

LA POLIVALENCIA DE SECUENCIAS DERIVADAS DE LA LfcinB POTENCIA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Vargas Yerly^{1*}, Leal Aura Lucía ², García Javier¹, Rivera Zuly¹

1. Facultad de Ciencias, 2. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Resumen- Abstrac:

El uso indiscriminado de antibióticos convencionales ha ocasionado que los microorganismos desarrollen mecanismos de defensa, generando resistencia y causando un gran problema de salud pública. En este trabajo, se evaluó la actividad antibacteriana de once péptidos sintéticos derivados de Lactoferricina Bovina (LfcinB) contra las cepas, *E. coli* ATCC 43827, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. faecalis* ATCC 29212. Las moléculas evaluadas fueron péptidos lineales, diméricos y tetraméricos que contienen las secuencias LfcinB (20-25): ²⁰RRWQWR²⁵, LfcinB (20-30): ²⁰RRWQWRMKKLG³⁰, LfcinB (20-25)_{pal}: RWQWRWQWR y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) ¹⁷FKARRWQWRMKKLGA³¹. Los péptidos: dimérico, LfcinB (20-30)₂ y tetraméricos, LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (20-30)₄ presentaron la mayor actividad antibacteriana contra las cepas evaluadas. Los péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (20-30)₄ presentaron actividad bactericida a las 48 horas y efecto sinérgico con Ciprofloxacino o Vancomicina contra las cepas de, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. faecalis* ATCC 29212. Los resultados obtenidos sugieren que la polivalencia de las secuencias derivadas de LfcinB que contienen el motivo RRWQWR, potencian la actividad antibacteriana. La polivalencia de secuencias lineales con actividad antibacteriana puede ser considerada como una estrategia novedosa y viable para la obtención de moléculas promisorias para el desarrollo de agentes terapéuticos antibacterianos.

Palabras Clave: Lactoferricina bovina, péptidos sintéticos, polivalencia, actividad antibacteriana.

Introducción

La resistencia antimicrobiana (RA) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y ocurre principalmente por el uso indiscriminado de antibióticos [1]. Una forma novedosa y viable para mitigar esta grave situación, es el uso de Péptidos Antimicrobianos (PAMs) y entre ellos se encuentra a la LfcinB, un péptido presente en los mamíferos que posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [2-7]. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de péptidos monoméricos, diméricos y tetraméricos que contienen las secuencias RRWQWR, RRWQWRMKKLG, RWQWRWQWR y FKARRWQWRMKKLGA, derivadas de LfcinB, frente a *E. coli* ATCC 43827, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Contexto problemático

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RA hace que un microorganismo sea resistente a los medicamentos a los cuales anteriormente era susceptible, esto, como consecuencia del uso indebido de fármacos en la agricultura, en los animales de consumo y a la fragilidad de los programas de salud.

La RA afecta el ámbito extrahospitalario, limita las opciones terapéuticas, incrementa el tiempo de permanencia en los hospitales, aumenta el costo del tratamiento, y en algunos casos causa la muerte [1,8].

En 2017 la OMS, emitió un informe de las bacterias para las cuales se necesita urgentemente nuevos antibióticos debido al alto número de casos de RA, encabezan la lista *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias *Enterobacteriaceae* (incluyendo *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*), seguido de *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, entre otras [9] y en enero de 2018, el nuevo Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana de la OMS (GLASS) reveló la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en 500.000 personas con sospecha de infecciones bacterianas en 22 países (de altos y bajos ingresos). Según esta información las bacterias resistentes notificadas con mayor frecuencia fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp, siendo los antibióticos más comprometidos penicilina y ciprofloxacino [10].

El incremento de las infecciones causadas por patógenos resistentes a fármacos representa un desafío para las terapias antimicrobianas habituales, debido al número limitado de tratamientos, similitud en el espectro de actividad y mecanismo de acción de los antibióticos [2]. En la actualidad se realizan esfuerzos para identificar y/o desarrollar nuevos agentes terapéuticos que superen esta problemática [11].

Justificación

Los PAMs, son oligopéptidos que hacen parte de la respuesta inmune innata, por lo cual, desempeñan un papel importante en la resolución de la mayoría de las infecciones causadas por virus, bacterias, parásitos y hongos [4, 12-13]. Presentan mecanismos de acción que generan menos resistencia que los fármacos convencionales, no producen reacciones adversas y son menos susceptibles a las proteasas del hospedero [14-15]. Hasta la fecha, más de 5.000 PAMs se han sintetizado [16]. Debido a lo anterior, son una fuente para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

La Lactoferricina (Lfcin) es un PAM que se genera por la hidrólisis de la Lactoferrina (LF) por la pepsina gástrica [12-13], la Lfcin ha sido descrita en varios mamíferos, como: humano, bovino, caprino, porcino, murino, entre otros, siendo la bovina (LfcinB) (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) el péptido con mayor actividad antimicrobiana. [7, 17-19]. Los péptidos sintéticos como fármacos presentan ventajas, como inocuidad, certeza de la composición de aminoácidos y permiten versatilidad en la forma de administración posibilitando mayor cobertura [20].

En este trabajo se realizó la evaluación antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB con diferentes arreglos estructurales y que contienen aminoácidos no naturales. Se evaluaron dímeros y tetrámeros de secuencias lineales que han presentado actividad antibacteriana, con el fin de establecer si estas formas de presentación pueden potenciar la actividad antibacteriana e identificar si estos péptidos pueden ser promisorios para el desarrollo de agentes terapéuticos.

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana, frente a bacterias Gram Positivas y Gram Negativas, de péptidos sintéticos diméricos y tetraméricos, que contienen secuencias derivadas de LfcinB.

Objetivos específicos

- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los péptidos sintéticos derivados de LfcinB, en *Escherichia coli* ATCC 43827 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Analizar la curva de letalidad para las cepas ATCC con los péptidos con menor Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.
- Establecer el efecto sinérgico entre los péptidos con mayor actividad antibacteriana en las cepas ATCC empleadas y antibióticos.

Referentes Teóricos

En los años 80 se inició el estudio de la actividad antimicrobiana de la LF, atribuyendo como mecanismos de acción la (i) captura de hierro, privando de este nutriente a las bacterias y (ii) perturbación de la permeabilidad de la membrana externa [3, 21-22]. Posteriormente con el estudio de la Lfcin, se evidenció que la actividad se debe a la interacción entre los residuos catiónicos del péptido y moléculas cargadas negativamente en la membrana citoplasmática (como ácido teicóico y lipopolisacáridos), lo cual afecta su integridad estructural [23-24]. Adicionalmente también se ha establecido que la LfcinB internaliza la célula e interactúa con el ADN [25].

Se ha evidenciado que LfcinB presenta mayor actividad que la proteína nativa, obteniendo CMI's que van desde 0,007 mg/mL a >50 mg/mL con LFB y CMI's de 1,6 µg/mL y 0,8 µg/mL con LfcinB contra bacterias Gram positivas y Gram Negativas [26-27]. También se ha reportado que péptidos cortos derivados de LfcinB, que pueden o no tener modificaciones en su secuencia, exhiben aún mayor actividad que LFB y LfcinB [28]. El grupo de investigación, "Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)" ha diseñado y sintetizado péptidos cortos derivados de la LfcinB, con el fin de identificar secuencias con mayor actividad que la LF y que la LfcinB. En este contexto se han identificado algunas secuencias promisorias, como los péptidos RWQWRWQWR, FKRRWQWRMCKLGA y RRWQWRMCKLGA, los péptidos diméricos y tetraméricos que contienen el motivo ²⁰RRWQWR²⁵, entre otros [16, 20,29]. Es importante resaltar que estos estudios mostraron que los péptidos diméricos y tetraméricos que contienen el motivo ²⁰RRWQWR²⁵ presentaron mayor actividad antibacteriana que la forma monomérica [16,29]. Este estudio pretende evaluar si este comportamiento se presenta con otras secuencias lineales derivadas de la LfcinB que han presentado actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas. Por lo que se evaluaron péptidos lineales, diméricos y tetraméricos derivados de las secuencias RWQWRWQWR,

FKCRRWQWRMKKLGA y RRWQWRMKKLG, contra cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Materiales

Agar Triptona de Soya (TSA), agar y caldo Mueller Hinton (MH), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Agua peptonada, todos marca OXOID, Agua destilada estéril, ciprofloxacino, vancomicina, asa curva metálica, cajas de Petri NEST, Placas de Test 96 Pozos Fondo Plano, TC Estéril –NEST, Filtros Nylon Acrodisc 0,2 µm.

Métodos

Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida

Se realizó siguiendo el método de microdilución en caldo (CLSI) [30]. En una caja multipozos se adicionaron 90 µL de caldo MH y 90 µL del péptido (200-6,2 µg/mL). Después, se agregó 10 µL del inóculo bacteriano (5×10^5 UFC/mL) y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente para la CMB se sembró en agar MH las diluciones donde no se presentó crecimiento.

Curvas de letalidad

Se realizaron según el protocolo CLSI, con algunas modificaciones [31]. En una caja multipozos se agregaron 270 µL de solución de péptido (0,5 CMI, CMI, 2 CMI y 4 CMI) en caldo MH. Luego se agregaron 30 µL del inóculo (5×10^5 UFC/mL). Las muestras se incubaron por 48 h y la absorbancia se midió cada hora en un equipo Bioscreen C a 600 nm.

Ensayo de sinergia

Se realizó de acuerdo con el método de ajedrez [32-33]. 25 µL de péptido y 25 µL de antibiótico fueron mezcladas (0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1 y 2 veces la CMI), con el inóculo (5×10^5 UFC/mL), luego se incubó a 37 °C durante 24 h. La interpretación se realizó con la siguiente formula: [(A)/CMI A] + [(P)/CMI P] = CIF A + CIF P = Índice CIF.

Resultados

Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida

Tabla 1. CMI y CMB de los péptidos derivados de LfcinB contra las cepas ATCC

Código del péptido	CMI/CMB µg/mL (µM)		
	<i>E. coli</i> ATCC 43827	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
LfcinB (20-25)	100(102)/200(203)	200(203)/>200(>203)	>200(>203)/>200(>203)
LfcinB (20-25) ₂	25(11)/200(91)	50(23)//200(91)	200(91)/>200(>91)
LfcinB (20-25) ₄	25(5)/200(44)	50(11)/100(22)	200(44)/>200(>44)
LfcinB (20-25) _{pal}	25(17)/100(67)	100(67)/200(135)	100(67)/100(67)
LfcinB (20-25) _{pal2}	200(63)/>200(>63)	200(63)/>200(>63)	100(31)/>200(>63)
LfcinB (20-25) _{pal4}	>200(>30)/>200(>30)	>200(>30)/>200(>30)	>200(>30)/>200(>30)

LfcinB (20-30)	100(65)/200(130)	200(130)/>200(>130)	>200(>130)/>200(>130)
LfcinB (20-30) ₂	25(8)/50(15)	50(15)/100(30)	200(60)/200(60)
LfcinB (20-30) ₄	50(7)/100(15)	100(15)/200(30)	200(30)/200(30)
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31)	200(102)/>200(>102)	200(102)/>200(>102)	>200(>102)/>200(>102)
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) ₂	50(12)/100(24)	200(48)/200(48)	200(48)/>200(>48)

En negrita se encuentran los péptidos que presentaron la mayor actividad antibacteriana por familia contra cada cepa.

Curvas de letalidad

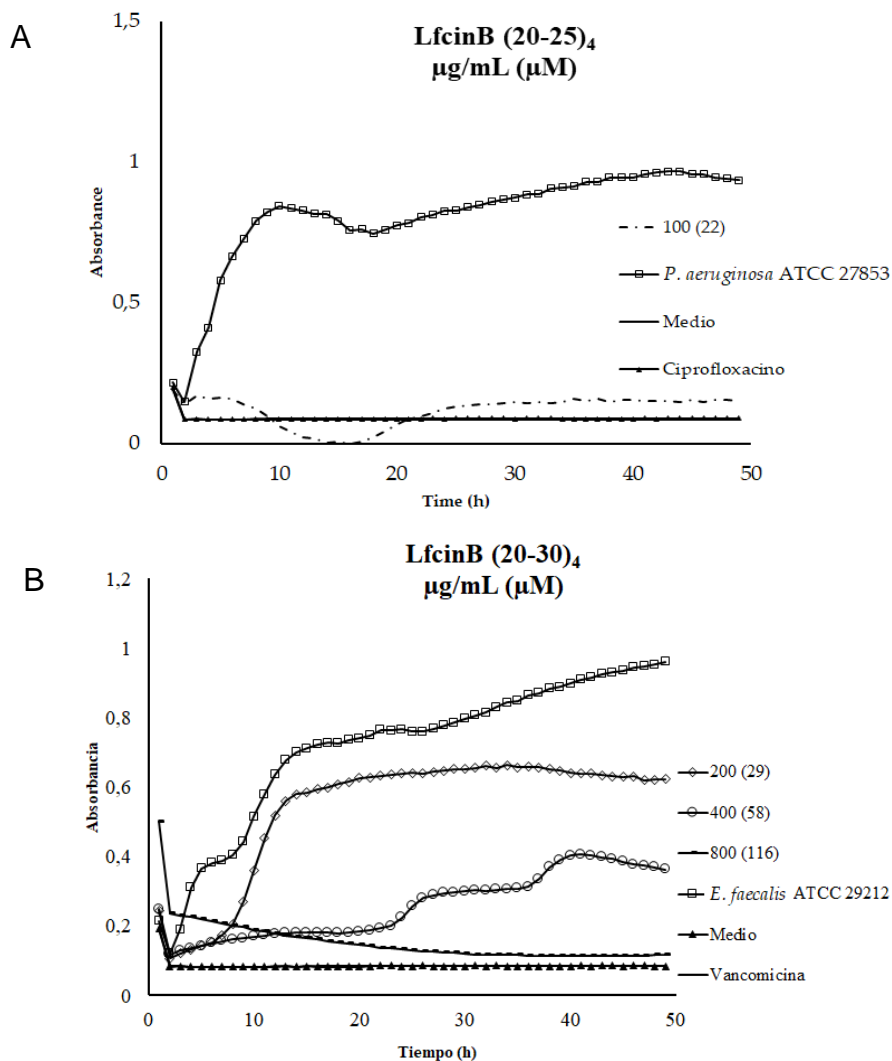


Figura 1. Curva de letalidad: (A) Péptido LfcinB (20-25)₄ contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, (B) péptido LfcinB (20-30)₄ contra *E. faecalis* ATCC 29212

Efecto sinérgico

Tabla 2. Efecto sinérgico entre péptidos derivados de LfcinB y antibióticos

Bacteria Antibiótico - péptido	CMIA µg/mL	CMIP µg/mL	A µg/mL	P µg/mL	FIC INDICE
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Ciprofloxacino - LfcinB (20-25) ₄	0,4	100	0,02	3,1	0,09
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 Vancomicina - LfcinB (20-30) ₄	6,4	400	0,2	12,5	0,06

CMIA y CMIP: Concentración Mínima inhibitoria del antibiótico y del péptido individualmente.

A y P: Concentración Mínima inhibitoria del antibiótico y el péptido juntos.

Los resultados muestran que hay efecto sinérgico entre los péptidos tetraméricos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (20-30)₄ con Ciprofloxacino y Vancomicina.

Discusión

Secuencias cortas derivadas de LfcinB se han evaluado en bacterias Gram negativas y Gram positivas, como los péptidos LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-25)_{pal}, [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂, los tres primeros han presentado alta actividad tanto en cepas ATCC como en aislados clínicos, sugiriendo un alto potencial como fármacos [20, 34-36]. Los resultados obtenidos para *E. faecalis* ATCC 29212 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, coinciden con estos estudios anteriores y además se corroboró que la polivalencia de la secuencia RRWQWR, aumentó notablemente la actividad antibacteriana. Lo mismo ocurrió con las familias de las secuencias, [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) y LfcinB (20-30). Es importante resaltar que hasta el momento no hay reportes en la literatura de la actividad antibacteriana de los péptidos diméricos y tetraméricos que contienen la secuencia LfcinB (20-30). El incremento de la actividad antibacteriana observado para las formas diméricas y tetraméricas está de acuerdo con el mecanismo de acción propuesto para la LfcinB. El péptido monomérico que contiene la secuencia palindrómica LfcinB (20-25)_{pal}, presentó mayor actividad antibacteriana que los péptidos análogos diméricos y tetraméricos, lo que sugiere que para esta secuencia el mecanismo de acción puede ser diferente.

Otro aporte de este estudio es que se evidenció, que los péptidos estudiados, tienen mayor actividad para las cepas de *E. coli* sugiriendo que estos péptidos pueden ser considerados para el desarrollo de agentes terapéuticos contra infecciones causadas por *E. coli*.

El péptido LfcinB (20-25)₄, presentó inhibición total del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 durante 48h, a una concentración de 100 µg/mL (22 µM), lo que está de acuerdo con el valor de la CMB obtenida por el método de microdilución en caldo. A las otras concentraciones evaluadas (50 µg/mL (11 µM) y 25 µg/mL (6 µM)) no se presentó inhibición del crecimiento. El péptido LfcinB (20-30)₄, presentó inhibición

del crecimiento bacteriano en concentraciones entre 200 µg/mL (29 µM) (CMI) y 400 µg/mL (58 µM) y efecto bactericida a 800 µg/mL (116 µM) contra *E. faecalis* ATCC 29212.

La LF presenta actividad antibacteriana, pero estudios previos han evaluado esta proteína en presencia de antibióticos, como Rifampicina y Gentamicina observando efectos sinérgicos, donde se mejora la actividad antibacteriana hasta 16 veces. En forma similar la LfcinB ha presentado sinergismo con Ciprofloxacino, Ceftazidime o Gentamicina [37-38]. Los resultados de los ensayos de sinergia obtenidos están en concordancia con estos estudios. Esto podría deberse a que algunos PAMs inducen perturbación de la membrana y formación de poros sobre la pared celular bacteriana, lo cual facilitaría la entrada de los antibióticos a la célula [39]. Los resultados indican que estos péptidos polivalentes derivados de LfcinB, podrían ser usados para potenciar tratamientos con antibióticos convencionales, especialmente en el caso de bacterias resistentes.

Conclusiones

La polivalencia incrementó la actividad antibacteriana en las secuencias ²⁰RRWQWR²⁵, ²⁰RRWQWRMKKLG³⁰ y ¹⁷FKARRWQWRMKKLGA³¹, observándose la mayor actividad antibacteriana con los péptidos: dimérico, LfcinB (20-30)₂ y tetraméricos, LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (20-30)₄ en las cepas *E. coli* ATCC 43827, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. faecalis* ATCC 29212.

El péptido palindrómico: RWQWRWQWR, exhibió mayor actividad antibacteriana comparada con sus análogos dimérico y tetramérico, comportamiento contrario para las otras secuencias evaluadas.

Los péptidos tetraméricos LfcinB (20-25)₄ (contra *P. aeruginosa* ATCC 27853) y LfcinB (20-30)₄ (contra *E. faecalis* ATCC 29212) presentaron efecto bactericida a las 48 horas.

Los péptidos LfcinB (20-25)₄ (contra *P. aeruginosa* ATCC 27853) y LfcinB (20-30)₄ (contra *E. faecalis* ATCC 29212) presentaron sinergismo en la actividad antibacteriana con los antibióticos ciprofloxacino y vancomicina lo que sugiere una posible aplicación terapéutica.

Este trabajo permitió identificar péptidos cortos monoméricos, diméricos y tetraméricos, como posibles candidatos para futuros estudios con el fin de desarrollar agentes terapéuticos contra infecciones bacterianas.

Referentes bibliográficos

1. OMS. 2016. *Media centre*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> Fecha de consulta: 16 de Junio de 2016.

2. Bahar, A. A., and Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
3. Conlon, J. M., Sonnevend, A. (2010). Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol. Biol*; 618, 3–14.
4. Radek, K., Gallo, R. (2007). Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 29, 27–43. doi: 10.1007/s00281-007-0064-5.
5. Peters, B.M., Shirtliff, M.E. and Jabra-Rizk, M.A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs?. *PLoS Pathog.* 6(10) e1001067.
6. Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa— Effector molecules of primitive phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 267–279. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00010-5
7. Vorland L. H., Ulvatne H. and Andersen J. (1998). Lactoferricin of Bovine Origin is More Active than Lactoferricins of Human, Murine and Caprine Origin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30(5), 513-517.
8. Organización Mundial De La Salud (2014) *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf Fecha de consulta: 16 de Junio de 2016.
9. OMS. 2017. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.* Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> Fecha de consulta: 16 de Junio de 2016.
10. OMS. 2018. *Se encuentran altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo, muestran nuevos datos.* Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/> Fecha de consulta: 14 de septiembre de 2018.
11. Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., and Björn, C. (2016). *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents.* *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, 6, 194. doi:10.3389 / fcimb.2016.00194.
12. Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389–395. doi: 10.1038/415389a.
13. Schaubert, J., Gallo, R.L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immuno.* 122, 261–266. doi: 10.1016/j.jaci.2008.03.027.
14. Afacan, N.J., Yeung, A. T.Y., Pena, O.M., and Hancock, R. E.W. (2012). Therapeutic Potential of Host Defense Peptides in Antibiotic-resistant Infections. *Current Pharmaceutical Design*, 18(6), 807-819. <http://dx.doi.org/10.2174/138161212799277617>.
15. Fjell, C., Hiss, J., Hancock, R., y Schneider, G. (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(2):168. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3591>.
16. Solarte, V., Rosas, J., Rivera, Z., Arango, M., García, J. and Vernet, J. (2015). A Tetrameric Peptide Derived from Bovine Lactoferricin Exhibits Specific Cytotoxic

- Effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma Cell Lines. *Biomed Research International*, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/630179>
17. Rana, M., Chatterjee, S., Kochhar, S. and Pereira, BMJ. (2006). Antimicrobial peptides: a new dawn for regulating fertility and reproductive tract infections. *J Endocrinol Reprod.*, 10, 88 -95.
 18. Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
 19. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl J. T. and Ellison, R. T. (1993) Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-Derived Lactoferrin Peptide Fragment. *Infection and Immunity*, 719-728.
 20. León, M., Leal, A., Almanzar, G., Rosas, J., García, J., and Rivera, Z. (2015). Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Research International*, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/453826>
 21. Arnold, R. R., Russell, J. E., Devine, S. M., Adamson M. and Pruitt K. M. (1983). Antimicrobial Activity of the Secretory Innate Defense Factors Lactoferrin, Lactoperoxidase and Lysozyme1. *Cariology Today. International Congress in Sur.* 75-88, DOI:10.1159/000408726.
 22. Rainard, P. (1986). Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Veterinary microbiology*, 11(4), 387-392
 23. Farnaud, S. and Evans, R. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40(7), 5-405. [http://dx.doi.org/10.1016/s0161-5890\(03\)00152-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0161-5890(03)00152-4).
 24. Baker, H.M., Anderson, B.F., Kidd, RD., Shewry, S.C., and Baker, E.N. (2000) Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting function. In *Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Elsevier Science*, 3–15.
 25. Haukland, H., Ulvatne, H., Sandvik, K., and Vorland, L. (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Letters*, 508(3), 389-393. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03100-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03100-3)
 26. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl J. T. and Ellison, R. T. (1993) Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-Derived Lactoferrin Peptide Fragment. *Infection and Immunity*, 719-728.
 27. Lee, N., Kawai, K., Nakamura, I., Tanaka, T., Kumura, H. and Shimazaki, K. (2004). Susceptibilities against Bovine Lactoferrin with Microorganisms Isolated from Mastitic Milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(10), 1267-1269.
 28. Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, Teraguchi S, Takase M, Hayasawa H, (1999). N-Acylated and d Enantiomer Derivatives of a Nonamer Core Peptide of Lactoferricin B Showing Improved Antimicrobial Activity. *Agentes Antimicrob Chemother.* 43 (5) : 1267-1269
 29. Huertas Méndez, N., Vargas Casanova, Y., Gómez Chimbi, A., Hernández, E., Leal Castro, A., and Melo Diaz, J. et al. (2017). Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia*

- ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*, 22(3), 452.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules22030452>
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012.) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-783-9 [Print]; ISBN 1-56238-784-7 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA,
 31. NCCLS. (1999) *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*. NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA,.
 32. SEIMC. (2017). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [online]. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia12.pdf>. Fecha de consulta: 12 Septiembre de 2017.
 33. Sanchez-Gomez, S., Japelj, B., Jerala, R., Moriyon, I., Fernandez Alonso, M., Leiva, J., Blondelle, S., Andra, J., Brandenburg, K., Lohner, K. and Martinez de Tejada, G. (2010). Structural Features Governing the Activity of Lactoferricin-Derived Peptides That Act in Synergy with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), pp.218-228.
 34. Gopal, S. H., Das, S. K. (2016). Role of Lactoferrin in the Carcinogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer Clinical Trials*, 1(3), e105.
 35. Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. and Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), pp.109-112.
 36. Vega, S., Martínez, D., Chalá, M., Vargas, H. and Rosas, J. (2018). Design, Synthesis and Evaluation of Branched RRWQWR-Based Peptides as Antibacterial Agents Against Clinically Relevant Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9
 37. Qamruddin, A., Alkawash, M. and Soothill, J. (2005). Antibiotic Susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* in the Presence of Lactoferrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), pp.4425-4426.
 38. Wakabayashi, H., Teraguchi, S. And Tamura, Y. (2002). Increased Staphylococcus-killing Activity of an Antimicrobial Peptide, Lactoferricin B, with Minocycline and Monoacylglycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(10), pp.2161-2167.
 39. Nuding, S., Frasch, T., Schaller, M., Stange, E. F., & Zabel, L. T. (2014). Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides and Antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5719–5725.
<http://doi.org/10.1128/AAC.0254>

* Dirección: Carrera 45 No 26-85-Departamento de Química-Laboratorio 334, Bogotá D.C. Colombia. celular: 3203020066, correo: yvargasc@unal.edu.co