera inhibieron más del 90% del cultivo de esta bacteria. Por otro lado, en bacterias Gram negativas también se ha demostrado la capacidad de bLF o LF quimera de inhibir el crecimiento de sus cultivos como lo es *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Vibrio* spp., entre otros (Acosta-Smith et al., 2017; Biernbaum et al., 2021; Flores-Villaseñor et al., 2010; Leon-Sicairos et al., 2014; Xu et al., 2010).

En el presente proyecto, no solamente se retó a bLF y a LF quimera contra de *S. aureus* ATCC sensible a metilcilina, sino también contra MRSA. Como resultado, tanto bLF como LF quimera inhibieron el crecimiento de los cultivos MRSA (Fig. 11) Estos resultados coinciden con lo publicado con otros trabajos, por ejemplo, el tratamiento de los cultivos de MRSA con LF de camello y LF humana a 0.75 y 1 mg/ml respectivamente, durante 3h inhibió la totalidad del crecimiento bacteriano (Redwan et al., 2016). Adicionalmente, Flores-Villaseñor y cols., (2010), demostraron la inhibición de los cultivos de MRSA utilizando LF quimera y otros péptidos sintéticos de la bLF como los son LFcina17-30 y LFampina 264-283 (Flores-Villaseñor et al., 2010).

Posteriormente de demostrar que bLF y LF quimera inhiben el crecimiento de los cultivos planctónicos de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA, el siguiente paso fue, determinar el mecanismo por el cual tanto bLF y LF quimera lleva a cabo dicho efecto. Lamentablemente con los ensayos de inhibición no es posible determinar el mecanismo de acción de los tratamientos, para ello, se ejecutaron experimentos de microscopia confocal, electrónica y fluorescencia para describir el mecanismo de bLF

como de LF quimera y determinar si ejercía efecto bacteriostático y bien, bactericida sobre *S. aureus* (Fig. 12).

Al ser bLF una proteína catiónica, se especula que podría estar interactuando con componentes de carga negativa de la membrana de *S. aureus* como lo podrían ser los ácidos teicocicos (Keinhörster, George, Weidenmaier, & Wolz, 2019). Para comprobar esta hipótesis, utilizamos bLF y LF quimera acoplados a fluorescencia, y de acuerdo con nuestros resultados, se puede observar que la bLF y la LF quimera interactúan con las membranas bacterianas. Pero, por la simple interacción no es posible deducir si nuestros tratamientos están produciendo daño en la membrana de *S. aureus*. Para poder visualizar los posibles cambios estructurales que ocasionaban nuestros tratamientos, se realizaron ensayos de microscopia electrónica, donde de acuerdo con nuestros datos, bLF y LF quimera cambian la morfología de la bacteria, este fenómeno se ha observado en otros estudios (Flores-Villasenor et al., 2012; León-Sicairos, Reyes-López, Ordaz-Pichardo, & de la Garza, 2006).

Finalmente, por los datos encontrados en ensayos de permeabilización con el criterio de inclusión de yoduro de propidio, los datos apuntan a que después de la interacción la membrana se desestabiliza por la acción de la bLF y LF quimera, induciendo cambios morfológicos en la bacteria, perdiendo permeabilidad selectiva y tal vez esto permite la internalización de la LF y LF quimera, y de agua, lo que conlleva a la lisis bacteriana (efecto bactericida), dicho efecto microbicida se ha visto en otras bacterias y microorganismos (Cavestro et al., 2002; del Olmo, Morales, & Nuñez, 2008, 2009).

Este mecanismo de acción bactericida de bLF y LF quimera, se ha observado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Pero, dentro de todas las

bacterias, en *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* tiene una importancia especial, debido a que las bacterias del género *Vibrio* son microorganismos halofílicos (que viven en condiciones de alta salinidad), esto quiere decir que, a pesar de la alta carga iónica en el medio donde se encontraban los Vibrios, aun así, la LF quimera y la LF bovina principalmente, ejercieron acción microbicida (León-Sicarios N et al., 2008). Adicionalmente, dentro de este mecanismo de acción bactericida de la bLF en contra de *S. aureus*, se especula que los residuos 1-344 de la proteína nativa es quien ejerce mayormente la actividad bactericida en contra de esta bacteria (Bai et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, bLF es una proteína multifuncional y dentro de las funciones antimicrobianas, la actividad anti-biofilms ha tomado gran importancia. Los biofilms al ser una estructura que protege a las bacterias que se encuentran dentro de ellas, hacen más persistentes las infecciones y más difícil de erradicar (Donlan, 2002). Dentro de las etapas de la formación de los biofilms, existen diferentes puntos en los que la LF puede evitar su formación o bien disgregarlos. Dentro de la formación de los biofilms se ha demostrado que bLF puede evitarla por diversos mecanismos, 1) secuestro de hierro, 2) eliminación de las bacterias que podrían formar el biofilms, 3) competencia de unión a la superficie blanco de la bacteria, 4) inhibición en la expresión de genes relacionados a la formación de biofilms o 5) por alteración en la motilidad superficial de las bacterias (García-Borjas, Ceballos-Olvera, Luna-Castro, & Peña-Avelino, 2021; Hammerschmidt, Bethe, Remane, & Chhatwal, 1999; Khanum, Chung, Clarke, & Chin, 2023; Singh, 2004; Singh, Parsek, Greenberg, & Welsh, 2002). En este sentido, se puede decir que la LF tiene la capacidad para prevenir la formación de los

biofilms. Sin embargo, en este proyecto determinamos la actividad anti-biofilm de la bLF y LF quimera en biofilms establecidos y no en la prevención de estos, lo cual hace más difícil su erradicación.

En nuestros resultados, se pudo observar que solamente bLF tuvo la capacidad para disgregar los biofilms formados por *S. aureus* ATCC 25923 (Fig. 13). Desafortunadamente, son escasos los estudios en los que se ha utilizado LF para disgregar biofilms de *S. aureus*. Kosznik-Kwasnicka y cols., (2022), utilizaron fagos para introducir bLF para erradicar biofilms de *S. aureus* multi-drogo resistente, como resultados obtuvieron una disminución de hasta 3 unit/log en biofilms pre formados y tratados con los fagos con bLF a 1mg/ml durante 24h (Kosznik-Kwaśnicka, Kaźmierczak, & Piechowicz, 2022). Datos que coincide con nuestro trabajo, ya que bLF disgregó más del 80% de los biofilms de *S. aureus*.

La actividad anti-biofilms se ha probado en otras bacterias, no solamente *S. aureus*, por ejemplo, se realizó un experimento donde evaluaron la capacidad anti-biofilms de componentes de la leche materna (hLF, lactosa, IgA y caseína) en biofilms de *S. mutans*, como resultado hLF fue quien mostró mayor actividad anti-biofilms, seguido de IgA (Allison et al., 2015). Sheffield C. y cols., (2012), utilizaron bLF, dextranasa y lisozima para disgregar biofilms de *E. coli* y *K. pneumoniae*, en los resultados bLF fue el tratamiento que disgregó biofilms en mayor proporción, en el caso de *E. coli*, bLF disgregó el 95% de los biofilms, mientras que en *K. pneumoniae* disgregó el 100% de los biofilms (Sheffield, Crippen, Poole, & Beier, 2012).

Por otro lado, bLF también se ha utilizado junto con otros componentes que no son antibióticos para disgregar biofilms, como es el caso del trabajo de Ammons M. y cols., (2011), en el cual utilizaron LF/xilitol combinado con apósitos de plata para

heridas para erradicar biofilms de *P. aeruginosa* y MRSA. Como resultado, la combinación de los tratamientos disminuyó en 4 unit/log las bacterias de los biofilms de ambas bacterias (Ammons, Ward, & James, 2011).

El mecanismo por el cual la bLF disgrega los biofilms no se encuentra totalmente dilucidado. Sin embargo, una propuesta con gran solidez es la hecha por nuestro equipo de trabajo, en la cual utilizaron bLF para disgregar los biofilms de *S. pneumoniae*. Uno de los componentes más importante de los biofilms es el DNA extracelular (DNAe) que funge como una red dentro de los biofilms para darle estructura a estos (Panlilio & Rice, 2021). Debido a la afinidad que ha mostrado la bLF al DNA (Babina, Kanyshkova, Buneva, & Nevinsky, 2004), se cuantificó el DNAe de los biofilms tratados con bLF, como resultado, bLF eliminaba casi en totalidad el DNAe de los biofilms de *S. pneumoniae*, los cuales fueron disgregados por esta proteína. Adicionalmente, la actividad DNAsa que mostró la bLF en el DNAe de los biofilms, afectó la transferencia vertical de los genes que confieren resistencia a los antibióticos dentro de los biofilms de *S. pneumoniae* (Angulo-Zamudio et al., 2019).

bLF no solamente fue retada en contra los biofilms de *S. aureus* ATCC 25923, sino también en contra de los formados por la cepa MRSA. Desafortunadamente bLF ni LF quimera pudieron disgregar los biofilms de esta cepa (Fig. 14). Este resultado concuerda con otros estudios, en los cuales, LF no presentó actividad en contra de las cepas resistentes a fármacos o bien se tuvo que utilizar mayor concentración de la LF para poder disgregar los biofilms de las cepas multi-drogo resistentes (Diarra et al., 2003; Redwan et al., 2016). Un ejemplo es en el estudio de Angulo-Zamudio y cols., (2019) que se tuvo que doblar la concentración de bLF para poder disgregar los biofilms formados por cepas de *S. pneumoniae* resistentes a las combinaciones

de tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol (Angulo-Zamudio et al., 2019). La falta de actividad de las proteínas y péptidos catiónicos en las bacterias multi-drogo resistente tiene una alta relación con los cambios estructurales que hacen las bacterias para sobrevivir. En el caso de los biofilms de *S. aureus*, esta bacteria tiene la capacidad de incrementar la producción del polisacárido intracelular responsable de la adhesión (PIA), el cual es un componente catiónico, de esta manera *S. aureus* incrementa la carga positiva de la matriz extracelular de los biofilms, alterando la interacción de los biofilms con proteínas y péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana, como es el caso de la bLF y LF quimera, como resultado menor capacidad de disgregar biofilms (Band & Weiss, 2015; Joo, Fu, & Otto, 2016; Moravej et al., 2018).

La resistencia de las bacterias planctónicas como biofilms a antibióticos y a compuestos catiónicos, ha llevado a buscar soluciones alternativas, como es el uso de la combinación de un antibiótico con una proteína o péptido con actividad antimicrobiana, buscando un efecto sinérgico entre ambos tratamientos. En este estudio, se utilizó en combinación bLF y ampicilina, los cuales tuvieron efecto de sinergismo parcial para disgregar los biofilms de MRSA (Fig. 15 y Cuadro 2). Estos resultados coinciden con otros estudios publicados. Petitclerc D y cols., (2007), demostraron el efecto combinado de bLF + penicilina era de 3 a 5 veces más efectiva combatir a *S. aureus* resistente a beta lactámicos en comparación a los tratamientos solos (Petitclerc et al., 2007). Diarra MS y cols., (2002), también demostraron el efecto sinérgico de la combinación de bLF + penicilina, pero en bacterias planctónicas de *S. aureus* ATCC 25923 y 29213 (Diarra et al., 2003). El sinergismo de LF no solamente se ha probado en *S. aureus*, sino también en otras bacterias. Al-

Mogbel MS y cols., (2021), demostraron que la adición de bLF a cultivos de diferentes bacterias que eran resistentes a determinados antibióticos, pasaban a ser sensibles, como es el caso de *E. coli* que la adición de bLF las volvió sensible a cefepima, cefotaxima, ceftazidima y cefuroxima. En *Enterobacter aerogenes*, la adición de bLF volvió sensible a la bacteria a 12 antibióticos. Por parte de *Pseudomonas aeruginosa* la combinación de bLF + antibiótico regreso la sensibilidad de 14 antibióticos en esta bacteria. En *S. aureus* la combinación con bLF regresó la sensibilidad a 8 antibióticos, el mismo fenómeno fue observado en 3 cepas más (Al-Mogbel et al., 2021). Adicionalmente, el efecto sinérgico de LF también se ha observado en hongos, la combinación de LF con fluconazol incrementó la actividad de fungicida de los tratamientos en comparación de ambos por separado (Naidu, Fowler, Martinez, Chen, & Tulpinski, 2004).

A diferencia de nuestros estudios, los mostrados previamente no utilizaron el FICI, los autores solamente combinaron concentraciones efectivas de la LF y el antibiótico, lo cual no debería ser clasificado como un sinergismo, más bien como un efecto aditivo.

Por otro lado, Redwan EM y cols., (2016), determinaron el efecto sinérgico de la lactoferrina humana y de camello con 17 antibióticos con cepas de *S. aureus* sensible a metilcilina como resistente. Como resultado, LF de camello presentó sinergismo con vancomicina en cepas sensible y resistentes (FICI: 0.25 y 0.37, respectivamente), asimismo con oxicilina en ambas cepas (FICI: 0.05, respectivamente). En lo que respecta con LF humana, presentó sinergismo con los mismos antibióticos que la LF de camello vancomicina (FICI: 0.25 para la cepa sensible y 0.5 para MRSA) y oxicilina (FICI: 0.5 para ambas cepas) (Redwan et al.,

2016). Al igual que nuestro estudio, estos autores utilizaron el FICI, pero los resultados fueron en bacterias planctónicas, mientras que los de nuestro estudio fueron en biofilms.

Como se muestra en este estudio y en los demás citados, bLF tiene la capacidad de combinar su actividad con otros antibióticos para potenciar el efecto de ambos. La posible explicación del mecanismo por el cual se lleva a cabo este fenómeno pudiera ser que la bLF al disgregar los biofilms de *S. aureus* deje vulnerables a las bacterias sin esa protección física para que la ampicilina pueda ejercer su efecto. Sin embargo, recordemos que las bacterias que forman los biofilms, son resistentes a ampicilina, lo cual hace que el antibiótico no tenga acción frente MRSA. Por otro lado, entonces aquí surgen diversas hipótesis, una de ellas podría ser que la LF dañe las membranas de las MRSA liberadas y ampicilina complemente el daño de las bacterias. Otra posible hipótesis, sería que algunos antibióticos son más efectivos en ambientes pobres de hierro, fenómeno que puede ocasionar la LF (Coraça-Huber, Dichtl, Steixner, Nogler, & Weiss, 2018; Courcol, Lambert, Fournier, Martin, & Brown, 1991; Diarra et al., 2003; Luo et al., 2014; Naidu, Andersson, & Forsgren, 1992). Desafortunadamente aún no existe un mecanismo establecido sobre cómo podría actuar la LF en combinación con antibióticos ni en bacterias planctónicas ni en biofilms, es por ello, que más investigaciones en este campo son necesarias para profundizar en los mecanismos de acción y encontrar oportunidades para mejorar los tratamientos para erradicar las infecciones ocasionadas por *S. aureus* específicamente las resistentes a metilcilina.

En base a nuestros conocimientos, este es el primer trabajo que reporta la actividad de sinergismo parcial de la bLF junto con ampicilina en biofilms de MRSA.

Existen diversos reportes de sinergismo entre la bLF y antibióticos en contra de MRSA u otras bacterias, pero son en bacterias en estado planctónico. Por otro lado, este trabajo presenta algunas limitaciones, una de ellas es la falta de actividad que presentaron los tratamientos en los biofilms, ya que se pudo probar otros tiempos de incubación o bien otras concentraciones. Otra debilidad de este proyecto fue la falta de experimentos para probar a la LF quimera en los ensayos de sinergismo, mismos que están puestos en marcha, para poder avanzar más en el conocimiento de este tema.

X. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. bLF y LF quimera presentaron actividad antimicrobiana en ambas cepas de *S. aureus* tanto la cepa de referencia ATCC 25923, MRSA.
2. El mecanismo de acción para de bLF y LF quimera fue mediante la unión de estos a la membrana de *S. aureus*, la desestabilización de está, produciendo cambios en la permeabilidad y estructurales para producir la lisis de las bacterias.
3. Solamente bLF tuvo la capacidad de disgregar lo biofilms de *S. aureus* ATCC 25923, pero no de MRSA.
4. Finalmente, la adición en conjunto de bLF y ampicilina tuvieron efecto sinérgico, con el cual disgregaron los biofilms de MRSA.

Perspectivas

Los hallazgos encontrados en este trabajo de investigación nos proporcionan alternativas para poder tratar las infecciones por *S. aureus*. Conforme pasa el tiempo, sigue en incremento la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias y no solamente es suficiente la fabricación de nuevos antibióticos o bien nuevas generaciones de los existentes, sino también es necesario iniciar la combinación de estos con proteínas y péptidos para poder tener resultados más eficientes y eficaces en contra no solamente bacterias en su estado planctónico, sino también en los biofilms. El avance de esta área podría llevar a disminuir no solamente los costos económicos por enfermedades infecciosas, sino también las tasas de morbilidad y mortalidad mundial.

XI. REFERENCIAS

- Acosta-Smith, E., Viveros-Jiménez, K., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Leon-Sicairos, N. (2017). Bovine Lactoferrin and Lactoferrin-Derived Peptides Inhibit the Growth of *Vibrio cholerae* and Other *Vibrio* species. *Front Microbiol*, 8, 2633. doi:10.3389/fmicb.2017.02633
- Ahmad, N., Girardet, J. M., Akbar, S., Lanhers, M. C., Paris, C., Yen, F. T., & Corbier, C. (2012). Lactoferrin and its hydrolysate bind directly to the oleate-activated form of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor. *FEBS J*, 279(23), 4361-4373. doi:10.1111/febs.12026
- Al-Mogbel, M. S., Menezes, G. A., Elabbasy, M. T., Alkhulaifi, M. M., Hossain, A., & Khan, M. A. (2021). Effect of Synergistic Action of Bovine Lactoferrin with Antibiotics on Drug Resistant Bacterial Pathogens. *Medicina (Kaunas)*, 57(4). doi:10.3390/medicina57040343
- Allison, L. M., Walker, L., Sanders, B. J., Yang, Z., Eckert, G., & Gregory, R. L. (2015). Effect of human milk and its components on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(3), 255-261.
- Ammons, M. C. B., Ward, L. S., & James, G. A. (2011). Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *International wound journal*, 8(3), 268-273.
- Angulo-Zamudio, U. A., Vidal, J. E., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., Leon-Sicairos, C., Antezana, B. S., Leon-Sicairos, N. (2019). Lactoferrin Disaggregates Pneumococcal Biofilms and Inhibits Acquisition of Resistance Through Its DNase Activity. *Front Microbiol*, 10, 2386. doi:10.3389/fmicb.2019.02386
- Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Brewer, M., & Gauthier, J. J. (1982). Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun*, 35(3), 792-799.
- Azara, E., Longheu, C. M., Attene, S., Sanna, S., Sale, M., Addis, M. F., & Tola, S. (2022). Comparative profiling of agr locus, virulence, and biofilm-production genes of human and ovine non-aureus staphylococci. *BMC Vet Res*, 18(1), 212. doi:10.1186/s12917-022-03257-w
- Babina, S. E., Kanyshkova, T. G., Buneva, V. N., & Nevinsky, G. A. (2004). Lactoferrin is the major deoxyribonuclease of human milk. *Biochemistry (Mosc)*, 69(9), 1006-1015. doi:10.1023/b:biry.0000043543.21217.b3
- Bae, J. S., Da, F., Liu, R., He, L., Lv, H., Fisher, E. L., Otto, M. (2021). Contribution of Staphylococcal Enterotoxin B to *Staphylococcus aureus* Systemic Infection. *J Infect Dis*, 223(10), 1766-1775. doi:10.1093/infdis/jiaa584
- Bai, X., Teng, D., Tian, Z., Zhu, Y., Yang, Y., & Wang, J. (2010). Contribution of bovine lactoferrin inter-lobe region to iron binding stability and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 23(3), 431-439. doi:10.1007/s10534-010-9300-x
- Band, V., & Weiss, D. (2015). Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)* 4: 18–41. In.
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *J Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30(8), 492-499.
- Biernbaum, E. N., Gnezda, A., Akbar, S., Franklin, R., Venturelli, P. A., & McKillip, J. L. (2021). Lactoferrin as an antimicrobial against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk. *JDS Commun*, 2(3), 92-97. doi:10.3168/jdsc.2020-0030

- Bingham, R. J., Rudiño-Piñera, E., Meenan, N. A., Schwarz-Linek, U., Turkenburg, J. P., Höök, M., Potts, J. R. (2008). Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), 12254-12258. doi:10.1073/pnas.0803556105
- Bolscher, J. G., Adão, R., Nazmi, K., van den Keybus, P. A., van 't Hof, W., Nieuw Amerongen, A. V., . . . Veerman, E. C. (2009). Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie*, 91(1), 123-132. doi:10.1016/j.biochi.2008.05.019
- Bolscher, J. G., van der Kraan, M. I., Nazmi, K., Kalay, H., Grun, C. H., Van't Hof, W., Nieuw Amerongen, A. V. (2006). A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 27(1), 1-9. doi:S0196-9781(05)00308-6 (pii) 10.1016/j.peptides.2005.06.012
- Bullen, J. J. (1981). The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis*, 3(6), 1127-1138.
- Caccavo, D., Pellegrino, N. M., Altamura, M., Rigon, A., Amati, L., Amoroso, A., & Jirillo, E. (2002). Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J Endotoxin Res*, 8(6), 403-417. doi:10.1179/096805102125001000
- Castellano González, M. J., & Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *J Kasmera*, 38(1), 18-35.
- Castro-Orozco, R., Villafañe-Ferrer, L. M., Álvarez-Rivera, E., Martínez De Arco, M., Rambaut-Donado, C. L., & Vitola-Heins, G. V. (2010). *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en niños escolares de Cartagena. *J Revista de Salud Pública*, 12, 454-463.
- Cavestro, G. M., Ingegnoli, A. V., Aragona, G., Iori, V., Mantovani, N., Altavilla, N., Borghi, L. (2002). Lactoferrin: mechanism of action, clinical significance and therapeutic relevance. *Acta Biomed*, 73(5-6), 71-73.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *J Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Céspedes Miranda, E. M., Hernández Lantigua, I., & Llópiz Janer, N. J. R. C. d. I. B. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *15(2)*, 0-0.
- Chang, F. Y., MacDonald, B. B., Peacock, J. E., Jr., Musher, D. M., Triplett, P., Mylotte, J. M., Yu, V. L. (2003). A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)*, 82(5), 322-332. doi:10.1097/01.md.0000091185.93122.40
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688
- Ciccaglione, A. F., Di Giulio, M., Di Lodovico, S., Di Campli, E., Cellini, L., & Marzio, L. (2019). Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: an in vitro and in vivo study. *J Antimicrob Chemother*, 74(4), 1069-1077. doi:10.1093/jac/dky510
- Conte, A. L., Longhi, C., Conte, M. P., Costanzo, A. M., Paesano, R., Santangeli, S., Rosa, L. (2022). Effect of bovine lactoferrin on recurrent urinary tract infections: in vitro and in vivo evidences. *Biomaterials*. doi:10.1007/s10534-022-00409-1
- Coraça-Huber, D. C., Dichtl, S., Steixner, S., Nogler, M., & Weiss, G. (2018). Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics

- against coagulase-negative *Staphylococci*. *Pathog Dis*, 76(5). doi:10.1093/femspd/fty052
- Corrigan, R. M., Miajlovic, H., & Foster, T. J. (2009). Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol*, 9, 22. doi:10.1186/1471-2180-9-22
- Courcol, R. J., Lambert, P. A., Fournier, P., Martin, G. R., & Brown, M. R. (1991). Effects of iron depletion and sub-inhibitory concentrations of antibodies on siderophore production by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 28(5), 663-668. doi:10.1093/jac/28.5.663
- Crosby, H. A., Kwiecinski, J., & Horswill, A. R. (2016). *Staphylococcus aureus* Aggregation and Coagulation Mechanisms, and Their Function in Host-Pathogen Interactions. *Adv Appl Microbiol*, 96, 1-41. doi:10.1016/bs.aambs.2016.07.018
- del Olmo, A., Morales, P., & Nuñez, M. (2008). Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: influence of environmental and physiological factors. *J Food Prot*, 71(12), 2468-2474. doi:10.4315/0362-028x-71.12.2468
- del Olmo, A., Morales, P., & Nuñez, M. (2009). Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *J Food Prot*, 72(4), 760-765. doi:10.4315/0362-028x-72.4.760
- Derakhshan, S., Navidinia, M., & Haghi, F. (2021). Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to agr typing, virulence genes, and biofilm formation. *BMC Infect Dis*, 21(1), 627. doi:10.1186/s12879-021-06307-0
- Diarra, M. S., Petitclerc, D., Deschênes, E., Lessard, N., Grondin, G., Talbot, B. G., & Lacasse, P. (2003). Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol*, 95(1-2), 33-42. doi:10.1016/s0165-2427(03)00098-9
- Dierick, M., Vanrompay, D., Devriendt, B., & Cox, E. (2021). Lactoferrin, a versatile natural antimicrobial glycoprotein that modulates the host's innate immunity. *Biochem Cell Biol*, 99(1), 61-65. doi:10.1139/bcb-2020-0080
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890. doi:10.3201/eid0809.020063
- Drago-Serrano, M. E., de la Garza-Amaya, M., Luna, J. S., & Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol*, 12(1), 1-9. doi:10.1016/j.intimp.2011.11.002
- Du, X., Larsen, J., Li, M., Walter, A., Slavetinsky, C., Both, A., Peschel, A. (2021). *Staphylococcus epidermidis* clones express *Staphylococcus aureus*-type wall teichoic acid to shift from a commensal to pathogen lifestyle. *Nat Microbiol*, 6(6), 757-768. doi:10.1038/s41564-021-00913-z
- El Haj, C., Lichtenberg, M., Nielsen, K. L., Bjarnsholt, T., & Jensen, P. (2021). Catalase Protects Biofilm of *Staphylococcus aureus* against Daptomycin Activity. *Antibiotics (Basel)*, 10(5). doi:10.3390/antibiotics10050511
- Ellison, R. T., 3rd. (1994). The effects of lactoferrin on Gram-negative bacteria. *Adv Exp Med Biol*, 357, 71-90. doi:10.1007/978-1-4615-2548-6_8
- Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Merhi, M., Mestiri, S., Taib, N., Moustafa Abo El-Ella, D., . Dermime, S. (2022). Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann Med*, 54(1), 524-540. doi:10.1080/07853890.2022.2031274
- Feuillie, C., Formosa-Dague, C., Hays, L. M., Vervaeck, O., Derclaye, S., Brennan, M. P., . . . Dufrière, Y. F. (2017). Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal

- biofilm-forming protein SdrC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(14), 3738-3743. doi:10.1073/pnas.1616805114
- Fleet, J. C. (1995). A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutr Rev*, 53(8), 226-227. doi:10.1111/j.1753-4887.1995.tb01556.x
- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., de la Garza, M., Nazmi, K., Bolscher, J. G., & Leon-Sicairos, N. (2012). Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells. *Biochimie*, 94(9), 1935-1942. doi:10.1016/j.biochi.2012.05.011
- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltran, J., . . . Bolscher, J. G. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals*, 23(3), 569-578. doi:10.1007/s10534-010-9306-4
- Flores-Villaseñor, H., Canizalez-Román, A., de la Garza, M., Nazmi, K., Bolscher, J. G., & Leon-Sicairos, N. (2012). Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells. *Biochimie*, 94(9), 1935-1942. doi:10.1016/j.biochi.2012.05.011
- Flores-Villaseñor, H., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltrán, J., Bolscher, J. G. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals*, 23(3), 569-578. doi:10.1007/s10534-010-9306-4
- Ganesh, P. S., Veena, K., Senthil, R., Iswamy, K., Ponmalar, E. M., Mariappan, V., Shankar, E. M. (2022). Biofilm-Associated Agr and Sar Quorum Sensing Systems of *Staphylococcus aureus* Are Inhibited by 3-Hydroxybenzoic Acid Derived from *Illicium verum*. *ACS Omega*, 7(17), 14653-14665. doi:10.1021/acsomega.1c07178
- Ganesh, V. K., Barbu, E. M., Deivanayagam, C. C., Le, B., Anderson, A. S., Matsuka, Y. V., . . . Höök, M. (2011). Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor B/ligand interactions. *J Biol Chem*, 286(29), 25963-25972. doi:10.1074/jbc.M110.217414
- García-Borjas, K. A., Ceballos-Olvera, I., Luna-Castro, S., & Peña-Avelino, Y. (2021). Bovine Lactoferrin can Decrease the In Vitro Biofilm Production and Show Synergy with Antibiotics Against *Listeria* and *Escherichia coli* Isolates. *Protein Pept Lett*, 28(1), 101-107. doi:10.2174/0929866527666200403111743
- García, F. I. H., Gay, M. d. C. G., Fontanil, M. G., & Nieto, J. A. S. (2011). *Staphylococcus aureus* subespecie aureus catalasa negativa: un nuevo caso en España. *J Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(9), 708-709.
- Gismene, C., Hernández González, J. E., Santisteban, A. R. N., Ziem Nascimento, A. F., Dos Santos Cunha, L., de Moraes, F. R., . . . Barros Mariutti, R. (2022). *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxin E, Oligomeric State and Flip of P186: Implications for Its Action Mechanism. *Int J Mol Sci*, 23(17). doi:10.3390/ijms23179857
- Graille, M., Stura, E. A., Corper, A. L., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Charbonnier, J. B., & Silverman, G. J. (2000). Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5399-5404. doi:10.1073/pnas.97.10.5399
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 107. doi:10.3389/fcimb.2020.00107
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108. doi:10.1038/nrmicro821

- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P. H., & Chhatwal, G. S. (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 67(4), 1683-1687. doi:10.1128/iai.67.4.1683-1687.1999
- Han, S. M., Kim, J. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R., & Pak, S. C. (2016). Antibacterial Activity and Antibiotic-Enhancing Effects of Honeybee Venom against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(1), 79. doi:10.3390/molecules21010079
- Hurtado, M., De la Parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *J Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118.
- Ibberson, C. B., Jones, C. L., Singh, S., Wise, M. C., Hart, M. E., Zurawski, D. V., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. *Infect Immun*, 82(10), 4253-4264. doi:10.1128/iai.01710-14
- Joo, H.-S., Fu, C.-I., & Otto, M. (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150292.
- Keinhörster, D., George, S. E., Weidenmaier, C., & Wolz, C. (2019). Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *Int J Med Microbiol*, 309(6), 151333. doi:10.1016/j.ijmm.2019.151333
- Kell, D. B., Heyden, E. L., & Pretorius, E. (2020). The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol*, 11, 1221. doi:10.3389/fimmu.2020.01221
- Khanum, R., Chung, P. Y., Clarke, S. C., & Chin, B. Y. (2023). Lactoferrin modulates the biofilm formation and bap gene expression of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol*, 69(2), 117-122. doi:10.1139/cjm-2022-0135
- Kosznik-Kwaśnicka, K., Kaźmierczak, N., & Piechowicz, L. (2022). Activity of Phage-Lactoferrin Mixture against Multi Drug Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antibiotics (Basel)*, 11(9). doi:10.3390/antibiotics11091256
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*, 31(4). doi:10.1128/cmr.00020-18
- Laupland, K. B., Lyytikäinen, O., Sgaard, M., Kennedy, K., Knudsen, J. D., Ostergaard, C., Collignon, P. (2013). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *J Clinical microbiology infection*, 19(5), 465-471.
- Leistner, R., Hanitsch, L. G., Krüger, R., Lindner, A. K., Stegemann, M. S., & Nurjadi, D. (2022). Skin Infections Due to Pantone-Valentine Leukocidin-Producing *S. Aureus*. *Dtsch Arztebl Int*, 119(45), 775-784. doi:10.3238/arztebl.m2022.0308
- Leon-Sicairos, N., Angulo-Zamudio, U. A., Vidal, J. E., Lopez-Torres, C. A., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Canizalez-Roman, A. (2014). Bactericidal effect of bovine lactoferrin and synthetic peptide lactoferrin chimera in *Streptococcus pneumoniae* and the decrease in luxS gene expression by lactoferrin. *Biomaterials*, 27(5), 969-980. doi:10.1007/s10534-014-9775-y
- Leon-Sicairos, N., Canizalez-Roman, A., de la Garza, M., Reyes-Lopez, M., Zazueta-Beltran, J., Nazmi, K., . . . Bolscher, J. G. (2009). Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochimie*, 91(1), 133-140. doi:S0300-9084(08)00200-9 [pii] 10.1016/j.biochi.2008.06.009
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Ordaz-Pichardo, C., & de la Garza, M. (2006). Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with

- metronidazole in *Entamoeba histolytica*. *Biochem Cell Biol*, 84(3), 327-336. doi:10.1139/o06-060
- Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80(3), 252-267.
- Liebowitz, L. D. (2009). MRSA burden and interventions. *Int J Antimicrob Agents*, 34 Suppl 3, S11-13. doi:10.1016/s0924-8579(09)70551-5
- Lister, J. L., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 178. doi:10.3389/fcimb.2014.00178
- Lönnerdal, B., & Iyer, S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr*, 15, 93-110. doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.000521
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8), 520-532. doi:10.1056/nejm199808203390806
- Lucero, C. A., Hageman, J., Zell, E. R., Bulens, S., Nadle, J., Petit, S., . . . Fridkin, S. K. (2009). Evaluating the potential public health impact of a *Staphylococcus aureus* vaccine through use of population-based surveillance for invasive methicillin-resistant *S. aureus* disease in the United States. *Vaccine*, 27(37), 5061-5068. doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.055
- Luo, G., Spellberg, B., Gebremariam, T., Lee, H., Xiong, Y. Q., French, S. W., Ibrahim, A. S. (2014). Combination therapy with iron chelation and vancomycin in treating murine staphylococemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(5), 845-851. doi:10.1007/s10096-013-2023-5
- Massimi, I., Park, E., Rice, K., Muller-Esterl, W., Sauder, D., & McGavin, M. J. (2002). Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 277(44), 41770-41777. doi:10.1074/jbc.M207162200
- Masson, P., Heremans, J. F., & Prignot, J. (1965). Immunohistochemical localization of the iron-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. *Experientia*, 21(10), 604-605.
- McAdow, M., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J Innate Immun*, 4(2), 141-148. doi:10.1159/000333447
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 1. doi:10.3389/fcimb.2015.00001
- Mehmeti, I., Bytyqi, H., Muji, S., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2017). The prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and their virulence genes in bulk tank milk in Kosovo. *J Infect Dev Ctries*, 11(3), 247-254. doi:10.3855/jidc.8256
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *J Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747-767.
- Naidu, A. S., Andersson, M., & Forsgren, A. (1992). Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 36(3), 177-183. doi:10.1099/00222615-36-3-177
- Naidu, A. S., Fowler, R. S., Martinez, C., Chen, J., & Tulpinski, J. (2004). Activated lactoferrin and fluconazole synergism against *Candida albicans* and *Candida glabrata* vaginal isolates. *J Reprod Med*, 49(10), 800-807.

- Nuijens, J. H., van Berkel, P. H., & Schanbacher, F. L. (1996). Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1(3), 285-295. doi:10.1007/bf02018081
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49
- Olarte, N. M., Valderrama, I. A., Reyes, K. R., Garzón, M. I., Escobar, J. A., Castro, B. E., & Vanegas, N. J. B. (2010). Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. 30(3), 353-361.
- Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 17(3), 189-196. doi:10.1023/b:biom.0000027691.86757.e2
- Oteo, J., & Belén Aracil, M. (2015). [Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33 Suppl 2, 27-33. doi:10.1016/s0213-005x(15)30012-4
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, 37(1), 177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Panlilio, H., & Rice, C. V. (2021). The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 118(6), 2129-2141. doi:10.1002/bit.27760
- Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38.
- Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 84, 577-601. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034516
- Petitclerc, D., Lauzon, K., Cochu, A., Ster, C., Diarra, M. S., & Lacasse, P. (2007). Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, 90(6), 2778-2787. doi:10.3168/jds.2006-598
- Ponce-de-León, A., Camacho-Ortiz, A., Macías, A. E., Landín-Larios, C., Villanueva-Walbey, C., Trinidad-Guerrero, D., Sifuentes-Osornio, J. J. R. d. i. c. (2010). Epidemiology and clinical characteristics of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in a tertiary-care center in Mexico City: 2003-2007. 62(6), 553-559.
- Qu, M. D., Kausar, H., Smith, S., Lazar, P. G., Kroll-Desrosiers, A. R., Hollins, C., 3rd, . . . Ellison, R. T., 3rd. (2022). Epidemiological and clinical features of Panton-Valentine Leukocidin positive *Staphylococcus aureus* bacteremia: A case-control study. *PLoS One*, 17(3), e0265476. doi:10.1371/journal.pone.0265476
- Rascón-Cruz, Q., Espinoza-Sánchez, E. A., Siqueiros-Cendón, T. S., Nakamura-Bencomo, S. I., Arévalo-Gallegos, S., & Iglesias-Figueroa, B. F. (2021). Lactoferrin: A Glycoprotein Involved in Immunomodulation, Anticancer, and Antimicrobial Processes. *Molecules*, 26(1). doi:10.3390/molecules26010205
- Redwan, E. M., El-Baky, N. A., Al-Hejin, A. M., Baeshen, M. N., Almehdar, H. A., Elsayay, A., . . . Uversky, V. N. (2016). Significant antibacterial activity and synergistic effects of camel lactoferrin with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Res Microbiol*, 167(6), 480-491. doi:10.1016/j.resmic.2016.04.006
- Roche, F. M., Meehan, M., & Foster, T. J. (2003). The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology (Reading)*, 149(Pt 10), 2759-2767. doi:10.1099/mic.0.26412-0

- Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr*, 7(3). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018
- Romaniuk, J. A. H., & Cegelski, L. (2018). Peptidoglycan and Teichoic Acid Levels and Alterations in *Staphylococcus aureus* by Cell-Wall and Whole-Cell Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, 57(26), 3966-3975. doi:10.1021/acs.biochem.8b00495
- Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Iigo, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M. A., Tsuda, H. (1997). Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett*, 121(2), 211-216. doi:S0304-3835(97)00358-3 [pii]
- Sharp, J. A., Echague, C. G., Hair, P. S., Ward, M. D., Nyalwidhe, J. O., Geoghegan, J. A., . . . Cunnion, K. M. (2012). *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One*, 7(5), e38407. doi:10.1371/journal.pone.0038407
- Sheffield, C. L., Crippen, T. L., Poole, T. L., & Beier, R. C. (2012). Destruction of single-species biofilms of *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae by dextranase, lactoferrin, and lysozyme. *Int Microbiol*, 15, 185-189.
- Singh, P. K. (2004). Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals*, 17(3), 267-270. doi:10.1023/b:biom.0000027703.77456.27
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552-555. doi:10.1038/417552a
- Soboleva, S. E., Zakharova, O. D., Sedykh, S. E., Ivanisenko, N. V., Buneva, V. N., & Nevinsky, G. A. (2019). DNase and RNase activities of fresh cow milk lactoferrin. *J Mol Recognit*, 32(7), e2777. doi:10.1002/jmr.2777
- Solano, C., Echeverez, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 18, 96-104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008
- Song, Q., Zhu, Z., Chang, Y., Shen, X., Gao, H., & Yang, Y. (2016). Prevalence and Characteristics of Enterotoxin B-Producing *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources: A Particular Cluster of ST188 Strains was Identified. *J Food Sci*, 81(3), M715-718. doi:10.1111/1750-3841.13223
- Sutton, J. A. F., Carnell, O. T., Lafage, L., Gray, J., Biboy, J., Gibson, J. F., . . . Foster, S. J. (2021). *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*, 17(3), e1009468. doi:10.1371/journal.ppat.1009468
- Tam, K., & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr*, 7(2). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018
- Teraguchi, K. O., S. Yasuda, K. Shin, Y. Fukuwatari, S. Shimamura. (1994). The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrin on intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 58, 482e487.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., & Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*, 74(12), 4137-4142. doi:S0022-0302(91)78608-6 [pii] 10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 603-661. doi:10.1128/cmr.00134-14

- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., . . . Fowler, V. G., Jr. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*, 17(4), 203-218. doi:10.1038/s41579-018-0147-4
- Valenti, P., Berlutti, F., Conte, M. P., Longhi, C., & Seganti, L. (2004). Lactoferrin functions: current status and perspectives. *J Clin Gastroenterol*, 38(6 Suppl), S127-129. doi:10.1097/01.mcg.0000128941.46881.33
- van der Kraan, M. I., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Bolscher, J. G., & Nieuw Amerongen, A. V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 25(2), 177-183. doi:10.1016/j.peptides.2003.12.006
- S0196978103004121 [pii]
- Vestergaard, M., Frees, D., & Ingmer, H. (2019). Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol Spectr*, 7(2). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018
- Visai, L., Yanagisawa, N., Josefsson, E., Tarkowski, A., Pezzali, I., Rooijackers, S. H. M., . . . Speziale, P. (2009). Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 3), 667-679. doi:10.1099/mic.0.025684-0
- Visansirikul, S., Kolodziej, S. A., & Demchenko, A. V. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Org Biomol Chem*, 18(5), 783-798. doi:10.1039/c9ob02546d
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(4), 580-596. doi:10.1080/10408398.2017.1381583
- Warrier, A., Satyamoorthy, K., & Murali, T. S. (2021). Quorum-sensing regulation of virulence factors in bacterial biofilm. *Future Microbiol*, 16, 1003-1021. doi:10.2217/fmb-2020-0301
- Xu, G., Xiong, W., Hu, Q., Zuo, P., Shao, B., Lan, F., Xiong, S. (2010). Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*, 109(4), 1311-1318. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04751.x
- Yamasaki, O., Sugihara, S., Kajita, A., Yokoyama, E., Miyake, T., Hirai, Y., & Morizane, S. (2021). Staphylococcal enterotoxin B- and lipopolysaccharide-induced toxic shock syndrome in a burn patient. *J Dermatol*, 48(4), 547-550. doi:10.1111/1346-8138.15729
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci*, 20(14). doi:10.3390/ijms20143423
- Zapotoczna, M., Jevnikar, Z., Miajlovic, H., Kos, J., & Foster, T. J. (2013). Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cell Microbiol*, 15(6), 1026-1041. doi:10.1111/cmi.12097
- Zhang, X., Hu, X., & Rao, X. (2017). Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. *Microbiol Res*, 205, 19-24. doi:10.1016/j.micres.2017.08.006
- Zheng, Y., Chen, P., Guo, X., Ma, J., & Li, G. (2010). [New function of lactoferrin: protection against cancer development and metastasis]. *J Cent South Univ*, 37(12), 1284-1289. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.12.019
- Zong, Y., Xu, Y., Liang, X., Keene, D. R., Höök, A., Gurusiddappa, S., Narayana, S. V. (2005). A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *Embo j*, 24(24), 4224-4236. doi:10.1038/sj.emboj.7600888

XII ANEXOS

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico
Apo-LF. Apo lactoferrina
ATCC. American Type Culture Collection
bLF. Lactoferrina bovina
CONACyT. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CO₂. Dióxido de Carbono
DMEM. Medio Dulbecco's Eagle modificado
EUA. Estados Unidos de América
et al. Y colaboradores
Fe. Hierro
FITC. Isotiocianato de Fluoresceína
g. Gramos
g. Gravedades
h. Horas
hLF. Lactoferrina humana
Holo-LF. Holo Lactoferrina
IP. Ioduro de propidiO
kDa. Kilo Daltons
L. Litros
LF. Lactoferrina
LFampina. Lactoferrampina (Fragmento 265-284)
LFcina. Lactoferricina(fragmento 17-30)
LPS. Lipopolisacarido
LFquimera. Lactoferrina quimera
M. Molar
mM. miliMolar
μM. microMolar
mg. Miligramos
min. Minutos
mL. Mililitros

MRSA. *Staphylococcus aureus* metilcilina resistente

PBS. Phosphate buffered saline

pH. Potencial de hidrógeno

S. aureus. Staphylococcus aureus

s. Segundos

UFC. Unidades formadoras de colonias

USA. The United States of America

WHO. World Health Organization

°C. Grados centigrados

μL. Microlitro

μm. Micrómetro

%. Porcentaje