

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Libardo Andrés Suárez Largo

Trabajo de Grado para Optar el título de Maestría en Microbiología

Director

Nelson Uribe Delgado

Doctor en Ciencias de la Salud Humana

Codirector

William Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2021

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

A mis padres por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

*A Johanna por tu apoyo incondicional y no dejarme
flaquear en mis momentos de duda y debilidad.*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Agradecimientos

Al Profesor Nelson por todos sus consejos, su confianza, su paciencia infinita y apoyo incondicional en este proceso.

Al Profesor William por su guía y conocimiento en cada momento y su motivación para realizar este trabajo.

Al Grupo de investigación GIBIM y especialmente a la profesora Claudia por permitir la ejecución de este proyecto.

A Marlon, Jennifer y Yuly Andrea por sus consejos, por el mutuo apoyo brindado en el laboratorio y por qué ni un incendio, ni una pandemia nos quitó la pasión por la investigación.

A Camila y Alejandra por acompañarme en esas noches de escritura.

A todos los compañeros de Laboratorio por su apoyo.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

tabla de contenido

Introducción.....	12
1. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	15
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo general	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Marco teórico y estado del arte.....	19
3.1 Resistencia antimicrobiana	19
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (sarm)	24
3.3 Péptidos antimicrobianos.....	26
3.4 Secreción mucosa de <i>achatina fulica</i> como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos.	31
4. Metodología.....	36
4.1 Obtención de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de <i>a. Fulica</i>	36
4.1.1 Obtención de la secreción mucosa.....	36
4.1.2 Cuantificación de proteínas.	39
4.1.3 Electroforesis	40
4.1.4 Obtención de las fracciones de la secreción mucosa.	40
4.2 Espectrometría de masas	43
4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la secreción y sus fracciones.....	43
4.4 Análisis estadístico.	45
5. Resultados y discusión.....	46
5.1 Homogenización de la secreción mucosa de <i>achatina fulica</i>	46

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

5.2 Purificación y obtención de fracciones de la secreción mucosa.....	47
5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la secreción mucosa y sus fracciones.	54
6. Conclusiones.....	66
7. Recomendaciones	67
Referencias bibliográficas	68
Apéndices	76

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Lista de Tablas**

Tabla 1. Bacterias resistentes con mayor prioridad para la investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos.	23
Tabla 2. Clasificación de PAMs según su estructura secundaria y su composición.	30
Tabla 3 Zonas donde se realizó la captura de los especímenes de <i>A. fulica</i>	37
Tabla 4 Evaluación del solvente, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de extracción de proteínas recuperadas de la secreción mucosa de <i>A. fulica</i>	46
Tabla 5 Porcentaje de inhibición de la secreción mucosa contra SARM desde los diferentes puntos de recolección.	56
Tabla 6 Porcentaje de inhibición de la secreción mucosa homogenizada contra a SARM a diferentes concentraciones.....	57
Tabla 7 Porcentaje de inhibición de las fracciones purificadas por RP-HPLC frente a SARM..	58
Tabla 8 Actividad antimicrobiana de las fracciones recuperadas por HPLC frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	59

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Lista de Figuras**

Figura 1 Número de antimicrobianos aprobados desde 1930 hasta 2012 según datos de la FDA	19
Figura 2 Transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias.....	21
Figura 3 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	22
Figura 4 Interacción entre los PAMs y las membranas bacterianas	27
Figura 5 Mecanismo de acción de los PAMs sobre las membranas bacterianas.....	30
Figura 6: a. <i>Achatina fulica</i> ; b. Se indica la forma correcta para realizar la medición de la concha del caracol.....	37
Figura 7 Obtención de la secreción mucosa de <i>Achatina fulica</i>	38
Figura 8 Evaluación por electroforesis SDS-PAGE del material proteico aislado por cada método de homogenización	47
Figura 9 Perfil electroforético del primer ensayo de fraccionamiento con Sephadex.....	49
Figura 10 Evaluación comparativa por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas/péptidos por cada método de extracción	50
Figura 11 Cromatograma de RP-HPLC con los con los tiempos de retención de las cinco fracciones separadas de la secreción mucosa purificada con Sephadex G-25.	51
Figura 12 Perfil electroforético de las fracciones recuperadas por RP-HPLC.....	52
Figura 13 Espectros de masas MALDI-TOF de las fracciones recuperadas por RP-HPLC.....	53
Figura 14 Ensayo de cinética de crecimiento, efecto antimicrobiano de los extractos purificados con Sephadex G-25 Frente a SARM.	58

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Figura 15 Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 01 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.	59
Figura 16 Ensayo de cinética de crecimiento, efecto antimicrobiano de la fracción 02 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.	60
Figura 17 Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 03 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.	63
Figura 18 Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 04 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.	64
Figura 19 Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 05 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.	64

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Lista de Apéndices**

Apéndice A. Protocolo para la obtención, homogenización y purificación de la secreción mucosa de <i>Achatina fulica</i>	76
Apéndice B. Protocolo para la obtención de fracciones la secreción mucosa de <i>Achatina fulica</i> por HPLC.....	83
Apéndice C. Protocolo para evaluar actividad antimicrobiana de la secreción mucosa y sus fracciones.....	88
Apéndice D. Ensayos de purificación de la secreción mucosa mediante cromatografía de exclusión de tamaño.	91
Apéndice E. Cinética de crecimiento de diferentes microorganismos tratados con la Secreción mucosa homogenizada.....	94

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Resumen**

Título: Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina*

Autor: Libardo Andrés Suarez Largo**

Palabras clave: Purificación de fracciones proteicas, *Achatina fulica*, Secreción mucosa, actividad antimicrobiana.

Descripción: *Achatina fulica*, conocido como caracol gigante africano, es considerado una plaga y un riesgo para el ambiente y la salud humana, pero la secreción mucosa representa un importante potencial biológico antimicrobiano. El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones bioactivas semi-purificadas de la secreción mucosa de *A. fulica* y evaluar su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM). Se utilizó la metodología reportada por *Zhong et al.* con algunas modificaciones, la secreción mucosa se homogenizó con PBS e inhibidores de proteasas (EDTA; PMSF y Ortovanadato de sodio) que, posteriormente, fue sometida a una separación inicial con Sephadex G-25. A continuación, el extracto biológico fue fraccionado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas frente a SARM, mediante la técnica de microdilución en caldo CLSI-M07-A10-2015 con algunas modificaciones. Se recolectaron un total de cinco fracciones mayoritarias (F01-F05) por HPLC. De las cinco fracciones evaluadas, la fracción F01 fue la que presentó el mayor efecto antimicrobiano frente a SARM, con un porcentaje de inhibición del $65.06 \pm 3.07\%$ y una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 628.6 $\mu\text{g/mL}$. Estudios adicionales están en progreso para lograr identificar y caracterizar las moléculas biológicas responsables de la actividad antimicrobiana reportada en el presente estudio. En general, los resultados obtenidos demuestran el potencial biológico que puede derivarse de la secreción mucosa de *A. fulica*, con el fin de contribuir en la búsqueda de nuevas moléculas naturales con propiedades biológicas frente a microorganismos resistentes a antibióticos convencionales de interés clínico.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: Nelson Uribe Delgado. Doctor en Ciencias de la Salud. Codirector: William Hidalgo. Doctor en Química

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Abstract**

Title: Evaluation of the antimicrobial activity of isolated semi-purified fractions of the mucous secretion of *Achatina fulica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**

Author: Libardo Andrés Suarez Largo¹

Key Words: Purification of protein fractions, *Achatina fulica*, Mucous secretion, antimicrobial activity.

Description: *Achatina fulica*, known as the giant African snail, is considered a pest and a risk to the environment and human health, but the mucous secretion represents an important antimicrobial biological potential. The objective of this work was to obtain semi-purified bioactive fractions from the mucous secretion of *A. fulica* and to evaluate its antimicrobial activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The methodology reported by *Zhong et al.* with some modifications, the mucous secretion was homogenized with PBS and protease inhibitors (EDTA; PMSF and sodium orthovanadate) which was subsequently subjected to an initial separation with Sephadex G-25. The biological extract was then fractionated using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The antimicrobial activity of the fractions obtained against MRSA was evaluated using the CLSI-M07-A10-2015 broth microdilution technique with some modifications. A total of five fractions (F01-F05) were collected by HPLC. Of the five fractions evaluated, the F01 fraction was the one that presented the greatest antimicrobial effect against MRSA, with an inhibition percentage of $65.06 \pm 3.07\%$ and an inhibitory concentration of 50 (IC₅₀) of 628.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Additional studies are in progress to identify and characterize the biological molecules responsible for the antimicrobial activity reported in the present study. In general, the results showed the biological potential that can be derived from the mucous secretion of *A. fulica*, in order to contribute to the search for new natural molecules with biological properties against microorganisms resistant to conventional antibiotics of clinical interest.

* Degree Work

¹ Faculty of Health. School of Microbiology. Director: Nelson Uribe Delgado. PhD in Health Sciences. Co-director: William Hidalgo. PhD in Chemistry

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Introducción

El problema de la resistencia a los antibióticos por parte de una gran variedad de microorganismos ha llegado a niveles críticos, tanto, que ya se considera un problema de salud pública (OMS, 2014). El aislamiento de nuevas cepas resistentes ocurre a una velocidad mayor que el hallazgo de alternativas para resolver este problema (Talbot et al., 2006). Esto trae consigo graves problemas para la salud humana que puede llegar hasta la pérdida de la vida (Labarca & Araos, 2009), y adicionalmente altos costos tanto para los sistemas de salud, como para los pacientes (Boucher et al., 2009).

Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*) emitió un boletín sobre los patógenos multirresistentes, entre los cuales *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) destaca por ser uno de los más ampliamente identificados y presentar resistencia a una gran variedad de antibióticos (Frieden, 2019; OMS, 2017).

Por ello, en varios países se han empezado a tomar medidas para evitar que sigan aumentando los casos de resistencia antimicrobiana, como realizar campañas de concientización y restricciones en la venta de estos fármacos (Cires Pujol, 2002). Estas medidas son de gran utilidad, pero no contribuyen a solucionar el estado actual del problema, por esto se hace necesario encontrar nuevas alternativas farmacéuticas para esta situación (Castañeda Casimiro et al., 2009; Suarez et al., 2006).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

En la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para enfrentar este problema, los péptidos antimicrobianos (PAMs) toman gran importancia debido a su amplio espectro de acción y baja toxicidad en células eucariotas. Los PAMs se pueden encontrar en todos los seres vivos y tienen un rol importante en la defensa de diferentes patógenos, adicionalmente funcionan como inmunomoduladores, en la respuesta inflamatoria y la cicatrización (Xia et al., 2018).

Se ha investigado una amplia variedad de organismos como productores de PAMs, reconociendo en estas moléculas su potencial biológico. En los moluscos, especialmente los acuáticos, se han logrado caracterizar una gran diversidad de estas moléculas. No obstante, las investigaciones realizadas sobre moluscos terrestres son escasas (Gauri et al., 2011; Sperstad et al., 2011).

Entre los moluscos de tierra se encuentra *Achatina fulica*, el cual es un caracol terrestre de gran tamaño. Es considerado una de las especies invasoras más dañinas del planeta debido a su dieta polífaga, su resistencia a cambios ambientales y su alta tasa de reproducción (Raut & Barker, 2002). La introducción de esta especie a nuevas áreas se relaciona principalmente con la intervención humana, debido a que tradicionalmente se le asocian diferentes propiedades medicinales y alimentarias (Instituto Colombiano Agropecuario, 2015).

En los estudios realizados con este caracol, se encontró que la secreción mucosa posee diferentes propiedades, entre ellas, actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans* y efectos antitumorales y

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

cicatrizantes (Ghosh et al., 2010; Iguchi et al., 1982; Kanzawa et al., 2004; Kubota et al., 1985; Raut & Barker, 2002; Zhong et al., 2013).

Dada la importancia e impacto biológico que podría explorarse de la secreción mucosa de *A. fulica*, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas, frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, de las fracciones semi-purificadas obtenidas de la secreción mucosa de *Achatina fulica*.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

1. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

Un problema que ha alcanzado niveles críticos en el área de la salud humana y veterinaria es el aumento de la resistencia a una gran variedad de antibióticos por parte de los microorganismos (Boucher et al., 2009). Esta situación ha alcanzado un punto alarmante debido a la pérdida de efectividad de los esquemas terapéuticos, llevando a desenlaces graves e incluso fatales (Labarca & Araos, 2009; OMS, 2014).

Para el año 2007, el número aprobado de nuevos antimicrobianos fue menor comparado con periodos anteriores (Boucher et al., 2009); esto se debe a varios factores, entre los que se resalta que las investigaciones en este campo se han enfocado en la modificación de la estructura química de los antimicrobianos existentes o la implementación de terapias usando varios de ellos (Rivas & Andreu, 2003). De otro lado, el interés de las farmacéuticas por la investigación de nuevos antimicrobianos es bajo, ya que estos estudios conllevan altos costos y la retribución económica no está garantizada debido al control que ejercen los entes gubernamentales en la obtención y venta de estos fármacos y los cortos periodos de uso durante el tratamiento; en contraste las enfermedades crónicas son una alternativa de inversión más atractiva (Labarca & Araos, 2009; Talbot et al., 2006).

La magnitud total del impacto de la resistencia antimicrobiana sobre la salud humana y veterinaria y los costos en el sector salud siguen siendo desconocidos. En un informe elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el tema, se estimó que en Estados Unidos

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

se invierte anualmente al sistema de salud entre 21 y 34 mil millones de dólares (OMS, 2014). En otros estudios se estima que para el año 2050, las pérdidas anuales acumuladas oscilarán entre 2.1 y 124.5 billones de dólares del Producto Interno Bruto Mundial (Taylor et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo mencionado en párrafos anteriores, se requiere urgentemente encontrar alternativas terapéuticas, y en especial provenientes de fuentes naturales, con las cuales se puedan tratar aquellas infecciones que con el espectro actual de antimicrobianos son difíciles de combatir.

Las características “ideales” de un antibiótico tienen que ver con no inducir resistencia a los microorganismos o hacerlo de manera poco frecuente, poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana y ser inocuos para el ser humano (Rivas & Andreu, 2003). Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) cumplen con estas particularidades y su presencia se ha evidenciado en casi todos los seres vivos (Téllez & Castaño, 2010).

En el estudio de PAMs, los invertebrados marinos toman gran importancia, ya que en ellos se han identificado alrededor de 40 familias de péptidos, seis de las cuales se identificaron en moluscos de mar (Sperstad et al., 2011). Por el contrario, la información sobre este tema en moluscos de tierra es escasa. Algunos estudios dirigidos a caracterizar la secreción mucosa de *A. fulica* han demostrado que ésta tiene propiedades antimicrobianas (Iguchi et al., 1982; Kubota et al., 1985; Mafranenda et al., 2014; Pereira et al., 2016; Zhong et al., 2013).

En los estudios realizados sobre la secreción mucosa, un punto que llama la atención es la gran variedad de metodologías implementadas para la purificación y el aislamiento de los componentes

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

de esta, así como diferentes técnicas para evaluar su actividad biológica antimicrobiana, debido a esto se observa bastante variedad de resultados en cada publicación (E-Kobon et al., 2016; Iguchi et al., 1982; Mafranenda dn et al., 2014; Tempone, 2007; Zhong et al., 2013).

Con base en lo expuesto anteriormente, la pregunta de investigación propuesta fue: ¿Las fracciones semi-purificadas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* exhiben actividad biológica antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina?

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones semi-purificadas obtenidas a partir de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtener fracciones semi-purificadas a partir de la secreción mucosa de *A. fulica*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la secreción mucosa de *A. fulica* y sus fracciones frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

3. Marco teórico y estado del arte

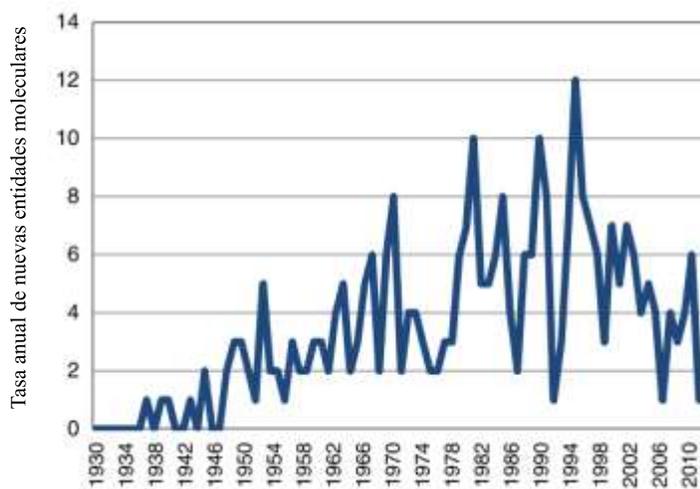
3.1 Resistencia antimicrobiana

El término antimicrobiano hace referencia a los medicamentos, usados para tratar infecciones causadas por diferentes microorganismos, que pueden ser letales o inhibir el crecimiento de estos. Pueden ser de origen natural, semi-sintético (poseen una estructura de origen natural que ha sido modificada químicamente en el laboratorio para mejorar su estabilidad o efectividad) o sintéticos, que son fármacos elaborados en su totalidad en el laboratorio (Smith et al., 2015).

Desde la amplia distribución de la penicilina en 1940 y por las siguientes dos décadas, se dieron grandes avances en el desarrollo de antibióticos, saliendo al mercado 20 nuevas clases de estos fármacos, favoreciendo la disminución de la morbilidad y mortalidad causadas por las infecciones. Sin embargo, desde 1962 se observó un estancamiento en la investigación de esta área (**Figura 1**); pero el uso de antimicrobianos se incrementó no solo en el área de la salud, sino en la agricultura y la industria alimentaria (Kinch et al., 2014; Lobanovska & Pilla, 2017).

Figura 1

Número de antimicrobianos aprobados desde 1930 hasta 2012 según datos de la FDA.



Nota: Modificado de *Kinch et al.* (2014)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

La resistencia es un proceso natural de la evolución microbiana, la cual puede ser intrínseca debido a modificaciones genéticas, o extrínseca por la transferencia de material genético entre microorganismos (Furuya & Lowy, 2006); esto último puede presentarse de tres maneras:

- Conjugación: Es un proceso durante el cual genes de resistencia se transfieren de una bacteria a otra por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular (Furuya & Lowy, 2006) (**Figura 2**).
- Transducción: Este fenómeno ocurre mediante un bacteriófago que es capaz de transferir un fragmento de ADN de una bacteria a otra y de esta manera otorgar diferentes características entre ellas resistencia a diferentes fármacos (Furuya & Lowy, 2006) (**Figura 2**).
- Transformación: Consiste en incorporación de material genético exógeno, el cual se encuentra en el medio circundante (Furuya & Lowy, 2006) (**Figura 2**).

Los microorganismos que poseen estos genes de resistencia pueden expresar diferentes mecanismos por medio de los cuales evaden la acción de los antimicrobianos, éstos se pueden agrupar en:

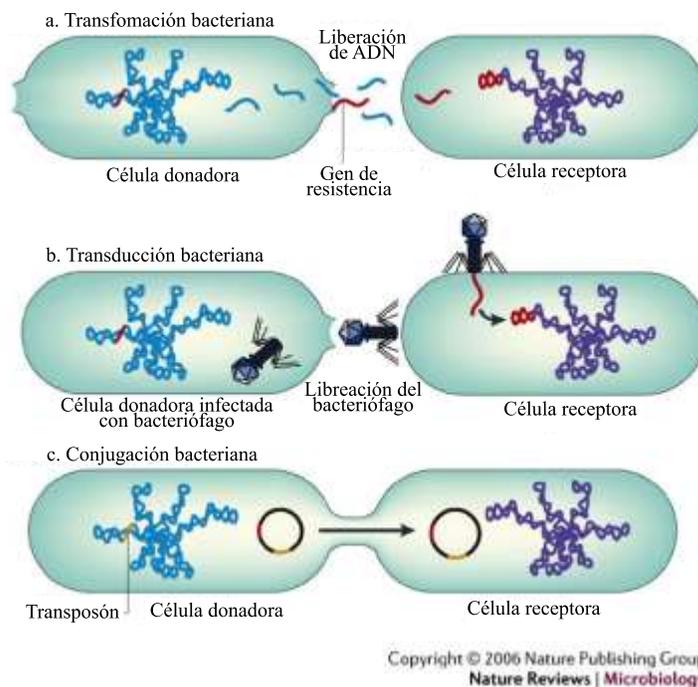
- Inactivación enzimática: Las bacterias sintetizan enzimas cuya función es crear cambios en la estructura de los compuestos antimicrobianos de tal manera que no logren ejercer su función (Moreno et al., 2009; Tafur et al., 2008) (**Figura 3**).
- Modificaciones en el sitio blanco: Los microorganismos generan cambios estructurales en el sitio de acción del antimicrobiano, de forma que se disminuye la afinidad de unión entre ambos (Moreno et al., 2009; Tafur et al., 2008) (**Figura 3**).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Disminución de la permeabilidad celular: Las bacterias generan cambios en sus estructuras a nivel de la membrana y la pared celular, principalmente en las porinas. Estas alteraciones restringen el paso de diferentes elementos, incluyendo los antibióticos (Moreno et al., 2009; Tafur et al., 2008) (**Figura 3**).
- Bombas de Eflujo: Toman las moléculas del antibiótico presentes en el citoplasma y las envía al exterior, de tal manera que no puedan interactuar con su sitio blanco (Moreno et al., 2009; Tafur et al., 2008) (**Figura 3**).

Figura 2

Transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias.



Nota: Modificado de *Furuya & Lowy* (2006)

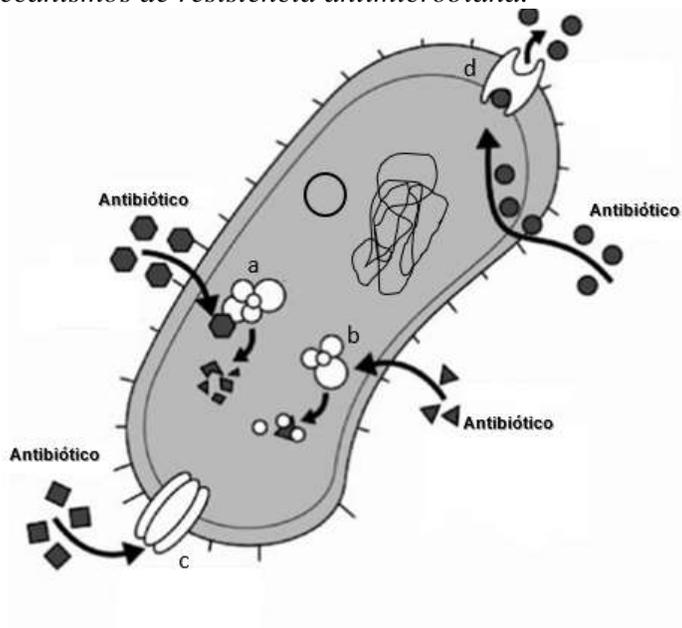
El fenómeno de resistencia se ha visto acelerado en las últimas décadas, principalmente a causa del uso inadecuado de fármacos antimicrobianos, ocasionando graves problemas a nivel mundial (OMS, 2014). Por este motivo en la Asamblea Mundial de la Salud realizada por la OMS en mayo de 2015 (OMS, 2016), se deliberó sobre este tema y se adoptó el “plan de acción mundial sobre

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

la resistencia a los antimicrobianos”, el cual consta de cinco objetivos: 1) mejorar la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos; 2) reforzar la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) uso óptimo de estos fármacos y 5) aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones (OMS, 2016). Por lo enmarcado en el segundo y quinto objetivo el trabajo propuesto cobra relevancia, ya que los resultados aquí consignados son insumos valiosos en la búsqueda de nuevas moléculas

Figura 3

Mecanismos de resistencia antimicrobiana.



Nota: a). Inactivación enzimática, b). Modificación del sitio blanco, c). Alteración de la permeabilidad celular, d). Bombas de eflujo. Modificado de *Moreno et al.* (Moreno et al., 2009)

En un reporte publicado por la OMS en febrero del 2017, se enumeran las bacterias resistentes a antibióticos que actualmente representan la mayor amenaza para la salud humana y deben ser prioridad para el desarrollo de nuevos fármacos (**Tabla 1**) (OMS, 2017).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Tabla 1.**

Bacterias resistentes con mayor prioridad para la investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos.

Microorganismo	Antibióticos a los que son resistentes
Prioridad crítica	
<i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos	Betalactámicos, Carbapenémicos, Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Flucopéptidos y Macrólidos.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos	Betalactámicos, Carbapenémicos, Cefalosporinas, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Macrólidos, Quinolonas, Novobiocina, sulfonamidas.
Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos	Betalactámicos, Carbapenémicos, Quinolonas, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Cotrimoxazol
Prioridad elevada	
<i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina	Betalactámicos, Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Glucopéptidos, Macrólidos.
<i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina	Betalactámicos, Tetraciclinas, Macrólidos, Vancomicina, Fluoroquinolonas
<i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina	Metronidazol, Claritromicina, Amoxicilina, Tetraciclinas, Glucopéptidos,
<i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas	Tetraciclinas, Quinolonas, Macrólidos, Glucopéptidos, Betalactámicos
<i>Salmonellae</i>, resistentes a las fluoroquinolonas	Glucopéptidos, Fluoroquinolonas, Betalactámicos, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Aminoglucósidos, Cotrimoxazol, Carbapenémicos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas	Glucopéptidos, Tetraciclinas, Aminoglucósidos
Prioridad media	

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

<i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina	Betalactámicos, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Macrólidos, Cotrimoxazol
<i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina	Tetraciclinas, betalactámicos
<i>Shigella spp.</i>, resistente a las fluoroquinolonas	Tetraciclinas, Cotrimoxazol, Fluoroquinolonas, Betalactámicos, Glucopéptidos,

Nota: Modificado de OMS (2017).

3.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, no motil, catalasa positiva y no forma esporas; posee un metabolismo anaerobio facultativo. A nivel taxonómico pertenece al género *Staphylococcus* junto con otras 52 especies diferentes, aunque inicialmente se clasificaba dentro de la familia *micrococcaceae* por similitudes morfológicas con los micrococos, el Comité Internacional de Sistemática de Procariontes (ICPS por sus siglas en inglés) decidió ubicarlos en una familia independiente denominada *Staphylococcaceae*, debido a sus características metabólicas específicas (Lakhundi & Zhang, 2018; Lee et al., 2018; Loriga et al., 2018).

S. aureus es un microorganismo muy común en la naturaleza, se puede encontrar en el aire, en suelos, aguas, además en una gran variedad de animales y como parte del microbioma de las fosas nasales en 20 a 40% de la población general, y en la piel en menor proporción (Eduardo, 2007; Lee et al., 2018). Cuando ocurre una disrupción del tejido epitelial o mucoso, el microorganismo mediante múltiples factores de virulencia como proteasas, hemolisinas, proteínas de adherencia, entre otros, puede entrar en los tejidos subyacentes o al torrente sanguíneo y provocar infecciones

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

de piel, neumonías, endocarditis, bacteriemias; asimismo puede causar intoxicaciones al consumir alimentos con presencia del patógeno o de sus toxinas (Ondusko & Nolt, 2018). Las personas con compromiso del sistema inmune o con dispositivos médicos invasivos son más susceptibles a sufrir de infecciones por este microorganismo (Lee et al., 2018).

Con la puesta en marcha de los tratamientos con penicilina en la década de 1940, la tasa de mortalidad asociada a infecciones por *S. aureus* cercana al 80% disminuyó en gran medida (Skinner, 1941). Solo un par de años más tarde se aislaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico (Lobanovska & Pilla, 2017). Para 1945 cerca del 80% de los aislamientos eran resistentes a penicilina, por lo cual empezó el desarrollo de nuevos tratamientos, y en 1960 se implementó el uso de la primera penicilina semisintética denominada meticilina con el fin de combatir el aumento de los casos de resistencia. Solo un año después de su primer uso se observó el primer caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Con el tiempo se pudo determinar que las cepas de SARM no eran solo resistentes a un antibiótico específico, a su vez poseían resistencia intrínseca a todos los betalactámicos, incluso cefalosporinas y carbapenémicos, ya que la resistencia es mediada en la mayoría de los casos por el gen *mecA* el cual codifica una proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a) que posee una afinidad reducida a los betalactámicos, lo cual permite continuar la síntesis de peptidoglicanos aún en presencia de estos fármacos (Chen & Ji, 2020; Lee et al., 2018).

En algunos casos se evidenció falta de susceptibilidad frente a otros fármacos antibacterianos como gentamicina, clindamicina, eritromicina, trimetropim-sulfametoxazol, fluoroquinolonas. En

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

2002 se aisló la primera cepa resistente a vancomicina, fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones por este patógeno (Castro-Orozco et al., 2018; Kurlenda & Grinholc, 2012). Por estas consideraciones, la OMS lo clasifica como uno de los microorganismos más importantes para desarrollar nuevas alternativas farmacológicas que permitan su control (OMS, 2017). Adicionalmente, este microorganismo gana particular en nuestra línea de investigación debido a que también es causante de grandes pérdidas a nivel agroindustrial, ya que es el principal agente etiológico de la mastitis bovina; la cual impacta de manera importante la producción lechera a nivel mundial, generando grandes pérdidas en el sector (Zaatout et al., 2020).

3.3 Péptidos Antimicrobianos

En la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para enfrentar a los microorganismos, los péptidos antimicrobianos (PAMs) ganan importancia debido a la gran diversidad que puede encontrarse en la naturaleza y a la amplia gama de propiedades biológicas que poseen (Téllez & Castaño, 2010). Los PAMs son parte importante de la respuesta inmune innata; son producidos por diferentes tipos de células desde bacterias hasta mamíferos, se expresan de forma constitutiva o inducida como respuesta a agentes externos, dependiendo del organismo; poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, con múltiples mecanismos de acción. Tienen, además, toxicidad selectiva que permite atacar de manera específica a las células blanco mediante mecanismos que, al parecer, dificultan la aparición de fenómenos de resistencia (Castañeda Casimiro et al., 2009; Rivas & Andreu, 2003; Téllez & Castaño, 2010).

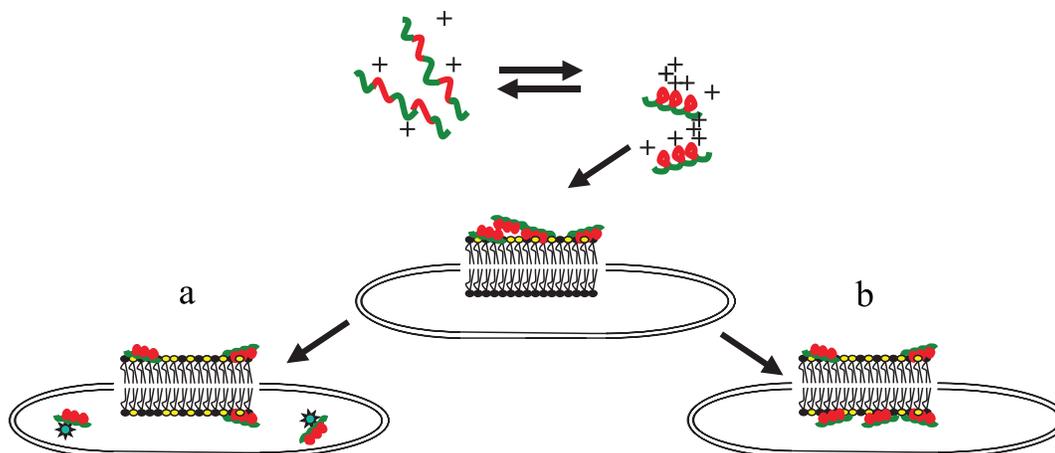
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Los PAMs son secuencias cortas de hasta cien aminoácidos con un peso inferior a 10 kDa; se caracterizan por tener cadenas laterales hidrofílicas e hidrofóbicas las cuales en medio acuoso tienden a plegarse formando estructuras secundarias de baja energía confiriéndoles un comportamiento anfipático, brindándole la capacidad de interactuar con la membrana de las bacterias (Magana et al., 2020; Park et al., 2011). Desde el descubrimiento de la lisozima en 1922 (Magana et al., 2020), se han secuenciado 10247 péptidos antimicrobianos según los reportes de la base de datos *CAMP_{R3}: Collection of Antimicrobial Peptides* (*CAMP (Collection of Antimicrobial Peptides)*, 2020; Waghu & Idicula-Thomas, 2020).

Un prometedor uso de los PAMs como fármacos eficaces en medicina humana podría basarse en sus propiedades de actividad microbicida directa y efectores humorales de la respuesta inmune (Zasloff, 2002). En los últimos años, se han realizado avances significativos en la elucidación de mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos, estos pueden interactuar con una variedad de blancos moleculares ya sea sobre la membrana o el interior de la célula (**Figura 4**) (Sanchez, 2016; Tafur et al., 2008).

Figura 4

Interacción entre los PAMs y las membranas bacterianas.



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Como antimicrobianos, la actividad de los PAMs se asocia con su interacción inicial con las membranas bacterianas, que resulta de la atracción electrostática entre estos, debido a su carga positiva, y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las bacterias Gram-positivas o con los lipopolisacáridos presentes en las Gram-negativas, generando áreas de inestabilidad en la membrana externa y permitiendo la traslocación del péptido; una vez ubicado en la membrana, el

Nota: a). internalización en el citoplasma. b). interacciones con la membrana péptidobacteriana. Modificado de *Zasloff* (2002)

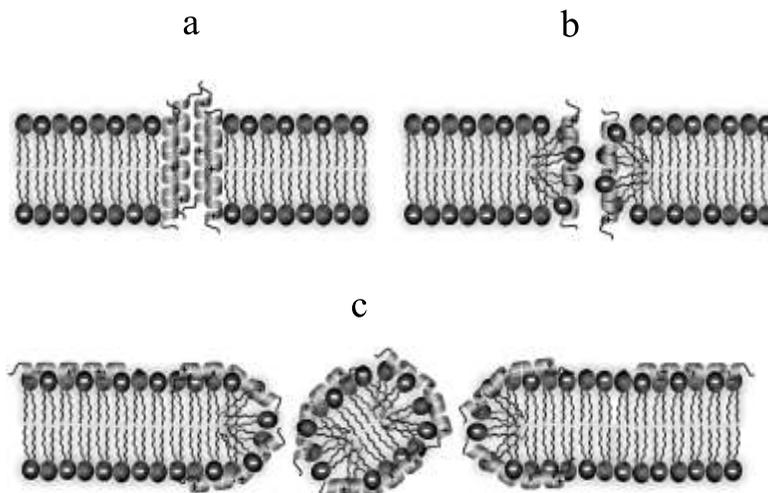
- Modelo de barril: Cuando se alcanza la concentración crítica de PAMs en la membrana bacteriana, estos se reorientan de forma perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales apolares, interactuando con el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares hacia el interior creando un poro hidrofílico. Estos poros son irregulares en tamaño y duración, generando finalmente, la pérdida del potencial de membrana y equilibrio osmótico (Balandin & Ovchinnikova, 2016a; Sanchez, 2016) (**Figura 5a**).
- Modelo de poro toroidal: Al alcanzar una concentración límite de PAMs unidos a la membrana, se induce la formación de una invaginación de lípidos que conduce al desarrollo de un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos. Este es un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana (Balandin & Ovchinnikova, 2016a) (**Figura 5b**).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Modelo de alfombra: El PAM no se inserta en la membrana, sino que permanece asociado con la cara externa, al alcanzar una concentración crítica, formando una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y crear micelas. La muerte celular se produce por pérdida del citoplasma (Balandin & Ovchinnikova, 2016a) (**Figura 5c**).

Otros mecanismos de acción de los PAMs están relacionados con su ingreso al citoplasma bacteriano interactuando selectivamente con diferentes procesos metabólicos, como inhibir la replicación y traducción o induciendo apoptosis (Balandin & Ovchinnikova, 2016a; Zasloff, 2002). Algunos autores afirman que el mecanismo de acción de estos compuestos puede variar dependiendo de la concentración de mismo (Balandin & Ovchinnikova, 2016a).

Debido a que un mismo PAM puede tener múltiples dianas en una bacteria para intervenir y causar su efecto antimicrobiano, poseen un espectro de acción mayor y la adquisición de resistencia por parte de los microorganismos sucede con menor frecuencia (Castañeda Casimiro et al., 2009; Martínez & Sánchez, 2007; Téllez & Castaño, 2010).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 5***Mecanismo de acción de los PAMs sobre las membranas bacterianas*

Nota: a). Modelo de barril; b). Modelo de poro toroidal; c). Modelo de alfombra. Modificado Balandin & Ovchinnikova (2016a)

Los PAMs son un grupo muy diverso de compuestos con múltiples funciones biológicas por lo cual es complicado agruparlos con base en sus características funcionales, y tienden a ser clasificados por su composición de aminoácidos y estructura (**Tabla 2**) (Castañeda Casimiro et al., 2009).

Tabla 2.*Clasificación de PAMs según su estructura secundaria y su composición.*

PAMs	Características	Ejemplos
Péptidos aniónicos	Son pequeños péptidos ricos en ácido glutámico y aspártico	Maximin
Péptidos catiónicos lineales de hélice alfa	Carecen de cisteína.	Cecropinas, Dermasepin,
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	Contienen de uno a tres puentes disulfuro	Apidaecinas, Drosocín, Profenina
Péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácido específicos	Ricos en prolina, arginina, fenilalanina o triptófano	Brevinina, Protegrinas, Defensinas, Mitimiacinas

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Péptidos aniónicos y catiónicos que son fragmentos de proteínas	Proviene de diferentes proteínas como: lactoferrina, caseína, entre otros.	Lactoferrina, Casodicina
--	--	--------------------------

Nota: Modificado de Téllez & Castaño (2010)

3.4 Secreción mucosa de *Achatina fulica* como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos.

El papel de los PAMs es de particular importancia en los invertebrados, los cuales constituyen la mayoría de las especies del mundo viviente, porque estos animales carecen de inmunidad adquirida, y teniendo en cuenta el considerable éxito evolutivo de estos organismos, es evidente que su inmunidad innata es extremadamente efectiva. Por esta razón se han hecho múltiples estudios sobre ellos en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas efectivas contra microorganismos resistentes (Balandin & Ovchinnikova, 2016b).

Se han identificado 40 familias de péptidos antimicrobianos en invertebrados, los cuales se han encontrado en la hemolinfa (plasma y hemocitos), en las células fagocíticas y en ciertas células epiteliales (Sperstad et al., 2011).

Dentro de los invertebrados se encuentra *Achatina fulica*, gasterópodo ubicado en el phylum mollusca, conocido coloquialmente como caracol gigante africano. Es una especie terrestre, nativa del este de África donde se halla ampliamente diseminado (Instituto Nacional de Salud & Grupo de Riesgos en inocuidad de alimentos y plagas, 2016). En la actualidad se encuentra distribuido en Asia, Oceanía, América y Europa, en cerca de 61 países, y su principal medio de

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

dispersión ha sido el hombre (Lowe et al., 2004). Además, es una de las especies más nocivas a nivel ambiental, causando daños en áreas agrícolas y ecosistemas naturales, principalmente en zonas tropicales y subtropicales; también se considera un riesgo para la salud humana ya que puede ser vector de diferentes organismos patógenos (ISSG, 2015a).

Se encuentra entre las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo según la lista elaborada por el Grupo de Especialistas de Especies Invasoras (GEEI) de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Lowe et al., 2004). Esto se debe principalmente a sus características fisiológicas y morfológicas que les confiere resistencia a variables ambientales, a su dieta polífaga y a su alto potencial reproductivo que favorece su dispersión (ISSG, 2015b).

La secreción mucosa de *A. fulica* ha demostrado tener diversas propiedades biomédicas, incluida la actividad antimicrobiana (Ghosh et al., 2010; Iguchi et al., 1982; Kubota et al., 1985; Tempone, 2007; Zhong et al., 2013). Los primeros ensayos en los cuales se observó actividad antibacteriana se realizaron en 1981. El método utilizado fue el de difusión en disco para probar dos fracciones de la secreción, una soluble en agua, y otra denominada fracción de mucinas, en las que se encontró inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En otros experimentos realizados en este mismo estudio se logró determinar que la actividad antibacteriana estaba relacionada con la presencia de proteínas (Iguchi et al., 1982). En este trabajo se evaluaron dos fracciones, una denominada fracción soluble en agua (WSF por sus siglas en inglés *Water Soluble Fraction*), que fue obtenida adicionando dos partes de agua a una parte de secreción

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

mucosa; esta mezcla se agitó durante toda la noche, se centrifugó a 8000g por 30 min y se recuperó el sobrenadante. La fracción de mucinas (MF por sus siglas en inglés *mucin fraction*) se obtuvo adicionando tres partes de etanol a una parte WSF; esta mezcla se centrifugó a 2500g por 30 minutos y se conservó el precipitado (Iguchi et al., 1982).

En 1985, el mismo equipo de investigación del anterior estudio purificó un factor antibacterial mediante cromatografía de intercambio iónico. Demostró que se trataba de una glicoproteína de 60 kDa, compuesta de dos subunidades. Evaluaron la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco, encontrando que a una concentración de 84 µg/mL presentaba un halo de inhibición de 5 mm sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y uno de 4 mm sobre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Kubota et al., 1985). En estudios posteriores lograron clonar y obtener una proteína recombinante con actividad antimicrobiana similar a la de su forma nativa y la denominaron *achacin* (Obara et al., 1992; Ogawa et al., 1999).

En un estudio realizado en el año 2013 en la *Nanjing Agricultural University* en China, se llevó a cabo la caracterización a partir de la secreción mucosa de *A. fulica* de un péptido rico en cisteína de aproximadamente 9,7 kDa que presentó una potente actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus pyocyaneus* CMCCB 10104, *Bacillus dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Candida albicans* ATCC 20032, reportándose por primera vez actividad antifúngica en la secreción (Zhong et al., 2013). La purificación de este péptido se realizó en dos pasos, primero por cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-50; luego las fracciones que presentaron actividad antimicrobiana fueron fraccionadas nuevamente por cromatografía líquida de alta eficiencia en

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*) con una columna C8, usando un gradiente de acetonitrilo-agua; finalmente la fracción con actividad biológica antimicrobiana obtenida por RP-HPLC se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-flight*) (Zhong et al., 2013).

En Colombia, los estudios con *A. fulica* se han enfocado en revisar los problemas que causa a nivel ambiental y de salud pública, relacionados con su proliferación en todo el territorio nacional (Instituto Colombiano Agropecuario, 2015). Por tanto, hasta la fecha, muy pocos trabajos se han enfocado en la investigación de la secreción mucosa y su uso potencial. En la revisión bibliográfica se encontró una publicación que reporta la caracterización fisicoquímica de la secreción mucosa completa y la evaluación de su actividad antimicrobiana. Para los ensayos de actividad biológica la secreción mucosa fue homogenizada y precipitada por la metodología de *Iguchi et al* (Iguchi et al., 1982) descrita en párrafos anteriores, se encontró una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 2.1 mg/mL sobre *Streptococcus agalactiae*, de 3.3 mg/mL sobre *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina y de 2.4 mg/mL sobre *Escherichia coli* (Pereira et al., 2016).

En Brasil en el año 2007 se realizó un estudio en el cual se evaluó la actividad de la secreción del caracol como posible producto natural con potencial bioactivo contra *Leishmania* sp, donde se evidenció que la secreción cruda eliminó el 50% de los promastigotes a una concentración de 98.37 µg/mL (Tempone, 2007).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Otros estudios muestran actividad de la proteína achacin y de otras fracciones pépticas frente a células tumorales como HeLa (cáncer cérvico-uterino) y la línea celular de cáncer de seno MCF-7, lo cual abre otros campos de investigación (Kanzawa et al., 2004).

En el 2012 un grupo de investigadores evaluó el potencial de cicatrización de la secreción mucosa, para lo cual se realizaron heridas quirúrgicas en ratas y estas se cubrieron con la secreción. A los días 3, 7, 14 y 21 se sacrificaron los animales y se observaron las heridas al microscopio, se logró evidenciar una maduración más rápida en la formación del tejido de granulación y una mejor tasa de epitelización en los especímenes tratados, en comparación con los del control, demostrando su posible uso como cicatrizante (Santana et al., 2012)

Teniendo en cuenta lo mencionado en párrafos anteriores y la búsqueda realizada en diferentes bases de datos (Elservier, Proquest, Scopus, Springer, Ebsco host) se evidenció que los estudios realizados sobre la secreción mucosa de *A. fulica*, se han centrado en evaluar sus diferentes propiedades cicatrizantes, humectantes y antimicrobianas sobre diferentes microorganismos, pero se encontró poca evidencia científica donde se evalúe los efectos de la secreción mucosa o sus fracciones en bacterias resistentes a antibióticos de uso común.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

4. Metodología.

4.1 Obtención de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *A. fulica*.

4.1.1 Obtención de la secreción mucosa.

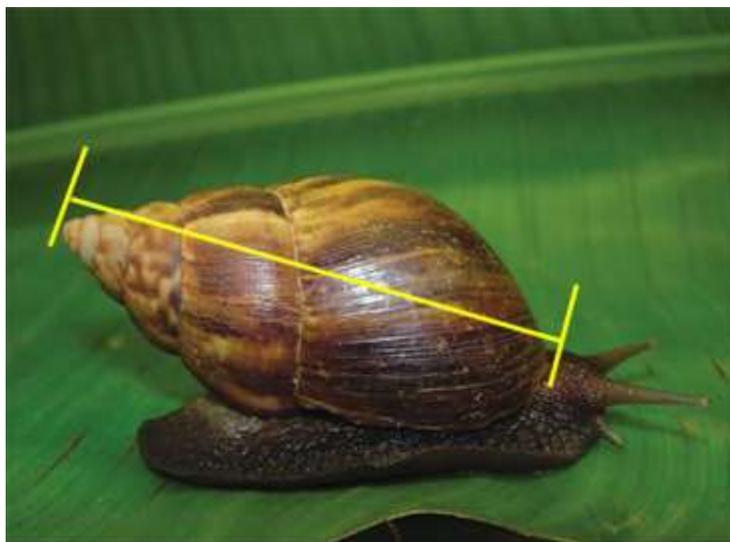
4.1.1.1. Selección de los caracoles.

Para la captura de los especímenes de *A. fulica* se ubicaron cuatro focos de recolección en el área Metropolitana de Bucaramanga, descritos en la Tabla 3. Los caracoles se identificaron con base en las características morfológicas de la concha, la cual es generalmente de color marrón rojizo, con marcas verticales amarillentas débiles; su forma es cónica y bastante puntiaguda. Se seleccionaron aquellos ejemplares con un tamaño de concha entre 5 a 12 cm (**Figura 6**).

Con base en los previos ensayos de actividad antimicrobiana relacionados en la **sección 4.2**, se decidió trabajar con la muestra proveniente del barrio la Paz de Floridablanca, debido a que exhibió resultados más promisorios (datos de actividad antimicrobiana de las diferentes secreciones. Anexo E).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 6:**

a. *Achatina fulica*; **b.** Se indica la forma correcta para realizar la medición de la concha del caracol.

**Tabla 3**

Zonas donde se realizó la captura de los especímenes de *A. fulica*.

No.	Municipio	Localidad	Coordenadas
1	Girón	Vereda Acapulco	7°00'42.3"N 73°08'04.5"O
2	Floridablanca	Barrio La Paz	7°03'34.9"N 73°05'48.2"O
3	Piedecuesta	Barrio El Refugio	6°59'39.3"N 73°03'46.4"O
4	Bucaramanga	Barrio La Feria	7°07'10.1"N 73°08'27.1"O

4.1.1.2. Aislamiento de la secreción mucosa.

Se realizó mediante estimulación directa del pie del caracol, con corriente eléctrica de 5 a 10 Voltios suministrada por una batería, a través de un electrodo en intervalos de 5 a 20 segundos. La secreción mucosa obtenida de los diferentes especímenes se recolectó en recipientes estériles (Iguchi et al., 1982) (**Figura 7**).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 7**

Obtención de la secreción mucosa de Achatina fulica

**4.1.1.3. Homogenización de la secreción.**

Con el fin de obtener la mayor cantidad de material proteico presentes en la secreción mucosa, se evaluaron las dos metodologías descritas sobre su homogenización, realizando algunas modificaciones. La primera descrita por *Iguchi et al* en 1982, que consiste en mezclar dos partes de agua y una parte de secreción mucosa, agitar a temperatura ambiente durante 24 horas y luego centrifugar a 8000g por 15 min a 4°C. La segunda propuesta por *Zhong et al* en 2013, que consiste en mezclar un volumen de Buffer fosfato salino (PBS) y un volumen de secreción mucosa, agitar durante 24 horas para luego centrifugar a 8000g por 15 minutos a 4°C.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Los dos métodos se modificaron agregando un cóctel de inhibidores de proteasas (EDTA (por sus siglas en inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*), Ortovanadato de sodio y PMSF (por sus siglas en inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)) (**Anexo A**). Este procedimiento se realizó para obtener y conservar la mayor cantidad de péptidos y proteínas presentes en la secreción. Adicionalmente, los resultados se evaluaron con agitación de las muestras durante 24 y 48 horas, para determinar si esta variable influenciaba en la recuperación del material proteico.

La elección de la metodología más apropiada se realizó con base en la cuantificación de proteínas, en cada uno de los extractos obtenidos, mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Adicionalmente, los extractos fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE para visualizar las proteínas recuperadas.

4.1.2 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación del material proteico de la secreción mucosa homogenizada se realizó mediante el método de Bradford, usando albúmina bovina como patrón de referencia para la cuantificación. Brevemente, a 5 μ L de la muestra se le adicionó 195 μ L del reactivo de Bradford y posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. La cuantificación se llevó a cabo utilizando microplacas de 96 pozos de fondo plano y la lectura de absorbancia se realizó a 595 nm en un espectrofotómetro MULTISKAN Sky (Thermoscientific). Se realizaron tres réplicas biológicas por muestra analizada y la concentración se expresó en microgramos de proteína por mililitro de muestra (μ g/mL) (Bradford, 1976).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

4.1.3 Electroforesis

Para evaluar el material proteico, el grado de purificación y el peso molecular de las fracciones obtenidas, se realizó electroforesis SDS-PAGE. Se usaron geles de Acrilamida/Bisacrilamida de concentración 5%, y de separación de 12%. Las muestras de la secreción mucosa y sus fracciones se mezclaron con buffer *Laemmli* (3.55 mL de agua tipo I; 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8; 2.5 mL de glicerol; 2 mL de SDS al 10% y 0.2 mg de azul de bromofenol al 0.5%). Se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se cargó 15 µL por pozo. Se usó un marcador de peso molecular con rango entre 14.4 y 116 kDa. Los geles se corrieron a un voltaje inicial de 30 V por 20 minutos hasta que las muestras entraron en el gel de separación; posteriormente, se subió el voltaje a 150 V hasta el final de la corrida.

La coloración de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Coomassie, se sometió el gel a una solución de tinción de Coomassie R-250 durante 1 hora, seguido de solución para decolorar (50 % metanol, 10 % ácido acético) hasta lograr la respectiva visualización de las bandas (Laemmli, 1970).

4.1.4 Obtención de las fracciones de la secreción mucosa.

4.1.4.1 Preparación de la muestra por filtración en gel con *Sephadex*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Luego del proceso de homogenización aplicado a la secreción mucosa se realizaron diversos ensayos con el fin de obtener la mejor separación de péptidos y proteínas presentes. Se probaron las siguientes metodologías:

- **Primer ensayo de Fraccionamiento:** Se realizó el montaje de cartuchos de Sephadex (G-50, G-25) con una altura de 2 cm y un diámetro de 1 cm. Se equilibró con agua (tipo I), se agregó 1 mL de muestra y se realizó la elución con 2 mL de agua; se recolectaron 3 fracciones de 1 mL cada una. Luego se evaluó el grado de separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.
- **Segundo ensayo de Fraccionamiento:** Se realizó el montaje de cartuchos de Sephadex (G-50, G-25, G-75) con una altura de 5 cm y un diámetro de 2 cm y se equilibró con agua (tipo I), se agregó 1 mL de muestra y se realizó la elución con 10 mL de agua, se recolectaron fracciones de 500 μ L. Luego se evaluó el grado de separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.
- **Tercer ensayo de Fraccionamiento:** Se realizó el montaje de un cartucho de Sephadex G-75 con una altura de 25 cm y un diámetro de 2 cm, se equilibró con agua tipo I, se agregó 2.5 mL de muestra y se realizó la elución con agua, se recolectaron fracciones cada 5 min. Luego se evaluó el grado de separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- **Cuarto ensayo de Fraccionamiento:** Se realizó el montaje de un cartucho de Sephadex (G-75 G-50) con una altura de 10 cm y un diámetro de 1.5 cm equilibrada con PBS, se agregó 1 mL de muestra y se realizó la elución con PBS, se recolectaron fracciones cada minuto durante 20 minutos. Luego se evaluó el grado de separación de proteínas mediante SDS-PAGE.

Luego de los resultados obtenidos se decidió realizar una primera purificación usando cartuchos Sephadex G-25 (20 mm x 50 mm) con el fin de eliminar sales e impurezas presentes en la muestra, para lo cual se adicionaron 5 mL de secreción mucosa homogenizada y se realizó la elusión con 10 mL de agua tipo I, el total del volumen eluido se recolectó, liofilizó y se conservó a -20°C (**Anexo A**).

4.1.4.2 Análisis de la secreción por RP-HPLC

Para el fraccionamiento de la secreción mucosa se tomaron 8 mg del liofilizado y se resuspendieron en 1 mL de agua tipo I; la muestra se pasó por un filtro RC (*Regenerated Cellulose*) de 0.22µm para fraccionarlo por RP-HPLC con una columna Hyperclone BDS C18 (4.6mm x 250mm, tamaño de partícula 5µm) equilibrada con Agua tipo 1 con TFA 0.1%. La elusión se realizó usando gradientes de Agua tipo 1 con TFA (*TriFluoroAcetic acid*) 0.1% y Acetonitrilo (ACN) con TFA 0.1% a un flujo de 0.7 mL/min; el volumen de inyección fue 60 µL; el monitoreo analítico se realizó a una longitud de onda de 218 nm. Los resultados obtenidos permitieron la recolección de cinco fracciones a las cuales se le ensayó su actividad antimicrobiana (**Anexo B**).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

4.2 Espectrometría de masas

Los espectros de masas de cada una de las fracciones recuperadas por RP-HPLC se registraron utilizando un espectrómetro de masas (Bruker) en modo desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI por sus siglas en ingles *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) con un detector de tiempo de vuelo (TOF por sus siglas en ingles *Time Of Fly*). Los análisis se llevaron a cabo en modo reflectrón.

La matriz usada en este trabajo fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA por sus siglas en ingles *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*). La matriz fue preparada agregando 1 mg de HCCA en 1 mL de una solución de ACN:H₂O (50:50) y 0.01% de TFA. Sobre cada punto de la placa se agregó 1 μ L de la matriz, seguido de 1 μ L de la fracción a evaluar y luego 1 μ L de matriz, esto se dejó secar a temperatura ambiente en la cabina de extracción.

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la secreción y sus fracciones.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron con la secreción mucosa homogenizada, la secreción semi-purificada con Sephadex y las fracciones recuperadas por RP-HPLC. El método utilizado fue el de microdilución en caldo, según la guía estándar CLSI-M07-A10-2010 adaptado para nuevas moléculas antimicrobianas por *Cruz et al* (Cruz et al., 2017).

Se preparó un pre-inóculo de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina empleando como medio de cultivo Müller-Hilton. El pre-inóculo se dejó en incubación durante 12 horas a 37°C y

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

agitación a 200 rpm. La cinética de crecimiento se realizó adicionando 100 µL del cultivo a microplacas de ELISA de 96 pozos que previamente contenían diluciones conocidas de la secreción mucosa homogenizada o las fracciones a evaluar. La medición de la densidad óptica fue realizada en un espectrofotómetro lector de microplacas de ELISA marca Biorad-Imarck a 595 nm, cada hora, durante 8 horas. Se determinó el porcentaje de inhibición para cada concentración evaluada.

El cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se determinó a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos y corresponde a la concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento bacteriano. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de la secreción mucosa se realizó en varias etapas:

- Primera: Se evaluó la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en presencia de la secreción mucosa homogenizada de tres de los focos donde se realizó recolección de los especímenes de *Achatina fulica*.
- Segunda: Evaluación de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en presencia de secreción mucosa homogenizada a diferentes concentraciones.
- Tercera: Evaluación de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en presencia de secreción mucosa semi-purificada con Sephadex, liofilizada y preparada a diferentes concentraciones.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Cuarta: Evaluación de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en presencia de las fracciones obtenidas por RP-HPLC a diferentes concentraciones.

4.4 Análisis estadístico.

Los valores tanto de actividad antimicrobiana como de cuantificación de proteínas se expresaron como la media aritmética con más o menos una desviación estándar de la media y un límite de confianza del 95%. Se calculó la CMI₅₀ en µg/mL. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un post test de Tukey para comparaciones múltiples, el cual permitió comparar los valores medios obtenidos, teniendo en cuenta el error asociado. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***5. Resultados y discusión.****5.1 Homogenización de la secreción mucosa de *Achatina fulica***

Debido a la poca información sobre los métodos de homogenización en este tipo de muestras, se realizó diferentes experimentos para establecer una comparación entre dos metodologías que se han propuesto, y seleccionar la de mayor rendimiento de proteínas y péptidos.

Al evaluar las metodologías, se evidenció que usando PBS con inhibidores de proteasas y una agitación de 24 horas se lograba obtener mayor concentración de proteína (1322 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabla 4**) y mayor número de bandas en la separación por electroforesis SDS-PAGE (**Figura 7**), mostrando la mayor recuperación de péptidos/proteínas. Por esto se eligieron estas condiciones como las más adecuada para la obtención del material proteico de la secreción mucosa.

Tabla 4

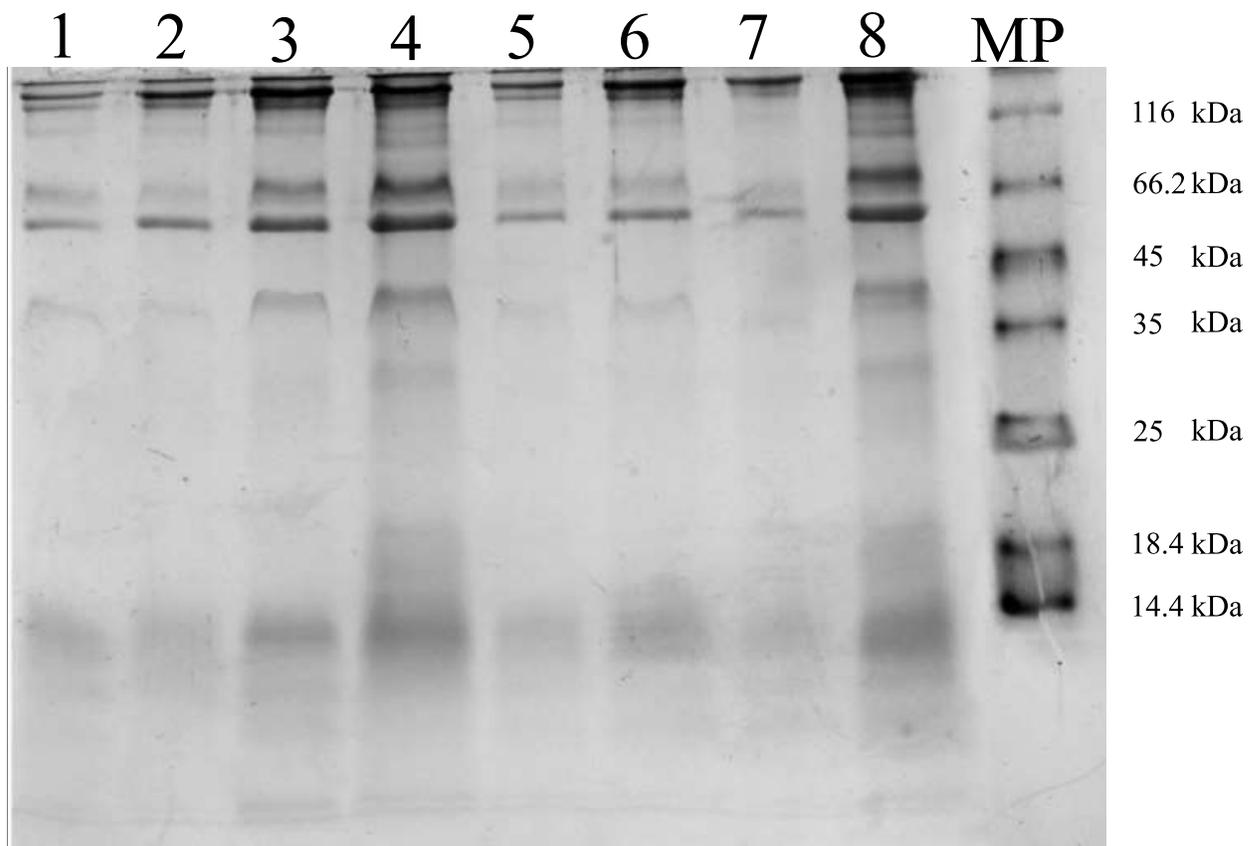
*Evaluación del solvente, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de extracción de proteínas recuperadas de la secreción mucosa de *A. fulica**

Experimento	Solvente de extracción	Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)	
		24 h	48 h
<i>Iguchi</i>	Agua destilada.	622.7 \pm 28.1 ^a	538.3 \pm 50.1 ^a
<i>Iguchi modificado</i>	Agua destilada con inhibidores de proteasas	750.67 \pm 39 ^b	671 \pm 21.5 ^b
<i>Zhong</i>	PBS	1041 \pm 26.7 ^c	956.3 \pm 57.29 ^c
<i>Zhong modificado</i>	PBS con inhibidores de proteasas	1322 \pm 57.3 ^d	1182.3 \pm 22.3 ^e

Nota: Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores \pm desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas (valor de $p < 0.05$)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Figura 8 Evaluación por electroforesis SDS-PAGE del material proteico aislado por cada método de homogenización.



Nota: **1.** Agua destilada (24 horas); **2.** Agua destilada con inhibidores de proteasas (24 horas); **3.** PBS (24 horas); **4.** PBS con inhibidores de proteasas (24 horas); **5.** Agua destilada (48 horas); **6.** Agua destilada con inhibidores de proteasas (48 horas); **7.** PBS (48 horas); **8.** PBS con inhibidores de proteasas (48 horas); **MP.** Marcador de peso molecular.

5.2 Purificación y obtención de fracciones de la secreción mucosa.

Con el objetivo de separar el material proteico presente en la secreción mucosa y correlacionarlo con su actividad antimicrobiana, se realizó un fraccionamiento de la secreción mediante cromatografía de exclusión de tamaño con columnas de Sephadex (G-10, G-25, G-50,

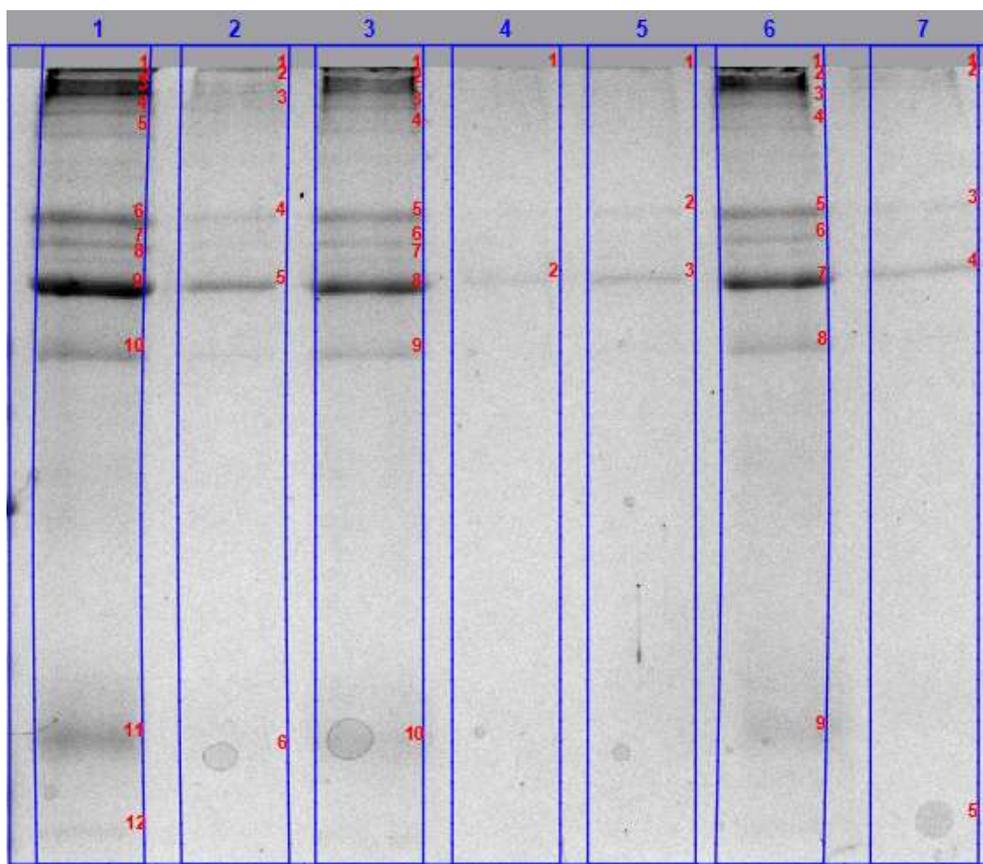
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

G-75), para lo cual se realizaron diferentes ensayos y lograr definir el más apropiado para la separación de la muestra.

El primer ensayo de fraccionamiento se realizó siguiendo el protocolo establecido en laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM para la purificación de péptidos. Se usaron dos tipos de Sephadex G-50 y G-25 y mediante la visualización por electroforesis SDS-PAGE no se evidenció una buena separación del material proteico presente en la secreción (**Figura 8**).

En el segundo ensayo se usó Sephadex G-50 y G-75 y se incrementó la altura de los cartuchos (mayor cantidad de fase estacionaria) para aumentar el número de platos teóricos presentes; también se recolectaron fracciones con un volumen menor (500 μ L). En la visualización de las fracciones por electroforesis SDS-PAGE no se observó una buena separación del material proteico de la secreción mucosa (**Anexo D**).

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió para el tercer ensayo aumentar la altura de la columna (mayor fase estacionaria) y solo usar Sephadex G-75 debido a que el rango de exclusión que posee es el más adecuado para separar las proteínas y péptidos presentes en la secreción. Al observar la electroforesis SDS-PAGE de las fracciones recuperadas no se evidencia una clara separación del material proteico presente (**Anexo D**).

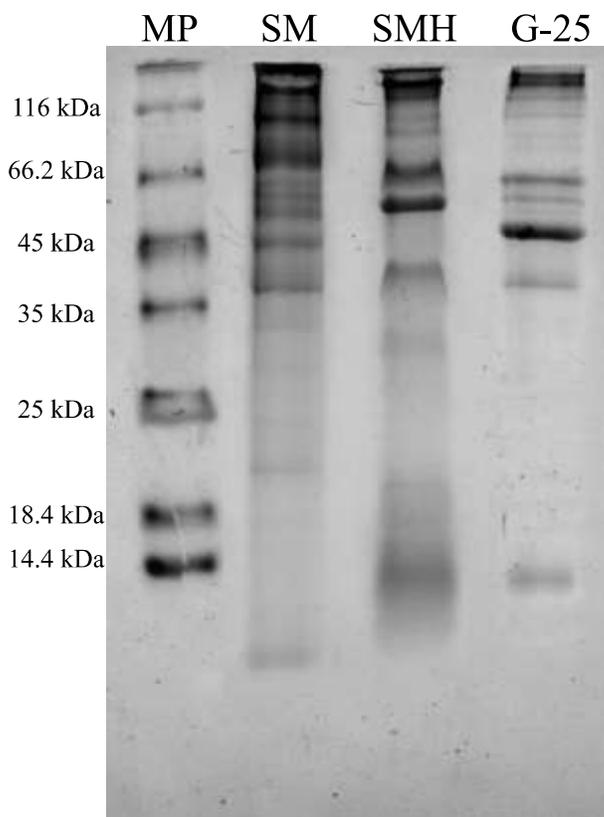
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 9** Perfil electroforético del primer ensayo de fraccionamiento con Sephadex.

Nota: **1).** Secreción mucosa homogenizada; **2).** G-25 Fracción 01; **3).** G-25 Fracción 02; **4).** G-25 Fracción 03; **5).** G-50 Fracción 01; **6).** G-50 Fracción 02; **7).** G-50 Fracción 03.

El cuarto ensayo, incluyó el cambio del tamaño de la columna y, además la fase móvil (Metodología mencionada en la sección **4.1.4.1**) con la cual se realizó la elución. Se probaron Sephadex G-50 y G-75. y se realizó una electroforesis de las fracciones obtenidas con G-75. No se evidenció una buena separación de las proteínas/péptidos obtenidas (**Anexo D**).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Figura 10 Evaluación comparativa por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas/péptidos por cada método de extracción.



Nota: **MP:** Marcador de peso molecular
SM: Secreción mucosa; **SMH:** Secreción mucosa homogenizada; **G-25:** Secreción mucosa purificada con Sephadex G-25.

A partir de lo mencionado en los párrafos anteriores se pudo determinar que los ensayos realizados por cromatografía de exclusión de tamaño para lograr el fraccionamiento de las proteínas y péptidos presentes en la secreción mucosa no fueron favorables, ya que no hay una separación clara del material proteico en las fracciones recolectadas (**Figura 8**) (**Anexo D**). Esto puede deberse a que, en ninguna de las pruebas realizadas, las columnas alcanzaron las dimensiones óptimas para realizar la separación, y en algunos casos las fracciones recolectadas tendrían concentraciones mínimas de la muestra, por ende, no se podrían detectar por los métodos disponibles en el laboratorio.

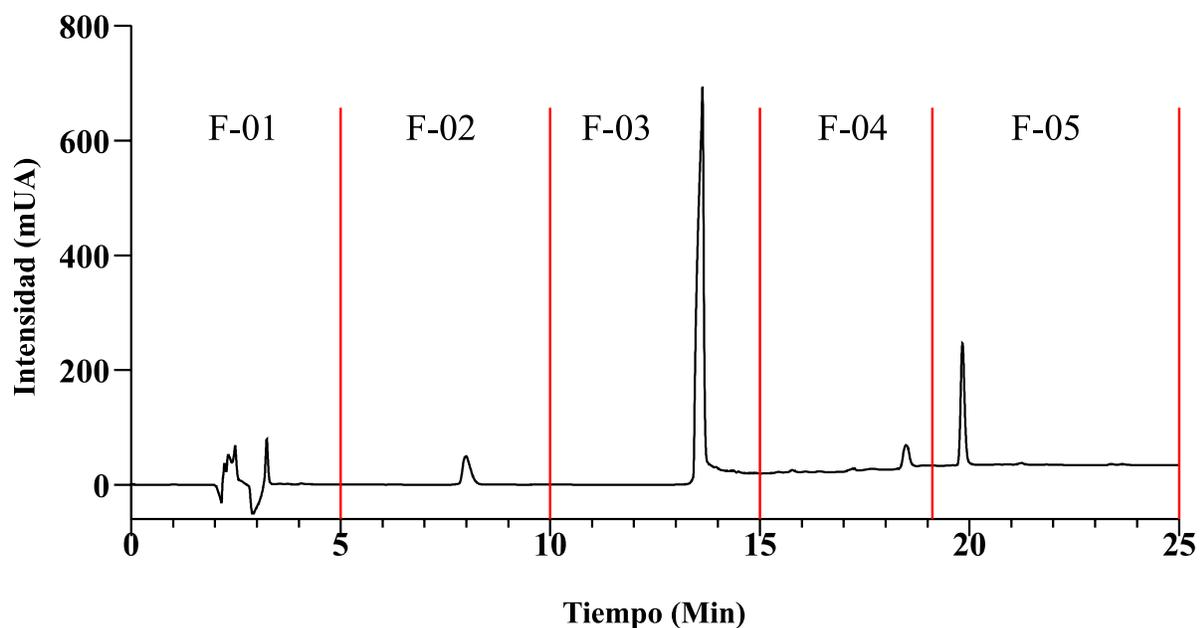
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

A partir de los resultados observados se planteó el uso de Sephadex (G-25) para eliminar las impurezas y sales presentes en la secreción conservando la mayor cantidad de proteínas y péptidos de esta, como se puede evidenciar en la **Figura 9**. La elución recuperada se colectó en un pool, el cual se liofilizó y se conservó a -20°C para posteriores análisis.

El pool obtenido de la purificación con Sephadex G-25 liofilizado, se resuspendió para luego fraccionarse por RP-HPLC con un gradiente de acetonitrilo-agua. En el cromatograma se observó una buena separación, evidenciando varios picos significativos, a partir de los cuales se recolectaron 5 fracciones (F01-F05) (**Figura 10**), tal como se describe en la sección 4.

Figura 11

Cromatograma de RP-HPLC con los con los tiempos de retención de las cinco fracciones separadas de la secreción mucosa purificada con Sephadex G-25.



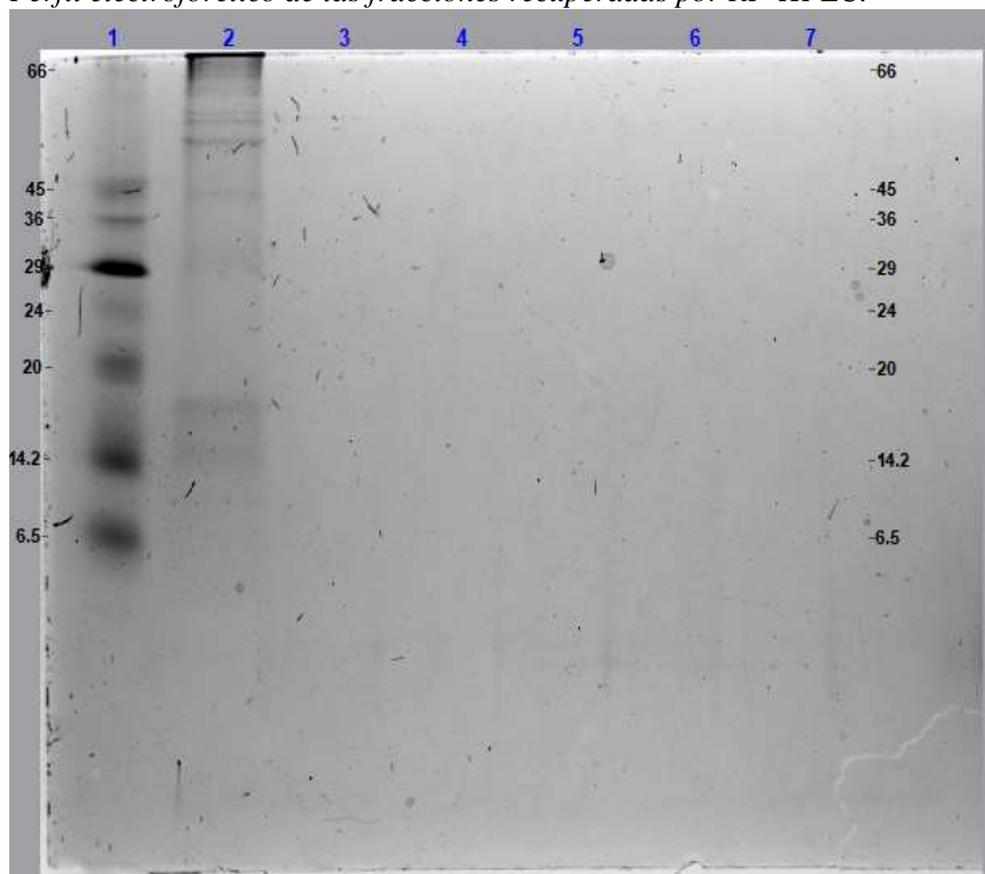
Nota Las fracciones se escanearon a una densidad óptica de 218nm.

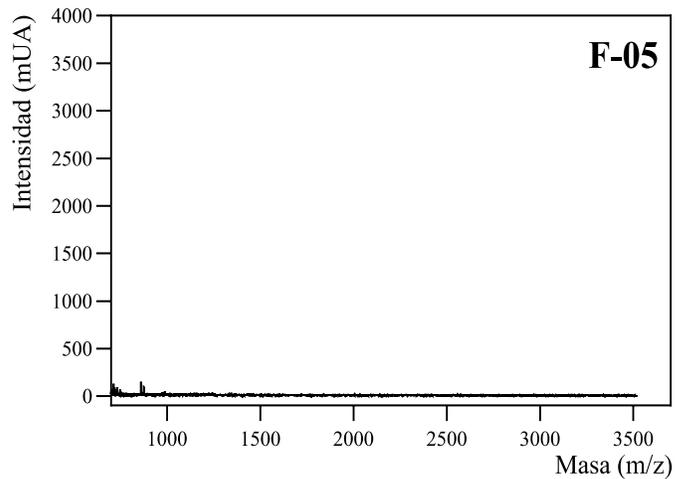
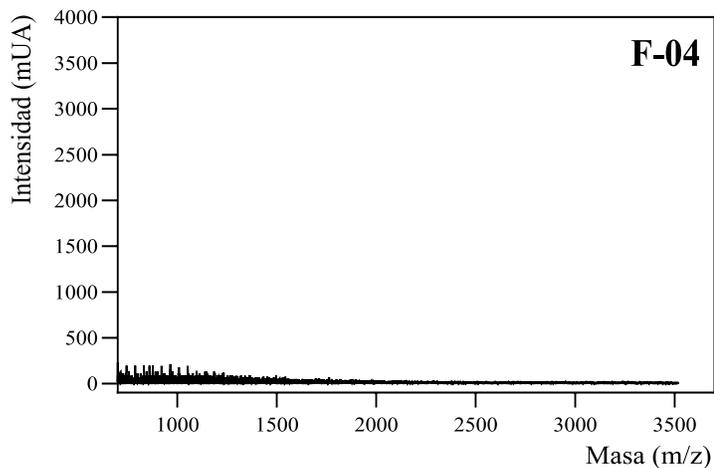
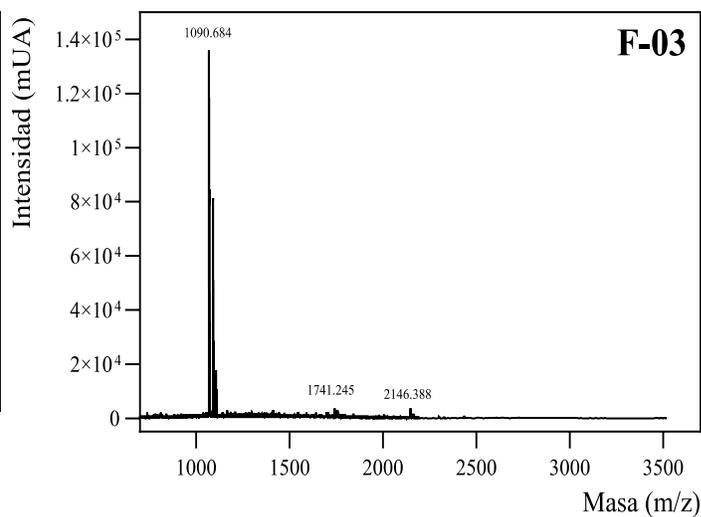
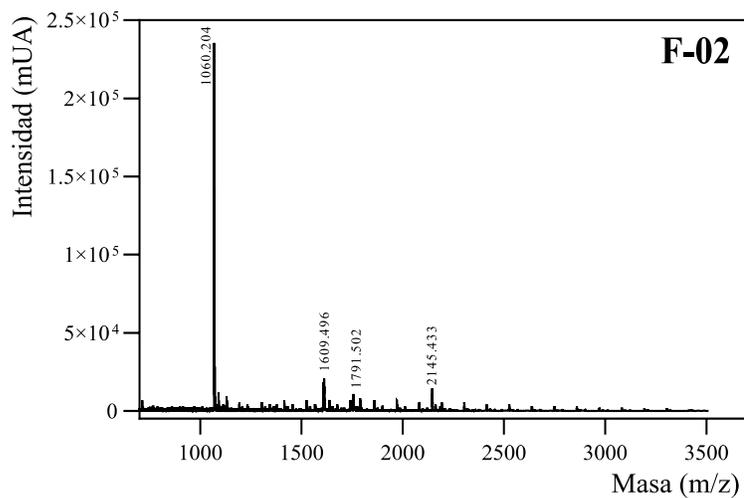
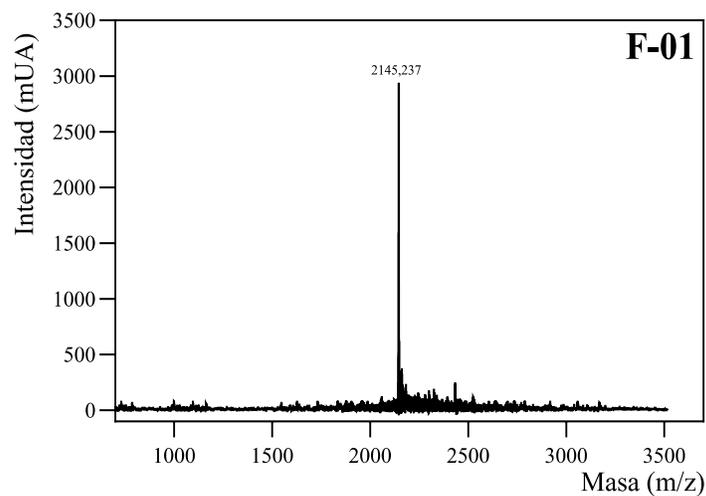
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Se realizó una caracterización parcial de las fracciones recuperadas por RP-HPLC mediante electroforesis SDS-PAGE, pero no se observaron bandas en ninguna de las fracciones recuperadas; esto puede deberse a dos razones, la primera es que esta metodología posee una baja resolución para detectar proteínas/péptidos de bajo peso molecular; la segunda es que debido al tratamiento dado a la secreción, la concentración de péptidos y proteínas presentes en cada fracción es muy baja motivo por el cual no es posible detectarlos por esta metodología.

Figura 12

Perfil electroforético de las fracciones recuperadas por RP-HPLC.



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 13***Espectros de masas MALDI-TOF de las fracciones recuperadas por RP-HPLC.*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Como algunos estudios han demostrado que dentro de la secreción hay presencia de péptidos con pesos inferiores a 3kDa no se puede descartar la presencia de estos en las fracciones donde por electroforesis no se detectó ninguna presencia de material proteico; por este motivo cada una de las fracciones fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF como se ve en la **Figura 12**. En la fracción F-01 se observa una señal m/z correspondiente a 2145.237 Da [M+H]; en la fracción F-02 se detectaron cuatro señales m/z que corresponden a 1060.204 Da [M+H], 1609.496 Da [M+H], 1791.502 Da [M+H] y 2045.43 Da [M+H]; en la fracción F-03 se encontraron tres señales m/z de 1090.684 Da [M+H], 1741.245 Da [M+H] y 2046.388 Da [M+H]; en las fracciones F-04 y F-05 no se observó ningún tipo de señal. De las fracciones F-01, F-02 y F-03 se observó una señal prácticamente idéntica que puede corresponder a un posible péptido de 2145.237 Da [M+H].

5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la secreción mucosa y sus fracciones.

Con el fin de verificar el posible efecto antibacteriano de la secreción mucosa y las fracciones recolectadas frente a SARM, se realizaron curvas de cinética de crecimiento del microorganismo objeto de estudio. Los resultados se reportan como la inhibición en el crecimiento bacteriano en presencia de las sustancias evaluadas (Secreción mucosa y sus fracciones), en comparación con crecimiento basal bacteriano utilizado como control (sin los compuestos a evaluar).

En la primera etapa se comparó el efecto antimicrobiano de la secreción mucosa homogenizada recién colectada de especímenes capturados en los diferentes focos identificados, donde se

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

observó una diferencia significativa ($p\text{-valor}=\leq 0.0001$) con la obtenida en el barrio La Paz, Floridablanca. Con ésta se obtuvo un porcentaje de inhibición promedio del $67.79\pm 1.14\%$ contra SARM. Adicionalmente, los resultados de sensibilidad de SARM se compararon con los obtenidos frente a la secreción de especímenes mantenidos en el laboratorio por seis (6) meses, evidenciando una disminución en la actividad antimicrobiana de la secreción de estos últimos al compararla con la que presentaron los recién capturados de los otros puntos ya descritos, esto podría relacionarse con el hecho de que los especímenes conservados en el laboratorio están sometidos a un menor estrés ambiental que los recolectados recientemente, lo cual puede influir en la expresión de los compuestos presentes en la secreción, adicionalmente la dieta de los ejemplares conservados se basaba solo en *Lactuca savita* (lechuga), en un trabajo publicado por *Santana et al* (Santana et al., 2012) se demostró que esto mejoraba el efecto cicatrizante de la secreción mucosa, aunque no hay evidencia sustancial de cambios en la expresión de moléculas presentes en esta, es un punto a considerar para próximos ensayos sobre la secreción (**Tabla 5**).

Con base en los ensayos de actividad antimicrobiana mencionados en la **Tabla 5**, para las siguientes etapas se decidió trabajar con la muestra proveniente del barrio La Paz, Floridablanca ya que exhibió los resultados más promisorios sobre SARM.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Tabla 5**

Porcentaje de inhibición de la secreción mucosa contra SARM desde los diferentes puntos de recolección.

Lugar de recolección	Porcentaje de inhibición
	SARM
Floridablanca	67.78 ± 1.14 ^a
Girón	60.38 ± 1.95 ^b
Bucaramanga	50.68 ± 2.23 ^c
Laboratorio	19.12 ± 1.79 ^d

Nota: Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas frente al control (valor de $p < 0.001$)

En la segunda etapa, se evaluó el efecto antimicrobiano de la secreción mucosa homogenizada a diferentes concentraciones frente a SARM (**Tabla 6**), y se determinó que a una concentración de 1000 µg/mL el porcentaje de inhibición promedio fue de 34.11±3.76%, siendo el mejor resultado encontrado (valor- $p = < 0.0001$).

En la tercera etapa se evaluó el efecto antimicrobiano sobre SARM de la secreción mucosa purificada con Sephadex G-25 y liofilizada a diferentes concentraciones (**Figura 13**). El mejor resultado que se encontró fue a la concentración de 1000 µg/mL donde se determinó un porcentaje de inhibición de 46.25±4.56%, evidenciando un incremento en el efecto antimicrobiano al ser comparada con la secreción mucosa homogenizada (valor- $p = 0.0114$).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Tabla 6**

Porcentaje de inhibición de la secreción mucosa homogenizada contra a SARM a diferentes concentraciones

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	SARM
1000	34.11 \pm 3.76 ^a
500	19.94 \pm 5.40 ^b
250	14.79 \pm 4.40 ^c
125	8.82 \pm 5.64 ^{N.S}

Nota: Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores \pm desviación estándar.

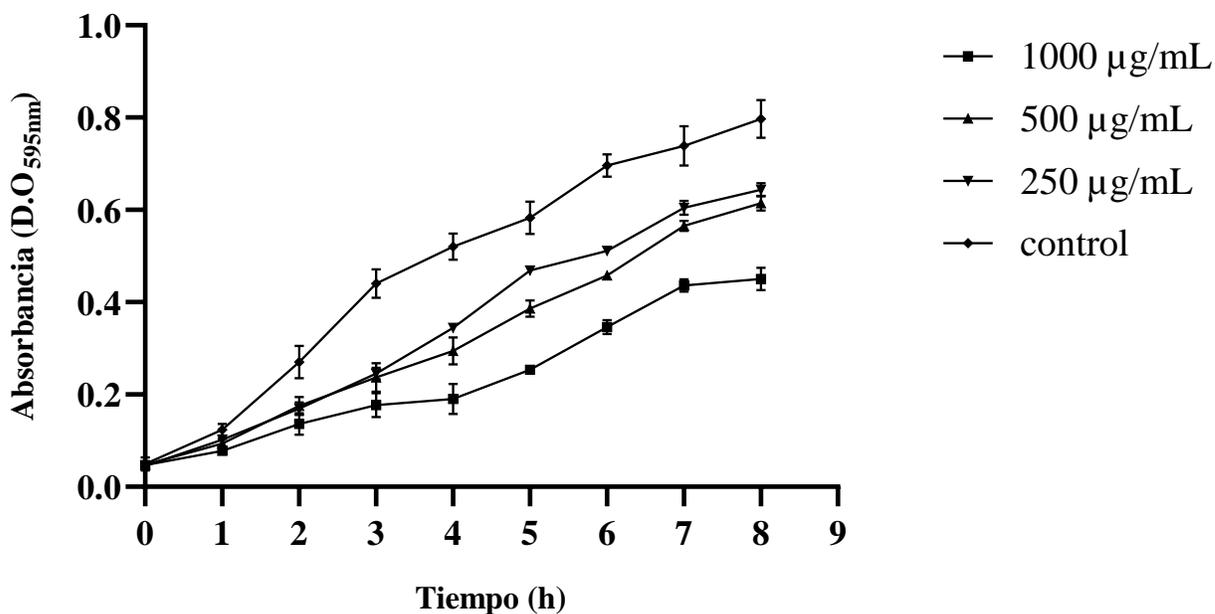
Las letras en el superíndice indican diferencias significativas frente al control. (valor de $p < 0.05$).

N.S: No se observan diferencias significativas.

Una vez obtenidas las fracciones por RP-HPLC se evaluó el potencial antimicrobiano de cada una de ellas frente a SARM. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 7**. A partir de los cuales se concluye que la fracción 01 (F-01) presenta el mejor efecto antimicrobiano frente a SARM con 65.06 \pm 3.07% de inhibición a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. La CMI₅₀ de la fracción 01 fue de 628.6 $\mu\text{g/mL}$ frente a SARM. Las demás fracciones obtenidas mostraron tener efecto antimicrobiano contra SARM, pero considerablemente menor en comparación con la fracción 01.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 14**

Ensayo de cinética de crecimiento, efecto antimicrobiano de los extractos purificados con Sephadex G-25 Frente a SARM.

**Tabla 7**

Porcentaje de inhibición de las fracciones purificadas por RP-HPLC frente a SARM.

Concentración (µg/mL)	Fracción 01	Fracción 02	Fracción 03	Fracción 04	Fracción 05
1000	65.06±3.07 ^a	34.57±4.57 ^b	39.11±3.55 ^b	13.92±3.06 ^c	13.09±2.38 ^c
500	40.39±2.41 ^b	34.07±5.6 ^b	33.46±2.2 ^b	11.51±2.2 ^c	10.24±1.83 ^c
250	39.16±4.01 ^b	30.96±7.2 ^b	32.97±2.52 ^b	9.42±2.93 ^c	8.03±2.66 ^c
125	32.61±6.04 ^b	31.17±6.8 ^b	25.41±5.12 ^b	7.28±2.5 ^c	7.01±1.99 ^c

Nota: Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas (valor de p <0.05)

En las gráficas de cinética de crecimiento de SARM tratado con la fracción 01 (**Figura 14**), podemos evidenciar que la inhibición se inicia en la fase de latencia y se presenta un retraso en la entrada en la fase exponencial. Hacia la sexta hora, se observa un aumento en la absorbancia, lo

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

cual podría interpretarse como una disminución o agotamiento del efecto antimicrobiano de la gfracción evaluada.

Tabla 8

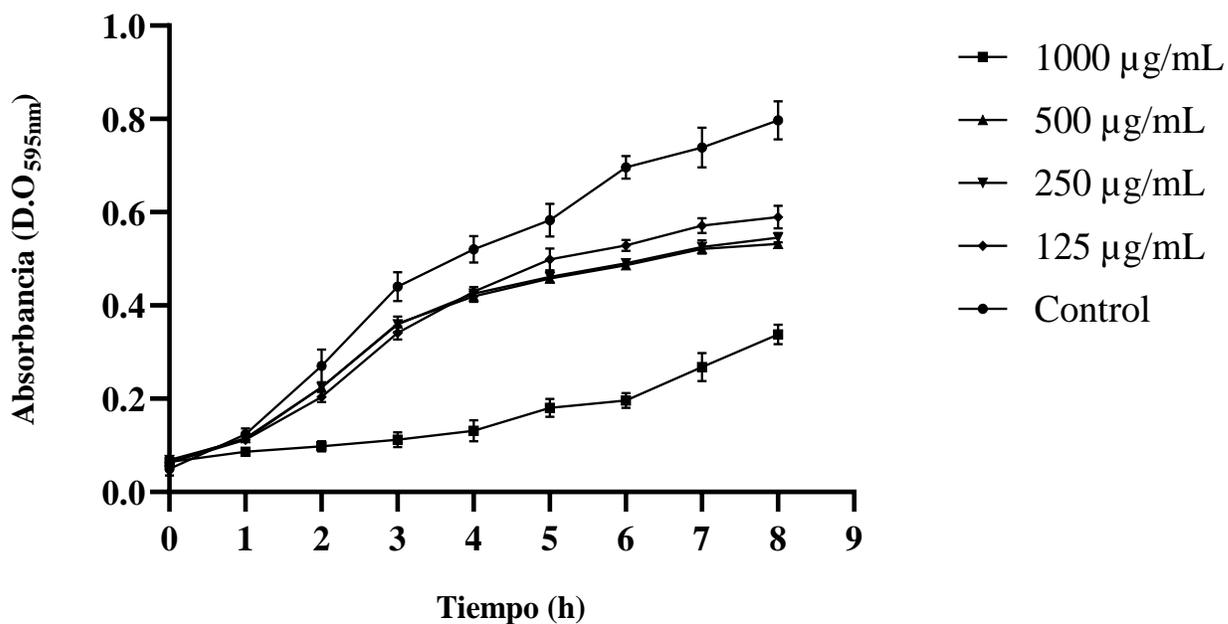
Actividad antimicrobiana de las fracciones recuperadas por HPLC frente a Staphylococcus aureus resistente a meticilina.

CMI ₅₀	
Fracción 01	628.6 µg/mL
Fracción 02	ND
Fracción 03	ND
Fracción 04	ND
Fracción 05	ND

ND: No determinada

Figura 15

Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 01 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.

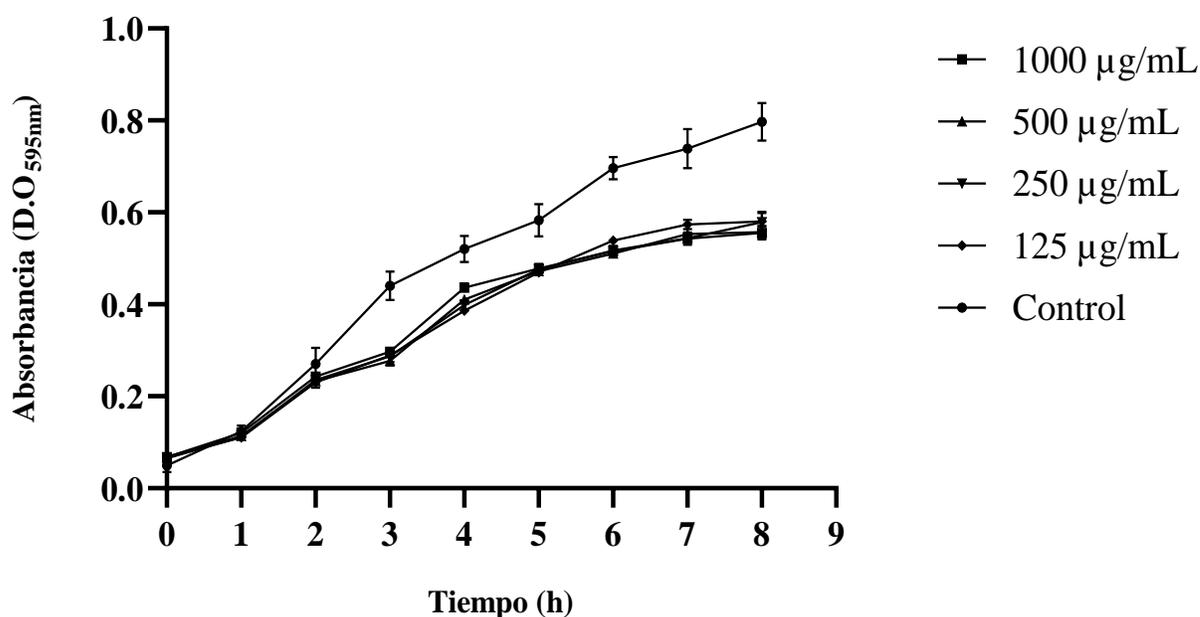


ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

En la cinética de crecimiento de SARM tratado con la fracción 02 (**Figura 15**), se observa que a partir de la tercera hora hay una ligera inhibición sobre el crecimiento del microorganismo comparado con el control. De otro lado, en la gráfica de cinética del microorganismo tratado con la fracción 03 (**Figura 16**) se observa inhibición del crecimiento del microorganismo al inicio de la fase exponencial, la cual se mantiene en el tiempo.

Figura 16

Ensayo de cinética de crecimiento, efecto antimicrobiano de la fracción 02 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.



En las gráficas de cinética de crecimiento de SARM tratado con las fracciones 04 y 05 (**Figuras 17 y 18**) no se observan cambios significativos con ninguna de las concentraciones evaluadas, en comparación con el control. Con esto se puede concluir, que el efecto antibacteriano que presentan estas fracciones es escaso o nulo frente a este microorganismo.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Al correlacionar los resultados de cinética de crecimiento bacteriano de las fracciones obtenidas por RP-HPLC con lo observado por espectrometría de masas se puede inferir que la molécula con una masa de 2145.237 Da [M+H] detectada en las fracciones F-01, F-02, F-03, probablemente está involucrado con la actividad biológica antimicrobiana, ya que, aunque se encuentra en las tres fracciones que mostraron inhibición sobre SARM, en la fracción F-01 se evidencia su mayor efecto antimicrobiano comparado con las restantes donde se encuentra acompañado de otras moléculas biológicas, las cuales pueden influir negativamente en su actividad biológica o existe la posibilidad que en esta fracción se encuentren otras moléculas pequeñas no detectadas que tengan un papel en el efecto antimicrobiano.

Aunque la secreción mucosa posee una gran variedad de componentes (Pereira et al., 2016), en el trabajo realizado por *Iguchi et al* (Iguchi et al., 1982) quienes evaluaron las propiedades antimicrobianas de la secreción mucosa luego de realizar una digestión enzimática tanto de los carbohidratos como de las proteínas, demostrando que al eliminar estas últimas la secreción perdía su efecto sobre los microorganismos, es muy probable que las propiedades antimicrobianas de la secreción mucosa están relacionadas con las proteínas/péptidos presentes en esta; por este motivo y debido a los procesos de purificación realizados sobre la secreción en este trabajo, se cree que la señal detectada por espectrometría de masas es un péptido.

En los estudios con la secreción mucosa de *Achatina fulica* se ha demostrado que ésta posee actividad biológica antimicrobiana frente una gran variedad de microorganismos. De otro lado se han caracterizado diferentes proteínas y péptidos involucradas con esta propiedad (15–17,61,62); por ejemplo, las proteínas achacin (15,16), Achatin CRP (C-reactive protein por sus siglas en

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

inglés) (61) y el péptido Mytimacin-AF (17) son las moléculas caracterizadas hasta el momento. Se han encontrado otras proteínas con potencial antimicrobiano, con pesos moleculares de 50,81 kDa, 15 kDa, 11,45 kDa las cuales no han sido caracterizadas en su totalidad (24).

En este estudio se encontró un probable péptido de 2145.237 Da [M+H] el cual parece ser el responsable de exhibir la actividad biológica antimicrobiana en la secreción mucosa. Al comprar estos resultados con los publicados por *E-kobon et al* (E-Kobon et al., 2016), donde identificaron 20 péptidos con un tamaño menor a 3kDa, de los cuales algunos mostraron un efecto anticancerígeno promisorio contra células MCF-7, la señal encontrada en la fracción F-01 pueden estar relacionadas con los péptidos identificados en este estudio, no obstante, futuros estudios son necesarios para caracterizar esta molécula con el fin de determinar si se trata de un nuevo péptido o uno ya identificado, y adicionalmente explorar más su potencial bioactivo.

Diferentes autores han evaluado la actividad biológica antimicrobiana de la secreción mucosa de *A. fulica* sobre varios microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos (63), pero solo en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se ha trabajado con a SARM (23), aunque en este se evaluó el efecto de la secreción mucosa completa pero no se realizó purificación o fraccionamiento de esta, por este motivo los resultados de la CI_{50} varían entre ambos trabajos.

Según diferentes publicaciones el principal mecanismo de acción propuesto para los péptidos antimicrobianos es la interacción y disrupción de la membrana bacteriana generando la muerte del microorganismo (48); con los ensayos realizados en este trabajo no se pudo determinar si la

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

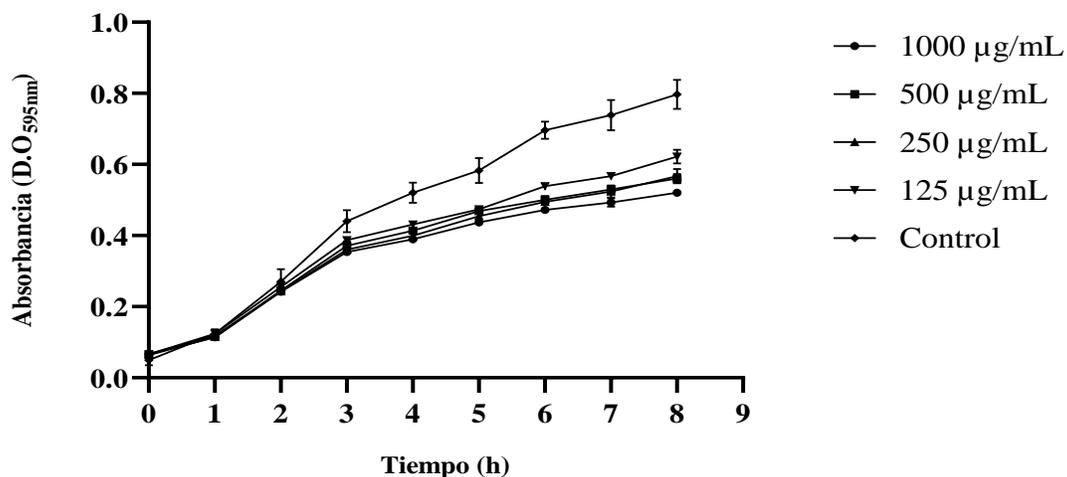
secreción mucosa y sus fracciones tienen un efecto bacteriostático o bactericida sobre SARM, por lo tanto, ensayos complementarios se requieren para elucidar su mecanismo de acción.

A partir de estos ensayos microbiológicos *in vitro* se evidenció la actividad antimicrobiana de la secreción mucosa y sus fracciones, demostrando su potencial como posible agente antimicrobiano en el tratamiento de infecciones generadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Se hace necesario la realización de estudios adicionales para evaluar la actividad biológica antimicrobiana de las fracciones de *A. fulica in vivo*, y adicional determinar su efecto citotóxico.

De manera adicional se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana sobre diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto de la secreción completa, como de sus fracciones semi-purificadas (Anexo E), donde se observó un bajo porcentaje de inhibición sobre los microorganismos evaluados.

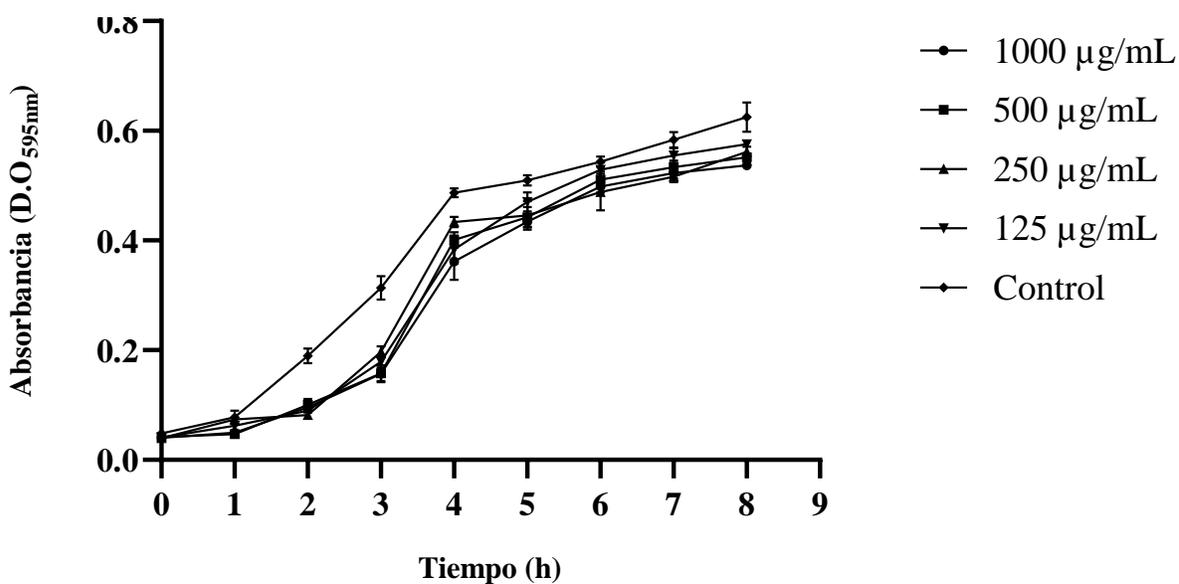
Figura 17

Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 03 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.

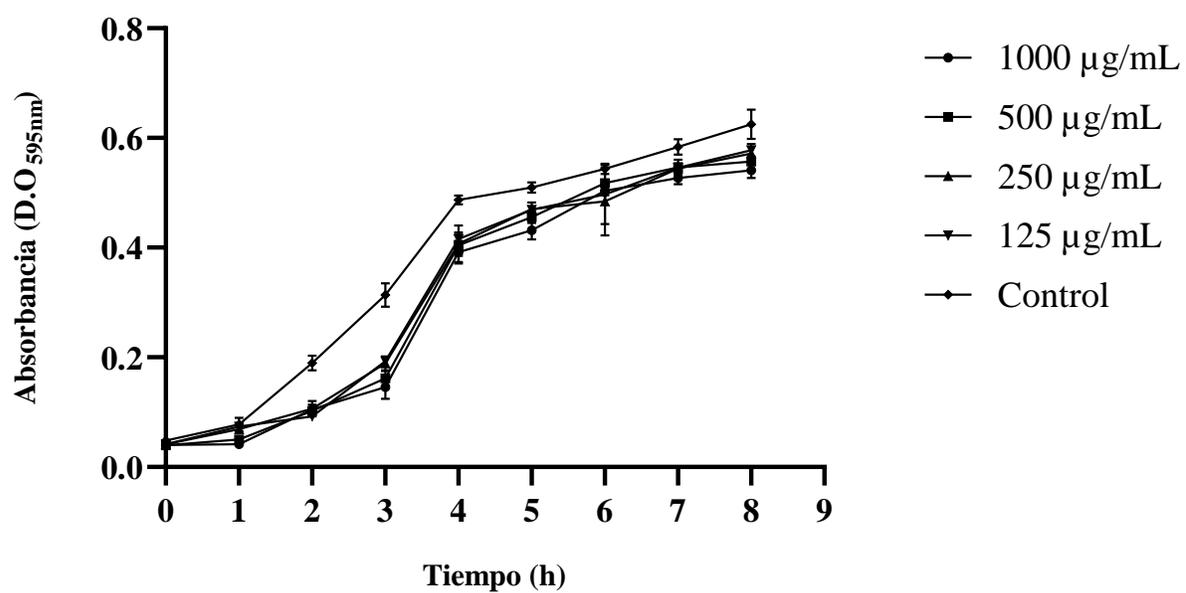


ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Figura 18**

Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 04 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.

**Figura 19**

Ensayo de cinética de crecimiento. Efecto antimicrobiano de la fracción 05 obtenida por RP-HPLC frente a SARM.



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***6. Conclusiones.**

Las condiciones de extracción de proteína utilizando la metodología descrita por *Zhong et al* modificada agregando inhibidores de proteasas y agitación constante por 24 horas, permitieron recuperar la mayor cantidad de proteínas (1322 $\mu\text{g/mL}$) presente en la secreción mucosa.

Se comprobó que la secreción mucosa de *A. fulica*, así como sus fracciones semi-purificadas, presentan actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus* Resistente a Meticilina.

La secreción mucosa homogenizada y la secreción mucosa homogenizada tratada con Sephadex G-25 presentaron un porcentaje de inhibición de $34.11 \pm 3.76\%$ y $46.25 \pm 4.56\%$, respectivamente, contra *S. aureus* Resistente a Meticilina a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Mediante espectrometría de masas se pudo determinar la presencia de un posible péptido con una masa de 2145.237 Da [M+H] en la fracción F-01, el cual exhibió un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* Resistente a Meticilina con una CI_{50} de 628.6 $\mu\text{g/mL}$.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***7. Recomendaciones**

- Realizar la caracterización de los posibles péptidos con actividad antimicrobiana encontrados para sintetizarlos químicamente y comprobar el potencial biológico frente a diferentes microorganismos de importancia clínica.
- Determinar los posibles mecanismos de acción antimicrobianos de la secreción mucosa y sus moléculas aisladas sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante análisis metabólicos.
- Realizar estudios adicionales para evaluar la actividad biológica antimicrobiana de las moléculas encontradas de *A. fulica in vivo*.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Referencias Bibliográficas**

- Balandin, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2016a). Antimicrobial peptides of invertebrates. Part 2. biological functions and mechanisms of action. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(4), 343–360. <https://doi.org/10.1134/S106816201604004X>
- Balandin, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2016b). Antimicrobial peptides of invertebrates. Part 1. structure, biosynthesis, and evolution. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(3), 229–248. <https://doi.org/10.1134/S1068162016030055>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs , no drugs : No ESKAPE ! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 1–18. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. En *Analytical Biochemistry* (Vol. 72).
- CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*). (2020). <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>
- Castañeda Casimiro, J., Ortega roque, J. A., Venegas Medina, A. M., Aquino andrade, A., Serafín López, J., Estrada parra, S., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 18(1), 16–29.
- Castro-Orozco, R., Villafañe-Ferrer, L., Rocha-Jiménez, J., & Alvis-Guzmán, N. (2018). Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multirresistencia, Cartagena (Colombia). *Biosalud*, 17(2), 25–36. <https://doi.org/10.17151/biosa.2018.17.2.2>

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Chen, W., & Ji, Y. (2020). Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2069). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_9
- Cires Pujol, M. (2002). La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(2), 165–168.
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13), 135102. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>
- E-Kobon, T., Thongararm, P., Roytrakul, S., Meesuk, L., & Chumnanpuen, P. (2016). Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.11.005>
- Eduardo, J. dos S. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. En *Tesis de Doctorado*.
- Frieden, T. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. En *Centers for Disease Control and Prevention*. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>
- Gauri, S. S., Mandal, S. M., Pati, B. R., & Dey, S. (2011). Purification and structural characterization of a novel antibacterial peptide from *Bellamya bengalensis*: Activity against ampicillin and chloramphenicol resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Peptides*, 32(4), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.014>

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Ghosh, A. K., Hirasawa, N., Lee, Y. S., Kim, Y. S., Shin, K. H., Ryu, N., & Ohuchi, K. (2010). Inhibition by acharan sulphate of angiogenesis in experimental inflammation models. *British journal of pharmacology*, 137(4), 441–448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704905>
- Iguchi, S. M., Aikawa, T., & Matsumoto, J. J. (1982). Antibacterial Activity of Snail Mucus Mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72(3), 571–574.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2015). *Informe especial: Caracol Gigante Africano*. ICA. <https://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/Informe-especial-Caracol-Gigante-Africano.aspx>
- Instituto Nacional de Salud, & Grupo de Riesgos en inocuidad de alimentos y plagas. (2016). *Concepto Científico sobre consumo de caracol gigante africano y su implicación en salud*.
- ISSG. (2015a). *GISD- Achatina fulica*. <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=64>
- ISSG. (2015b). *Species profile Achatina fulica*. Global Invasive Species Database.
- Kanzawa, N., Shintani, S., Ohta, K., Kitajima, S., Ehara, T., Kobayashi, H., Kizaki, H., & Tsuchiya, T. (2004). Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.12.007>
- Kinch, M. S., Haynesworth, A., Kinch, S. L., & Hoyer, D. (2014). An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013. *Drug Discovery Today*, 19(8), 1033–1039. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.018>
- Kubota, Y., Watanabe, Y., Tamiya, T., Tsuchiya, T., & Matsumoto, J. J. (1985). Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82(2), 345–348.
- Kurlenda, J., & Grinholc, M. (2012). *Alternative therapies in Staphylococcus aureus diseases*.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Labarca, J., & Araos, R. (2009). Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. *Revista Chilena Infectología*, 26(Supl 1), 8–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000300001>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135–145.
- Loriga, W. H., Padrón Álvarez, J. E., Pérez, A., González Díaz, J., Liudmila, I., Mayea, R., Arango, I. B., Germán, I., Dupeyrón, B., Piñera, O. L., Moraima, I., Moreno, Á., Yarely, I., Lima, C., Odalis, I., Labrador-Piloto, L., Díaz Rodríguez, D., Portela, J. S., Luanda, I., & Cámara, S. (2018). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En *Revista Cubana de Medicina Tropical* (Vol. 70, Número 2).
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2004). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A selection from the Global Invasive Species Database. En *The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN)* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1614/WT-04-126.1>
- Mafranenda dn, herluinus, listiana Kriswandini, indah, & arijani, E. (2014). Antimicrobial proteins of Snail mucus (*Achatina fulica*) against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

actinomycetemcomitans. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*, 47(1), 31–36.
<https://doi.org/10.20473/j.djmk.v47.i1.p31-36>

- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(20), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
- Martínez, J. A., & Sánchez, F. (2007). Mecanismo de Acción de los antibióticos. *jano*, 1660, 28–34.
- Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.*, 69(2), 185–192.
<https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
- Obara, K., Otsuka-Fuchino, H., Sattayasai, N., Nonomura, Y., Tsuchiya, T., & Tamiya, T. (1992). Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Férussac. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17254.x>
- Ogawa, M., Nakamura, S., Atsuchi, T., Tamiya, T., Tsuchiya, T., & Nakai, S. (1999). Macromolecular antimicrobial glycoprotein, achacin, expressed in a methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 448(1), 41–44.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00327-0)
- OMS. (2014). Antimicrobial resistance, Global Report on Surveillance. En *Organización Mundial de la Salud*. Organización Mundial de la Salud.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- OMS. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*.
- OMS. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. En *World Health Organization*. Organización Mundial de la Salud.
- Ondusko, D. S., & Nolt, D. (2018). Staphylococcus aureus. *Pediatrics in Review*, 39(6), 287–298. <https://doi.org/10.1542/pir.2017-0224>
- Park, S. C., Park, Y., & Hahm, K. S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5971–5992. <https://doi.org/10.3390/ijms12095971>
- Pereira, A. E., Rey, A., López, J. P., Castro, J. P., & Uribe, N. (2016). Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana de la secreción mucosa de *Achatina fulica*. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*, 48(2), 188–195.
- Raut, S. K., & Barker, G. M. (2002). *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture. En G. M. Barker (Ed.), *Molluscs as crop pests* (pp. 55–114). CABI Publishing, Wallingford. <https://doi.org/10.1079/9780851993201.0055>
- Rivas, L., & Andreu, D. (2003). Péptidos antibióticos eucarióticos : ¿una nueva alternativa en clínica? *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(7), 358–365. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72963-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72963-2)
- Sanchez, M. L. (2016). Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. *Bioquímica y Patología Clínica*, 80(1), 36–43.
- Santana, W. A., Melo, C. M. de, Cardoso, J. C., Pereira-Filho, R. N., Rabelo, A. S., Reis, F. P., & Albuquerque-Júnior, R. L. C. de. (2012). Assessment of Antimicrobial Activity and Healing Potential of Mucous Secretion of *Achatina fulica*. *International Journal of Morphology*,

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

30(2), 365–373. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000200001>

- Skinner, D. (1941). Significance of bacteremia caused by staphylococcus aureus. *Archives of Internal Medicine*, 68(5), 851. <https://doi.org/10.1001/archinte.1941.00200110003001>
- Smith, R. A., M'ikanatha, N. M., & Read, A. F. (2015). Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Communication*, 30(3), 309–314. <https://doi.org/10.1080/10410236.2014.943634>
- Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H. M., Styrvold, O. B., Li, C., & Stensvåg, K. (2011). Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology Advances*, 29(5), 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.021>
- Suarez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán, A. M., & Villegas, M. V. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), 85–93.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226.
- Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., & Bartlett, J. G. (2006). Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 657–668. <https://doi.org/10.1086/499819>
- Taylor, J., Hafner, M., Yerushalmi, E., Smith, R., Bellasio, J., Vardavas, R., Bienkowska-gibbs, T., & Rubin, J. (2014). *Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: Model and Results*.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)

Tempone, A. G. (2007). Cutaneous secretion from the giant African snail , *Achatina fulica* , as a source of Antileishmanial compounds. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1), 73–77.

Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2020). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*, 29(1), 36–42.

<https://doi.org/10.1002/pro.3714>

Xia, X., Cheng, L., Zhang, S., Wang, L., & Hu, J. (2018). The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(1), 5–26. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0929-0>

Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). Staphylococcus aureus persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1102–1119. <https://doi.org/10.1111/jam.14706>

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(24), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>

Zhong, J., Wang, W., Yang, X., Yan, X., & Liu, R. (2013). A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides*, 39(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.001>

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Apéndices****Apéndice A. Protocolo para la obtención, homogenización y purificación de la secreción mucosa de *Achatina fulica*****Recolección de especímenes de *Achatina fulica*****Materiales y Reactivos**

- Recipiente contenedor de plástico.
- Guantes de nitrilo
- Regla (Para medir la concha del caracol)

Procedimiento

- 1) Determinar las zonas donde se realizará la recolección, indagando los lugares donde se haya reportado el avistamiento del caracol.
- 2) Preparar los materiales necesarios para la captura.
- 3) Confirmar los participantes que colaboraran en la salida para ajustar el presupuesto necesario (transportes, alimentación).
- 4) Se sugiere realizar la recolección entre las 6-10 a.m., de preferencia posterior a un día lluvioso y que se permita la entrada al laboratorio, esto con el fin de minimizar el tiempo entre la recolección y la obtención de la secreción.
- 5) Los especímenes se identificarán por las características morfológicas de la concha, solo se colectarán aquellos que la longitud concha mida entre 5 y 12 cm.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Obtención de la secreción mucosa

Materiales y Reactivos

- Recipiente contenedor de plástico
- Guantes de nitrilo
- Tapabocas
- Gorro
- Batería de 9 Voltios
- Conector para batería de 9v
- Tubos Falcon de 50 mL
- Gasa estéril
- Torundas de algodón
- Solución yodada
- Agua Tipo 1

Equipos

- Cámara de flujo laminar

Procedimiento

- 1) Antes de la manipulación de los caracoles equiparse con todos los implementos de bioseguridad (Gorro, tapabocas, guantes, bata).
- 2) En el lavamanos, realizar un lavado de los caracoles con abundante agua para eliminar la tierra y residuos adheridos a ellos, transferir a un recipiente limpio diferente al usado para su transporte hasta el laboratorio.

En la cámara de flujo laminar.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- 3) Usar guantes nuevos al iniciar el trabajo en la cámara de flujo laminar.
- 4) Tomar uno de los especímenes y realizar una limpieza con la gasa estéril y la solución yodada sobre el pie con énfasis en la zona cercana al Pneumostoma (orificio respiratorio)
Figura 02a.
- 5) Tomar el caracol en forma vertical y ponerlo en contacto con los electrodos durante 5 segundos.
- 6) Retirar los electrodos y recolectar la secreción en tubos Falcon de 50 mL estériles.
- 7) Repetir los dos pasos anteriores a intervalos de 20 segundos, un máximo de 4 veces por cada ejemplar.
- 8) Realizar el mismo procedimiento con cada caracol hasta obtener un volumen de 20 mL máximo por cada tubo Falcon.

Homogenización de la secreción.

Materiales y Reactivos

- Recipiente contenedor de plástico.
- Guantes de nitrilo
- Tubos Falcon de 50 mL
- Gasa estéril
- Torundas de algodón
- Solución yodada
- Buffer PBS con inhibidores de proteasas (protocolo de preparación de soluciones)
- Erlenmeyer estériles

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Probeta estéril
- Pipetas Pasteur plásticas
- Papel aluminio
- Agua Tipo 1

Equipos

- Agitador orbital
- Centrifuga refrigerada

Procedimiento

- 1) En un Erlenmeyer estéril agregar un volumen de PBS con inhibidores de proteasas por cada uno de Secreción: Ejemplo 20 mL de secreción - 20 mL de PBS con inhibidores de proteasas.
- 2) Sellar el Erlenmeyer con papel aluminio y cinta.
- 3) Agitar la solución por 24 horas a 250 RPM
- 4) Centrifugar a 8000g por 10 min a una temperatura de 4°C
- 5) Recuperar el sobrenadante, usando pipetas Pasteur.
- 6) Conservar a -20°C.

Purificación con Sephadex.

Esta sección del protocolo debe realizarse en el Laboratorio del GIBIM (Sede central) o en el Laboratorio de masas (sede Guatiguara) ya que aquí se encuentran los equipos necesarios para realizar este procedimiento.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Materiales y Reactivos

- Guantes de nitrilo
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Sephadex G-10, G-25
- Agua Tipo 1
- Cartucho o Columna de plástico sin empaquetar o Jeringas.
- Pipetas Pasteur plásticas.

Equipos

- Manifold (colector de vacío para cartuchos o columnas) Figura 3b
- Bomba de vacío
- Micropipeta de 1000 μL

Procedimiento

Montaje de los cartuchos de Sephadex.

Esta parte es opcional ya que los cartuchos de Sephadex se pueden adquirir comercialmente ya empaquetados.

- 1) Resuspender 1g de Sephadex (G-25 o G-10) en 100 mL de agua Tipo I.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- 2) Agitar a 200 RPM por 30 minutos.
- 3) En una columna o una jeringa de 10 mL con un filtro de fibra de vidrio, agregar por goteo el Sephadex, hasta alcanzar el nivel deseado.
- 4) Equilibrar la columna agregando agua tipo I

Purificación de la secreción mucosa.

1. Tomar las columnas de Sephadex G-10 o G-25 (0.6 cm x 10 cm) unir las al manifold y equilibrarlas pasando 15 mL Agua tipo I por gravedad, cuando el volumen del agua este cerca al límite del Sephadex cerrar la válvula de paso del manifold.
2. Encender la bomba de vacío y ajustar la presión del manifold entre 10-15 mmHg.
3. Agregar 5 mL de la secreción mucosa homogenizada por lentamente tratando de no levantar el Sephadex sedimentado, abrir la válvula para iniciar la elusión, dejar pasar 2 mL y luego iniciar la recolección, cuando el volumen llegue al límite del Sephadex cerrar la válvula.
4. Agregar 5 mL Agua Tipo I, abrir la válvula para continuar con la elusión, cuando el volumen llegue al límite del Sephadex cerrar la válvula. Recolectar todo el volumen eludido.
5. Realizar lavado de la columna con al menos 15 mL de Agua tipo I.
6. Repetir los pasos 3-5 hasta purificar toda la secreción.
7. La secreción mucosa purificada recolectada debe ser liofilizada, para lo cual se debe hacer lo siguiente:
 - a) En Frascos de vidrio de 10 mL agregar 6 mL de secreción mucosa purificada.
 - b) Tapar los frascos usando papel de Filtro y ligas elásticas pequeñas.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- c) Congelarlos de forma inclinada a -20°C .
 - d) Comunicarse con el profesional de apoyo encargado del liofilizador, para conocer el horario encendido del mismo y concertar una reunión para entrega y posterior recolección de las muestras.
 - e) Con una espátula plástica, realizar raspado de cada recipiente y agrupar en un solo contenedor para su posterior conservación.
8. Conservar el liofilizado recuperado a -20°C .

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Apéndice B. Protocolo para la obtención de fracciones la secreción mucosa de *Achatina fulica* por HPLC****Materiales y reactivos**

- Agua Tipo I
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido Trifluoroacético (TFA)
- Columna Hyperclone BDS C18, diámetro interno 4.6mm, longitud 250mm y tamaño de partícula 5 μ m.
- Guarda columna.
- Muestras para procesar
- Tubos Falcon
- Micropipetas
- Viales plásticos de 2 mL
- Jeringas de 5 mL
- Viales de vidrio de 2 mL de tapa con septa
- Filtros con porosidad 0.22 μ m
- Probetas
- Vasos de precipitado

Equipos

- Balanza analítica

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- Sistema de suministro de solvente HPLC con capacidad de gradiente binario y un detector de UV.
- Baño ultrasónico

Procedimiento

Preparación de los solventes:

Los solventes deben prepararse el mismo día que se van a utilizar, por tal motivo no se deben preparar en exceso.

- Solvente A: Agua Tipo I con TFA al 0.1%.
 1. En un vaso de precipitado agregar 250 mL de Agua Tipo I.
 2. Adicionar 250 μ L de TFA.
 3. Tomar la solución preparada, ponerla en el baño ultrasónico y sonicar por 15 minutos.
- Solvente B: Acetonitrilo con TFA al 0.1%.
 1. En un vaso de precipitado agregar 250 mL de Acetonitrilo grado HPLC
 2. Adicionar 250 μ L de TFA.
 3. Tomar la solución preparada, ponerla en el baño ultrasónico y sonicar por 15 minutos.

Preparación de la muestra

1. Disolver 10 mg de secreción mucosa liofilizada en 2 mL de Agua Tipo I.
2. Sonicar por 10 minutos en baño ultrasónico, esto con el fin de disolver totalmente el liofilizado resuspendido.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

3. Pasar la muestra por un filtro de 0.22 μm para eliminar el material no disuelto y posibles impurezas.

Equilibrar la columna

Conectar el guarda columna y la columna al HPLC y equilibre bajo las siguientes condiciones iniciales.

- A. Disolvente: 95% de Solvente A y 5% Solvente B
- B. Velocidad de flujo: 1 mL/min.
- C. Longitud de onda de detección: 215 nm.
- D. Temperatura: ambiente.

Mantener estos parámetros hasta que la línea base se estabilice, y se pueda empezar el montaje de las muestras

Inyección de la muestra y análisis

1. Una vez que se obtiene una línea base estable, inyectar 60 μL de la muestra mediante el inyector automático.
2. Realizar la elusión de la muestra mediante un gradiente entre el Solvente A y el Solvente B, así:

Tiempo de corrida (min)	Solventa A	Solvente B
0	95%	5%

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

5	80%	20%
10	50%	50%
15	70%	30%
20	20%	80%
25	95%	5%

-
3. Recolectar las fracciones, usando el colector de fracciones o manualmente.
 4. Eliminar el acetonitrilo presente en las fracciones, mediante el uso del SpeedVac usando los siguientes parámetros:
 - a. Temperatura 40°C.
 - b. Tiempo de calentamiento: 90 min.
 - c. Tiempo de centrifugado: 120 min.

Este ciclo se debe repetir hasta determinar que todo el acetonitrilo ha sido eliminado de la muestra.
 5. Las fracciones concentradas recolectadas deben ser liofilizadas, para lo cual se debe hacer lo siguiente:
 - a. En Frascos de vidrio de 10 mL agregar 6 mL de cada fracción.
 - b. Tapar los frascos usando papel de Filtro y ligas elásticas pequeñas.
 - c. Congelarlos de forma inclinada a -20°C.
 - d. Comunicarse con el profesional de apoyo encargado del liofilizador, para conocer el horario encendido del mismo y concertar una reunión para entrega y posterior recolección de las muestras.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

- e. Con una espátula plástica, realizar raspado de cada recipiente y agrupar en un solo contenedor para su posterior conservación.
6. Conservar el liofilizado recuperado a -20°C .

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Apéndice C. Protocolo para evaluar actividad antimicrobiana de la secreción mucosa y sus fracciones.

Materiales y Reactivos

- Medios de Cultivo
- Erlenmeyer
- Microplacas
- Cajas de Petri
- Agua peptonada al 0,1% estéril
- Microorganismos por evaluar
- Sustancias con actividad biológica

Equipos

- Agitador Orbital (Shaker)
- Micropipetas de 0.5-1000 ul.
- Vortex
- Cabina de Bioseguridad
- Balanza Analítica
- Lector de Microplacas de ELISA
- Plancha de Calentamiento
- Autoclave

Procedimiento

A. Preparación de medios de cultivo

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

-
- 1. Identificar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo:
 - Bacterias Gram negativas: Medio de Cultivo Luria Bertani (LB).
 - Bacterias Gram positivas: Medio de Cultivo Mueller Hinton (MH).
- 2. Preparar los medios de cultivo realizando el cálculo adecuado:
 - LB: 25g/L
 - MH: 21g/L (Se prepara diluido a la mitad, es decir 10.5g/L)
- 3. Preparar 30mL del medio de cultivo líquido adecuado dependiendo del microorganismo que se vaya a evaluar.
- 4. De los 30mL se toman 3mL, sobre los cuales se realizará el preinóculo.
- 5. El medio preparado se autoclavará durante 15 minutos.
- 6. Retirar de la autoclave y esperar que los medios se enfríen para utilizarlos (Si no se van a usar en el momento, por favor mantenerlos refrigerados).

B. Preinóculo

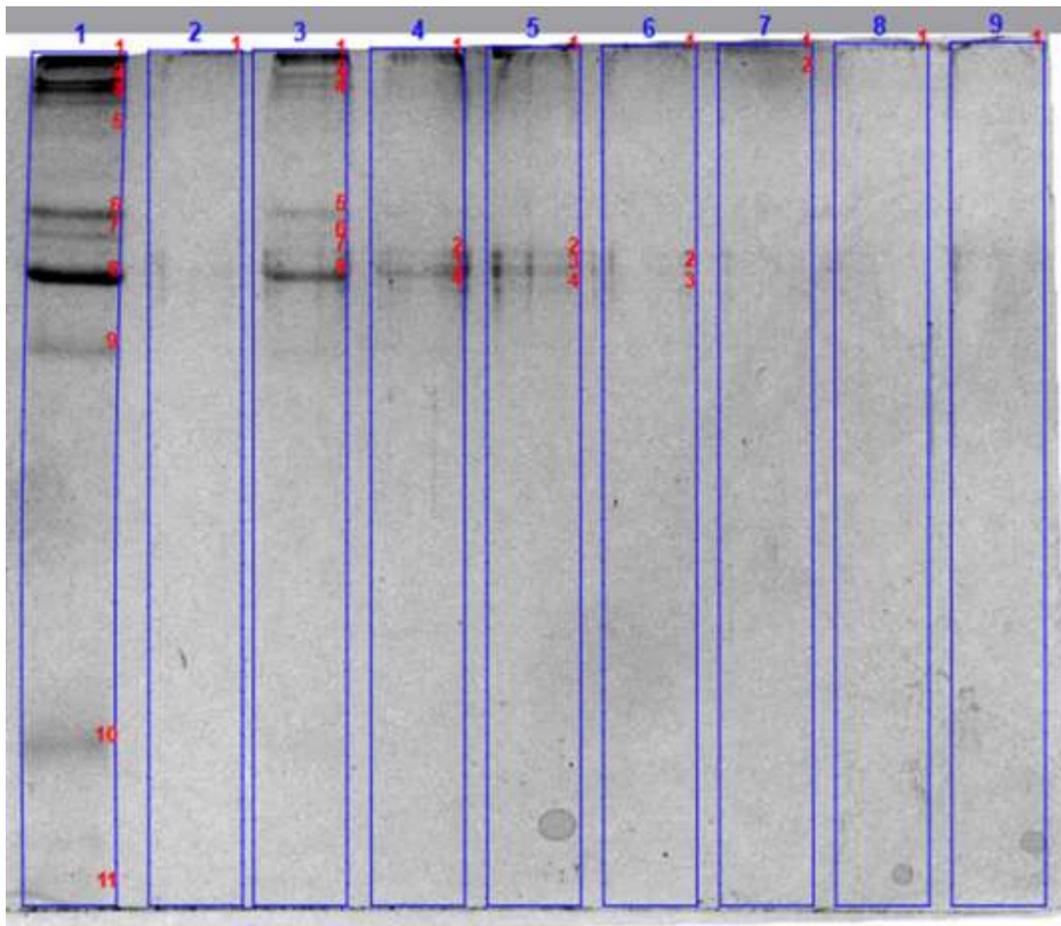
1. Realizar un repique por agotamiento de los microorganismos a evaluar e incubar a 37°C por 16-24 horas.
2. En cabina de flujo laminar realizar el preinóculo: Tomar 2-3 colonias de la bacteria de interés y depositarlas en los 3mL del medio de cultivo estéril apropiado dependiendo del microorganismo a evaluar
3. Dejar durante 12 horas en agitación a 200 rpm y una temperatura de 37°C.

C. Cinética de crecimiento

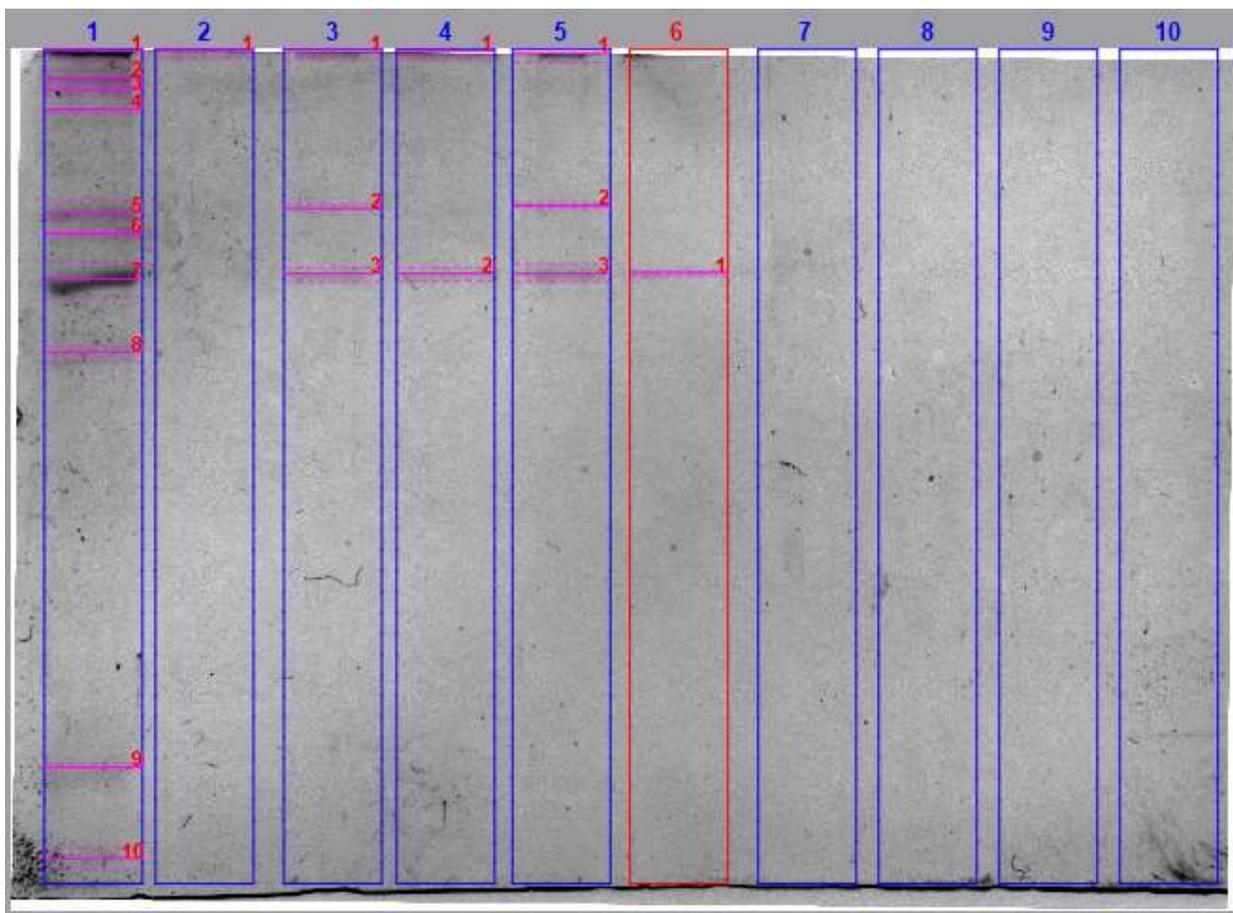
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

1. Después de las 12 horas de incubación resuspender 1 mL del preinóculo en 9 mL del medio de cultivo estéril.
2. Comprobar que el microorganismo se encuentre a 0.5 en la escala Mcfarland (densidad óptica entre 0.08 y 0.12) realizando una medición en el lector de ELISA a 595nm.
3. Tener establecidas las concentraciones a las cuales se va a probar la actividad biológica del posible agente antibacteriano, las cuales se prepararán en agua peptonada al 0.1%.
4. Realizar todos los ensayos por triplicado, manteniendo una relación 1:1 entre microorganismo y agente antibacteriano (100µL de medio inóculado y 100µL del agente antibacteriano en la concentración respectiva)
5. Además, realizar los diferentes blancos de la cinética:
 - Crecimiento positivo: 100µL del inóculo y 100µL del medio de cultivo estéril.
 - Blanco del medio de cultivo:
 - 100µL del medio de cultivo estéril y 100µL de Agua peptonada al 0.1% estéril
 - 100µL del medio de cultivo estéril y 100µL de cada una de las concentraciones a evaluar.

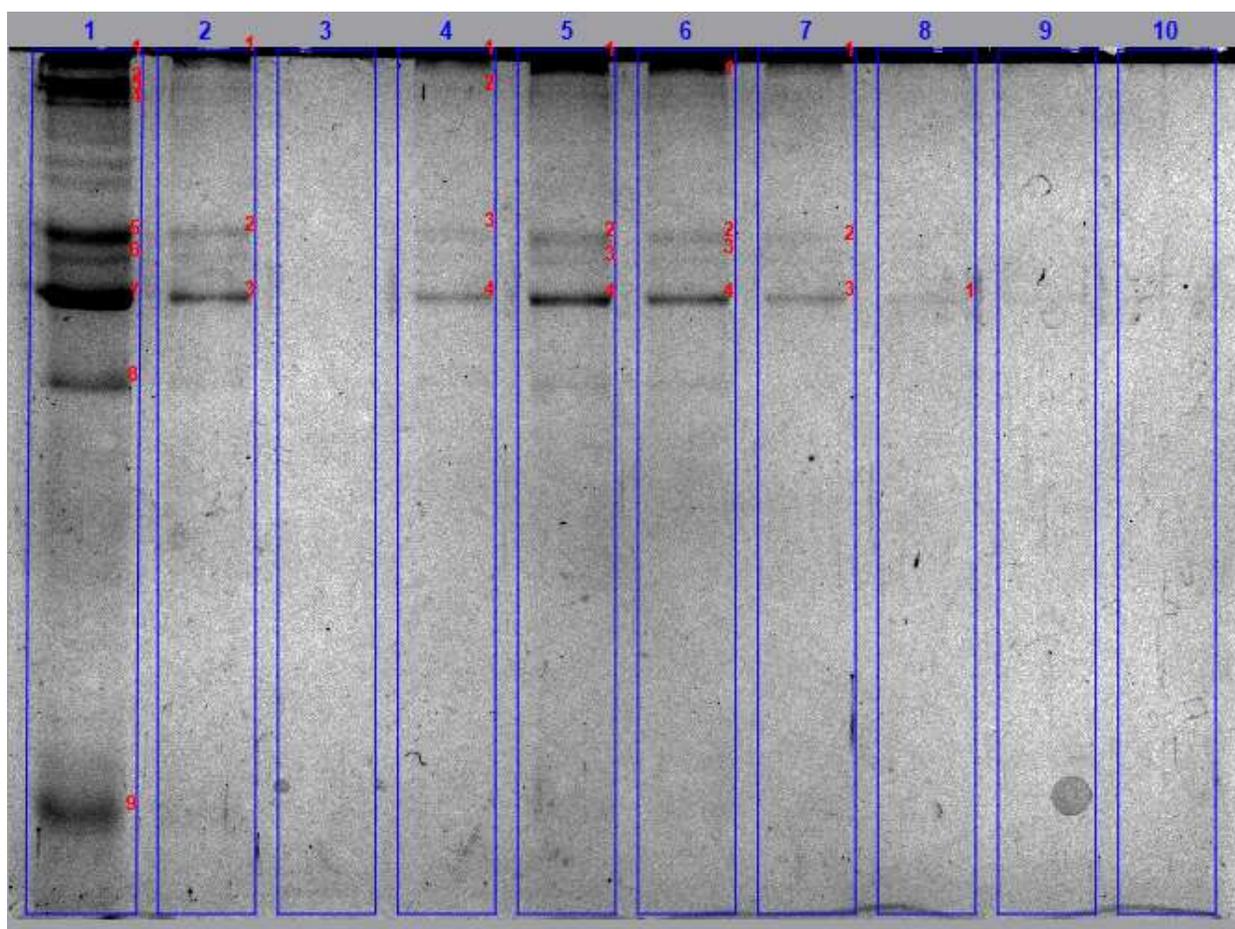
Este se realiza para garantizar que la turbidez reflejada pertenece solamente al microorganismo evaluado.
6. Realizar mediciones de absorbancia a 595nm durante 8 horas a intervalos de una hora.
7. Con los resultados obtenidos se construye una curva de cinética en Excel en el cual se compara el crecimiento positivo con el crecimiento del microorganismo en presencia del compuesto con posible actividad antibacteriana.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Apéndice D. Ensayos de purificación de la secreción mucosa mediante cromatografía de exclusión de tamaño.**

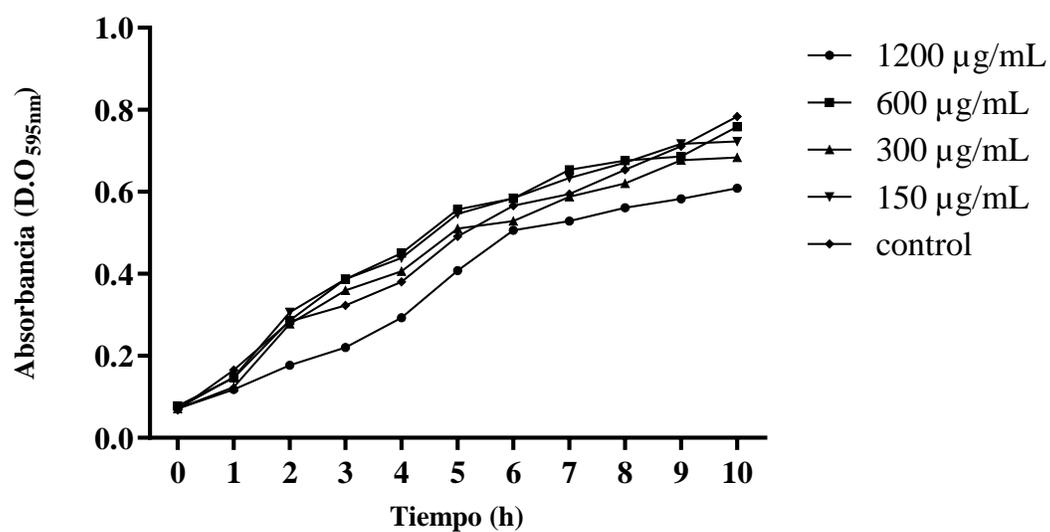
Perfil electroforético del segundo ensayo de fraccionamiento con Sephadex; **1).** Secreción Mucosa Homogenizada; **2).** Fracción No. 1-2; **3).** Fracción No. 3-4; **4).** Fracción No. 5-6; **5).** Fracción No. 7-8; **6).** Fracción No. 9-10; **7).** Fracción No. 11-12; **8).** Fracción No. 13-14; **9).** Fracción No. 15-16.

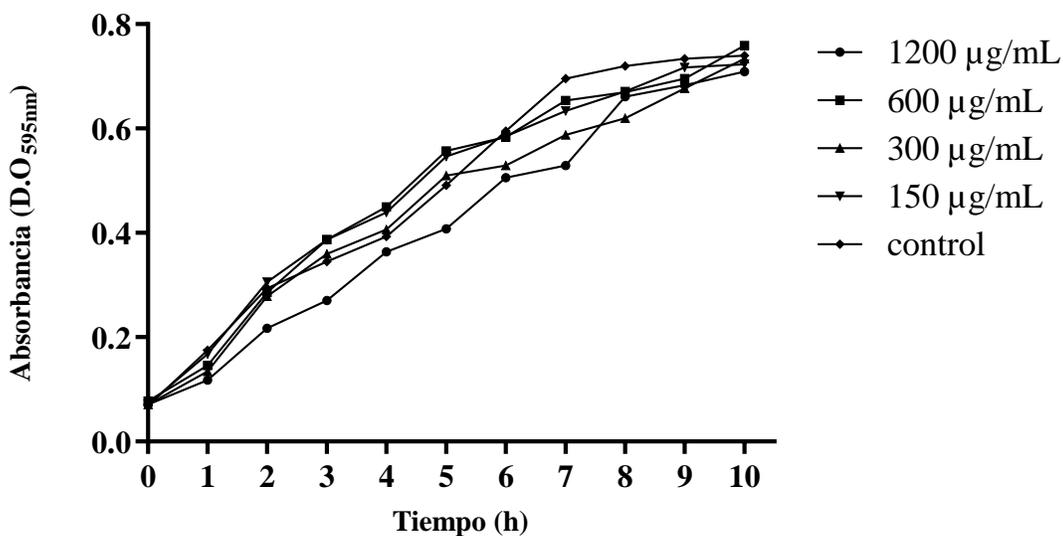
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Perfil electroforético del tercer ensayo de fraccionamiento con Sephadex, **1)** Secreción mucosa completa, **2)** Fracción No 4 recolectada con G-75, **3)** Fracción No 5 recolectada con G-75, **4).** Fracción No 6 recolectada con G-75, **5)** Fracción No 7 recolectada con G-75, **6)** Fracción No 8 recolectada con G-75, **7)** Fracción No 9-10 recolectada con G-75, **8)** Fracción No 11 y 12 recolectada con G-75, **9)** Fracción No 13 y 14 recolectada con G-75, **10)** Fracción No 15 y 16 recolectada con G-75.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica*

Perfil electroforético del cuarto ensayo de fraccionamiento con Sephadex, **1)** Secreción mucosa completa, **2)** 4 fracción recolectada con G-75, **3)** Fracción No 1 y 2 recolectada con G-75, **4).** Fracción No 3 y 4 recolectada con G-75, **5)** Fracción No 5 y 6 recolectada con G-75, **6)** Fracción No 7 y 8 recolectada con G-75, **7)** fracción No 9 y 10 recolectada con G-75, **8)** Fracción No 11 y 12 recolectada con G-75, **9)** Fracción No 13 y 14 recolectada con G-75, **10)** Fracción No 15 y 16 recolecta con G-75.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Apéndice E. Cinética de crecimiento de diferentes microorganismos tratados con la Secreción mucosa homogenizada.****Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 tratado con Secreción mucosa homogenizada**

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES DE *A. fulica***Cinetica de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* tratado con Secreción mucosa homogenizada****Cinetica de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* tratado con Secreción mucosa homogenizada**