



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

EFFECTO INHIBITORIO DEL PÉPTIDO MELITINA SOBRE LA
ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE β -LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO DE *ESCHERICHIA COLI*

INHIBITORY EFFECT OF THE PEPTIDE MELITTIN ON THE
HYDROLYTIC ACTIVITY OF EXTENDED SPECTRUM β -
LACTAMASE FROM *ESCHERICHIA COLI*

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

AUTORES

SHERIL INGRID RAMOS ALCANTARA
MARIA ALEJANDRA CORNEJO NAPAN

ASESOR

JESUS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

CO-ASESOR

MARIANO GIOVANNI LOPEZ CAMPANA

LIMA – PERÚ

2024

JURADOS

Presidente: MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez
Vocal: Mgr. Maria del Carmen Quispe Manco
Secretaria: MSc. Maribel Denise Riveros Ramirez

Fecha de Sustentación: 26 de agosto de 2024
Calificación: Aprobado

ASESORES DE TESIS

ASESOR

PhD. Jesus Humberto Tamariz Ortiz

Departamento Académico de Tecnología Médica - Facultad de Medicina

ORCID: 0000-0002-0827-8117

CO-ASESOR

MSc. Mariano Giovanni Lopez Campana

Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”

ORCID: 0000-0002-7436-0274

DEDICATORIA

A mis padres, Carlos y Olga, mi fuente de motivación constante y soporte emocional, cuya confianza plena depositada en mí se refleja hoy en la culminación de este trabajo. A Giovanni, su paciencia infinita, comprensión y apoyo incondicional fueron siempre un impulso para seguir adelante. A mi gran amiga y co-investigadora de este proyecto, Alejandra. Compartir este trabajo y enfrentar juntas las adversidades fortaleció nuestra amistad y creció mi admiración, respeto y confianza hacia ti.

Sheril Ramos

A mi madre y mis hermanas, les debo mi gratitud eterna por todos los sacrificios y el apoyo incondicional que me ha dado fuerzas y confianza para superar obstáculos y alcanzar mis metas. A mis grandes amigos, Sheril y Giovanni, a través de risas compartidas y lágrimas derramadas hemos desarrollado este exitoso trabajo de tesis. Gracias por haber compartido sus experiencias y haber confiado en mi persona y en mi potencial. A Jhonet, quien ha sido mi soporte emocional y me ha motivado durante mis momentos de duda y cansancio, espero que todos los proyectos que tengamos en mente se vuelvan pronto realidad.

Alejandra Cornejo

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros asesores, al Dr. Jesús Tamariz, jefe del Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos y Fagoterapia por encabezar el proyecto de investigación y habernos brindado las facilidades para realizar nuestro proyecto. Gracias al Msc. Giovanni López, quien nos iluminó con sus conocimientos y fue una guía constante durante este trabajo. Asimismo, a la Unidad de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” por brindarnos las instalaciones para el desarrollo del estudio. Por último, a quienes colaboraron con pequeños pero significativos aportes que nos permitieron continuar nuestro camino: Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos del IMT AvH, Unidad de Epidemiología Molecular Laboratorio (UEM), Laboratorio de Genómica Microbiana (LID), Laboratorio de Biotecnología y Biología molecular (UNMSM) y Laboratorio de Moléculas Individuales (LID).

FINANCIAMIENTO

El presente estudio es el resultado de un proyecto de investigación financiado por el “Fondo Apoyo a la Investigación” otorgado por la Universidad Peruana Cayetano

Heredia en julio del año 2022

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran que no hay conflictos de intereses potenciales con respecto a la investigación, autoría y/o publicación del presente estudio.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Efecto inhibitorio del péptido Melitina sobre la actividad hidrolítica de β -lactamasas de Espectro Extendido de *Escherichia coli*

INFORME DE ORIGINALIDAD

7 %	7 %	2 %	1 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1 %
2	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
3	www.elsevier.es Fuente de Internet	<1 %
4	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
5	cienciaspecuarias.inifap.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
6	upc.aws.openrepository.com Fuente de Internet	<1 %
7	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
8	Raquel Heras Mozos. "Envases activos basados en el anclaje covalente reversible de	<1 %

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	4
III. Materiales y Métodos.....	5
IV. Resultados	13
V. Discusión.....	16
VI. Conclusiones	21
VII. Recomendaciones	22
VIII. Referencias Bibliográficas	23
IX. Tablas, gráficos y figuras	31
Anexos.....	

RESUMEN

Antecedentes: Las enzimas β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) son el mecanismo de resistencia antimicrobiana más diseminado a nivel global. Existe poca atención sobre la prevención de la síntesis de β -lactamasas, que se puede lograr empleando compuestos de diversa naturaleza, entre ellos, los péptidos antimicrobianos. Melitina es un péptido antimicrobiano aislado del veneno de abeja o Apitoxina y ha demostrado tener efecto regulador intracelular sobre la síntesis de macromoléculas en bacterias. **Objetivo:** Evaluar la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M de *Escherichia coli* post exposición a concentraciones sub inhibitorias de Melitina purificada. **Materiales y métodos:** La purificación y caracterización de Melitina se realizó a partir de cristales de Apitoxina cruda. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de Melitina (MIC, por sus siglas en inglés) sobre cepas de *E. coli* BLEE tipo CTX-M. Las bacterias fueron tratadas con dosis sub inhibitorias de 0,5xMIC y 0,25xMIC de Melitina. Finalmente, se cuantificó la actividad enzimática de β -lactamasas mediante un ensayo cinético con nitrocefina. **Resultados:** La fracción Api<10kDa presentó una única banda proteica (2,8 kDa) correspondiente a Melitina purificada. La MIC promedio de Melitina frente a las cepas de estudio *E. coli* BLEE tipo CTX-M fue 60 μ g/ml. La dosis sub inhibitoria 0,5xMIC de Melitina redujo hasta un 67% la actividad enzimática de BLEE comparado a cepas no expuestas ($p < 0.002$). **Conclusiones:** Melitina a concentraciones sub inhibitorias inhibió la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M de *E. coli* y puede considerarse como una alternativa para futuras drogas contra bacterias productoras de BLEE.

Palabras clave: β -lactamasas de Espectro Extendido, Melitina, actividad enzimática, péptidos antimicrobianos

ABSTRACT

Backgrounds: Extended Spectrum β -lactamases (ESBL) are the most widespread antimicrobial resistance mechanism worldwide. There is little attention on the prevention of the synthesis of β -lactamases, which can be achieved using compounds of diverse nature, including antimicrobial peptides. Melittin is an antimicrobial peptide isolated from bee venom or Apitoxin and has been shown to have an intracellular regulatory effect on the synthesis of macromolecules in bacteria. **Aims:** To evaluate the hydrolytic activity of CTX-M type ESBL enzymes from *Escherichia coli* post exposure to sub-inhibitory concentrations of purified Melittin. **Methodology:** Purification and characterization of Melittin was carried out from Apitoxin crystals. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined in CTX-M type ESBL *E. coli*. Bacteria were treated with sub inhibitory doses of 0,5xMIC and 0,25xMIC of Melittin. Lastly, enzymatic activity of β -lactamases was quantified by a kinetic assay with nitrocefin. **Results:** The Api<10kDa fraction presented a single protein band (2.8 kDa) corresponding to purified Melittin. The average MIC of Melittin against the CTX-M type ESBL *E. coli* study strains was 60 μ g/ml. Sub inhibitory doses of 0,5xMIC of Melittin reduced up to 67% enzymatic activity of ESBL compared to no exposed strains ($p < 0.002$). **Conclusion:** Melittin at sub inhibitory concentrations inhibited hydrolytic activity of CTX-M type ESBL enzymes from *E. coli* and can be considered as an alternative for future drugs against ESBL producing bacteria.

Keywords: Extended spectrum β -lactamases, Melittin, enzymatic activity, antimicrobial peptides

I. INTRODUCCIÓN

Este año 2024, la Organización Mundial de la Salud incluyó a las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) producidas por enterobacterias dentro del grupo crítico de patógenos prioritarios para la salud pública (1). Las BLEE son una categoría de enzimas resistentes a los antibióticos que otorgan multidrogoresistencia a bacterias patógenas, en particular contra antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas de avanzada generación (2). La CTX-M es la familia de BLEE más difundida a nivel global presente en Europa, Latinoamérica y Asia Pacífico, además de originar brotes epidemiológicos en varios países como Estados Unidos (3). Las alternativas terapéuticas de primera elección para infecciones ocasionadas por BLEE se basan en combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas. Sin embargo, se han reportado discrepancias entre las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y la eficacia clínica observada para algunas combinaciones (4). Ante esto, se enfatiza la necesidad de investigar y desarrollar nuevos compuestos alternativos que logren actuar sobre las enzimas BLEE (1).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han centrado en neutralizar o inactivar las enzimas BLEE después de su formación; sin embargo, existe poca atención dirigida a prevenir la síntesis de enzimas BLEE. Las β -lactamasas de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, se sintetizan en el citoplasma bacteriano como moléculas precursoras (pre β -lactamasas), para luego dirigirse hacia los sistemas de secreción y ser exportadas al periplasma donde alcanzan su conformación estructural final activa (5). Cualquier alteración en esta ruta metabólica de síntesis de β -lactamasas por parte

de un agente externo puede tener un impacto sobre la actividad hidrolítica de las enzimas β -lactamasas. Por ejemplo, el uso de oligómeros antisentido inhibió la expresión del gen *bla_{CTX-M}* y la actividad de β -lactamasas hasta en un 96%, lo que restauró la sensibilidad de cefotaxima (6). El compuesto cerulenina previno la síntesis de β -lactamasas por inhibición de la secreción de proteínas periplasmáticas en *E. coli*, así redujo la actividad enzimática de β -lactamasas en más del 70% (7). La post exposición a ésteres de ácidos grasos en cultivos de *Staphylococcus aureus bla_Z* inhibió la señalización intracelular para la expresión de β -lactamasas y su actividad enzimática (8).

En relación a lo anterior, los péptidos antimicrobianos a concentraciones sub inhibitorias o dosis por debajo de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) pueden penetrar la membrana bacteriana interna y actuar como inhibidores de rutas metabólicas tales como interferir con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, e inhibir la actividad enzimática (9,10). Así, el péptido antimicrobiano bovino Bac5 a dosis sub líticas inhibió específicamente la traducción bacteriana por unión a ribosomas, previniendo su entrada a la fase de elongación (11).

Melitina es un péptido antimicrobiano de 26 aminoácidos (2,8 kDa) y es el principal componente de la Apitoxina o veneno de abeja europea *Apis mellifera* (12). Debido a su naturaleza catiónica, Melitina ha demostrado selectividad hacia las membranas bacterianas por la presencia de abundantes lípidos carga eléctrica negativa, a diferencia de las membranas de origen animal conde carga neutra (13). Se ha reportado el efecto lítico de Melitina sobre bacterias sensibles y resistentes a los antibióticos (14). A dosis

sub inhibitorias, Melitina ha demostrado inhibir la síntesis de ácidos nucleicos de *Xanthomonas oryzae* (15) y favorecer la apoptosis en *Candida albicans* (16).

La obtención de Melitina puede ser natural o sintética. La síntesis química de Melitina es limitada y está enfocada a la generación de péptidos análogos que demuestren propiedades fisicoquímicas o biológicas en modelos celulares (17). Melitina de origen natural es derivado de la Apitoxina, veneno extraído por electroestimulación de abejas saludables. Existen distintos procesos de purificación de Melitina a partir de Apitoxina que culminan con la caracterización de los péptidos, donde la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ha sido el método fisicoquímico de elección (18). La desventaja de emplear HPLC es el alto costo de producción y comercialización así, 1 mg de Melitina liofilizada se estima entre 80 y 240 dólares (19,20). Se han propuesto métodos alternativos de purificación de Melitina empleando técnicas de ultrafiltración (21). Esta técnica además de sencilla permite obtener Melitina de alta pureza. Cabe precisar que, la recuperación de Melitina depende a su vez de la calidad de Apitoxina extraída pues representa el 42.6 % de su peso total y, la obtención de Apitoxina es mayor si se extrae en condiciones climáticas óptimas y estaciones primaverales donde el contenido proteico es mayor (22). La evaluación de Melitina u otros péptidos sobre la resistencia bacteriana, requieren altos volúmenes del péptido purificado a estudiar, por lo que esta metodología de ultrafiltración representa una alternativa atractiva para su aplicación. En base a lo descrito, se evaluó la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M de *E. coli* post exposición a concentraciones sub inhibitorias de Melitina purificada.

II.OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de concentraciones sub inhibitorias de Melitina sobre la actividad hidrolítica de enzimas BLEE pertenecientes a *E. coli* tipo CTX-M.

Objetivos específicos

1. Purificar y caracterizar Melitina a partir de veneno de Apitoxina.
2. Estimar las concentraciones sub inhibitorias de Melitina frente a cepas de *E. coli* BLEE mediante microdilución en caldo.
3. Determinar el porcentaje de inhibición de la actividad hidrolítica de BLEE *E. coli* post exposición a concentraciones sub inhibitorias de Melitina usando un método cinético.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental.

Material biológico

Se seleccionaron cepas caracterizadas fenotípicamente como *E. coli* productoras de BLEE del cepario del Laboratorio de Resistencia Antimicrobianos y Fagoterapia – LID-UPCH. Se excluyeron aquellas cepas que presentaban carbapenemasas y β -lactamasas tipo AmpC. Treinta y uno cepas candidatas fueron sometidas a sinergia de discos para confirmar la actividad funcional de enzimas BLEE, además se realizó una caracterización molecular para seleccionar aquellas cepas que portaran únicamente el gen *bla*_{CTX-M} (Anexo 1). Finalmente, cinco *E. coli* BLEE fueron seleccionadas para el estudio. Se incluyeron las siguientes cepas como controles: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE, y *E. coli* ATCC 25922 no productora de BLEE.

Procedimientos y técnicas

Purificación de Apitoxina y obtención de Melitina

La Apitoxina cruda de abejas europeas *Apis mellifera* fue proporcionada por el Laboratorio de Virología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. La purificación se realizó siguiendo la metodología descrita por Cuya G. (21). Se disolvieron cristales de Apitoxina al 1% en agua desionizada y la suspensión resultante se filtró por medio de una membrana de 0,22 μm . Seguidamente, la Apitoxina pura se colocó a una unidad de ultrafiltración tipo Amicon® de punto de corte 30 kDa (Merck Millipore, USA) y se centrifugó a 4000 RPM por 30 minutos a 4°C. El eluido resultante fue la fracción menor a 30 kDa de Apitoxina pura (Api<30 kDa), la cual se colocó en una nueva unidad de ultrafiltración de punto de corte 10 kDa que fue centrifugado bajo las mismas condiciones. El nuevo eluido resultante fue la fracción menor a 10 kDa de Apitoxina pura (Api<10 kDa) donde se encontró al péptido Melitina (2,8 kDa). La concentración de proteínas en Apitoxina pura y sus fracciones Api<30 kDa y Api<10 kDa fueron cuantificadas por fluorometría con el kit Qubit™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA).

Caracterización electroforética de Melitina

Para confirmar la presencia del péptido Melitina en la fracción Api<10 kDa, se aplicó un protocolo de electroforesis tipo denaturante reportado por Laemmli (23) en geles de poliacrilamida al 19%. La digestión de Api<10 kDa se realizó en proporción 1:1 con el buffer de digestión compuesto por el buffer de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8,

Glicerol 35%, Azul de bromofenol 0,01% y SDS 2%,) más β -2 Mercaptoetanol 1:20. La mezcla resultante se calentó a 90 °C por 10 minutos. Los digeridos se sembraron en gel de poliacrilamida, con una concentración de proteínas final entre 3 a 10 μ g por carril. El patrón de peso molecular fue el *Ladder Precision plus protein* (BioRad, USA). Una Melitina comercial \geq 85% (HPLC) (Sigma-Aldrich, USA) fue usada como patrón referencial. Se aplicó un campo electroforético de 40 v para el gel *stacking* y 100 v para el gel *resolving* por un tiempo total de 3 horas. El buffer de corrida empleado fue Tris-Glicina. Los geles fueron teñidos en buffer de tinción (azul brillante de Coomassie G-250 0,05%) por 10 minutos en agitación constante, y lavados con una solución decolorante (metanol absoluto 5%, ácido acético glacial 7%) hasta la visualización de las bandas. Las bandas de proteínas sobre el gel electroforético fueron analizadas usando el software ImageJ ver 1.54 (NIH, Bethesda). Los porcentajes de cada banda proteica se calcularon a partir del valor de la densidad integrada (IntDen) que fue el producto del área y la intensidad de cada píxel en dicha área.

Estimación de las concentraciones sub inhibitorias de Melitina sobre *E. coli* BLEE tipo CTX-M

Se determinó la MIC de Melitina frente a *E. coli* ATCC 25922 (no productora de BLEE), la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE y las cepas de estudio de *E. coli* BLEE tipo CTX-M. Se empleó la técnica de microdilución en caldo según lo establecido por la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) con algunas modificaciones (24). Melitina fue diluída en caldo Müller Hinton ajustado a

caciones (CA-MHB, de la abreviatura en inglés) (Liofilchem, Italy) en una microplaca de 96 pocillos de poliestireno estéril con las siguientes concentraciones: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, y 10 $\mu\text{g/ml}$. Para el inóculo bacteriano, se preparó una escala al 0.5 Mc Farland diluída 1:20, y de esta suspensión bacteriana se tomó 10 μl para agregar a todos los pocillos (concentración final de bacterias $\sim 5,5 \times 10^5$ UFC/ml). Un pocillo sin Melitina fue usado como control de crecimiento. El control negativo fue el medio de cultivo sin inóculo bacteriano. Las condiciones de crecimiento fueron de 18 horas a 37°C . Los ensayos se realizaron por triplicado. Se consideró la MIC para Melitina aquella concentración que no presentó crecimiento visible en las tres réplicas del ensayo después de las 18 horas de incubación. Finalmente, las dosis sub inhibitorias de Melitina fueron calculadas a partir del MIC de cada cepa. Se realizó el cálculo: $0,5 \times \text{MIC}$ y $0,25 \times \text{MIC}$.

Evaluación del efecto de Melitina sobre el crecimiento de *E. coli* BLEE

Se evaluó la capacidad de Melitina para alterar la curva de crecimiento bacteriano del inicio hasta el término de la fase logarítmica, se empleó el protocolo según Dolzani L. *et al* (25). Se prepararon concentraciones sub inhibitorias de Melitina: $0,5 \times \text{MIC}$ y $0,25 \times \text{MIC}$ en base al MIC obtenido para cada cepa *E. coli* BLEE tipo CTX-M y se dispensaron en microplacas de 96 pocillos a un volumen final de 200 μl . Un cultivo sin Melitina para cada cepa sirvió como control de crecimiento. El inóculo bacteriano se preparó según lo descrito por Brown-Skrovot *et al.* para obtener bacterias vivas en fase logarítmica inicial (8). Las cepas fueron cultivadas en 10 ml de caldo CA-MHB por

18-24 horas a 37 °C. Se añadió 10 ml de caldo CA-MHB fresco, y se incubó a 37 °C a 240 rpm por 1 hora más. El cultivo en fase logarítmica resultante fue diluido 1:20 sobre el medio de cultivo con Melitina previamente dispensado en la microplaca (concentración final de bacterias $\sim 10^7$ UFC/ml, verificado mediante conteo de colonias en placa). Se monitoreó el crecimiento bacteriano de tres réplicas por 4 horas a 37°C con agitación constante y se midió la absorbancia cada 20 minutos a 590nm con un lector de microplacas Spectrafluor plus (Tecan, Germany).

Exposición de *E. coli* BLEE tipo CTX-M a concentraciones sub inhibitorias de Melitina

Las cepas *E. coli* BLEE tipo CTX-M fueron expuestas a Melitina según la metodología descrita por Brown-Skrovot *et al.* (8). Las cepas de estudio se cultivaron en 10ml de caldo CA-MHB por 18-24 horas a 37 °C. Se añadió 10 ml de caldo CA-MHB fresco, y se incubó a 37 °C a 240 rpm por 1 hora más. El cultivo en fase logarítmica resultante se diluyó 1:20 para obtener tres subcultivos:

- *E. coli* BLEE sin Melitina.
- *E. coli* BLEE con Melitina con la dosis de 0,5xMIC.
- *E. coli* BLEE con Melitina con la dosis de 0,25xMIC.

Los cultivos fueron incubados simultáneamente a 37°C, en agitación a 240 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica media. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4 225 g por 1 hora a 4°C, se eliminó sobrenadante y los pellets se almacenaron a -80° C hasta su uso.

Evaluación de la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M de *E. coli* post exposición a Melitina

La cuantificación de la actividad hidrolítica de enzimas BLEE se realizó por el método de hidrólisis de la cefalosporina cromogénica Nitrocefina (β -lactamase Activity assay kit) (Sigma-Aldrich, USA). Por cada 1 mg de *pellet* bacteriano de *E. coli* BLEE se agregaron 5 μ l del buffer de lisis comercial. Los *pellets* resuspendidos fueron lisados por sonicación. Los lisados se centrifugaron a 14 000 g por 30 minutos a 4°C para recuperar los sobrenadantes.

La hidrólisis de Nitrocefina por β -lactamasas produce un cambio de color proporcional a la actividad de la enzima presente en los sobrenadantes. Se siguieron las especificaciones del fabricante. Los sobrenadantes se diluyeron hasta 40^{-1} para asegurar que la densidad óptica estuviera dentro del rango lineal de la curva estándar de Nitrocefina hidrolizada. La densidad óptica fue medida a 490 nm en modo cinético durante 15 minutos. Se incluyó la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora BLEE como control positivo para la producción de β -lactamasas, la cual monitoreó el procedimiento desde el cultivo microbiológico hasta la actividad hidrolítica. La actividad de β -lactamasas fue calculada en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-lactamasas} = \left(\frac{B}{\Delta T \times V} \right) \times D = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

Dónde: B representa la cantidad de Nitrocefina hidrolizada (nanomoles) durante un intervalo de tiempo (ΔT [minutos]), V representa la cantidad (ml) de muestra añadida a la reacción, y D representa el factor de dilución.

Se cuantificó la concentración de proteínas del sobrenadante por el ensayo de Bradford (BioRad, USA) con albumina sérica bovina como estándar. La actividad enzimática de β -lactamasas fue normalizada por la concentración de proteínas y expresada en mU/mg de proteína. Se estimó los porcentajes de inhibición a partir de los siguientes cálculos:

$$\text{Actividad } \beta \text{ lactamasas (\%)} = \frac{\text{Actividad } \beta \text{ - lactamasa con Melitina}}{\text{Actividad } \beta \text{ - lactamasa control (sin Melitina)}} \times 100$$

$$\text{Inhibición } \beta \text{ lactamasas (\%)} = 100\% - \text{Actividad } \beta \text{ lactamasas (\%)}$$

Análisis estadístico

Las curvas de crecimiento se analizaron con ANOVA t -test que comparó las diferencias entre las pendientes durante la fase logarítmica (26). Las diferencias entre los grupos de la actividad enzimática BLEE se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman para muestras pareadas. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis fueron realizados por el programa GraphPad Prism (Versión 8.0.1, Graphpad Inc., La Jolla, CA).

Aspectos éticos

El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de aprobación: CAREG-ORVEI-054-22).

IV. RESULTADOS

Caracterización de electroforética de Melitina

Se obtuvieron dos fracciones moleculares a partir de Apitoxina pura: Api<30kDa y la fracción de interés Api<10kDa. La Apitoxina pura evidenció bandas de peso molecular correspondientes a sus proteínas más abundantes dentro su composición: hialuronidasas (39 kDa), fosfolipasas A2 (14,5 kDa) y Melitina (2,8 kDa). La fracción Api<30kDa evidenció Melitina y la banda perteneciente a fosfolipasas A2. Por último, la fracción Api<10kDa presentó una única banda proteica correspondiente a Melitina, la cual a su vez fue la banda con mayor IntDen tanto en la Apitoxina como en sus fracciones (figura 1). La concentración de proteínas para Api<10kDa fue de 321 µg/ml. Los valores de IntDen de cada banda proteica permitieron obtener los porcentajes de Melitina en cada fracción de Apitoxina. Para la Apitoxina pura, la banda de Melitina fue de 54.21% en relación con los demás componentes (Figura 2-a). Para la fracción Api<30, la banda de Melitina aumentó hasta un 71.43%, mientras que los demás componentes disminuyeron (Fig 2-b). Por último, la banda de Melitina en la fracción Api<10 demostró ser el 100% (Fig 2-c).

Estimación de concentraciones sub inhibitorias de Melitina sobre *E. coli* BLEE tipo CTX-M

La MIC de Melitina para la cepa *E. coli* ATCC 25922 (no productora de BLEE) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE fueron 30 µg/ml y 90 µg/ml

respectivamente. La MIC promedio de Melitina frente a las cepas de estudio *E. coli* BLEE tipo CTX-M fue 62 µg/ml, siendo un valor de MIC menor al obtenido para la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE. Las concentraciones sub MIC de Melitina para cada cepa *E. coli* BLEE se detallan en la tabla 1. El promedio de la dosis sub inhibitorias de 0,5xMIC y 0,25xMIC de Melitina fueron de 31 y 15,5 µg/ml respectivamente.

Evaluación de la curva de crecimiento de *E. coli* BLEE tipo CTX-M frente a Melitina

El análisis estadístico comparativo demostró que las pendientes de las curvas de crecimiento durante la fase logarítmica no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$). Las curvas de crecimiento de las cepas *E. coli* BLEE sin Melitina fueron similares a las curvas de crecimiento de las cepas expuestas con Melitina (figura 3).

Medición de la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M post exposición con Melitina

Los resultados obtenidos con los controles para el ensayo fueron: (a) El grado de correlación de la curva de calibración estándar de Nitrocefina hidrolizada fue de $r^2=0.9995$. (b) La reacción enzimática con el control positivo interno del kit comercial fue de 1 826 mU/ml. (c) La cepa ATCC 700603 *K. pneumoniae* productora de BLEE mostró una actividad enzimática de 1 105 mU/mg de proteína.

La actividad hidrolítica de β-lactamasas en las cepas de *E. coli* BLEE tipo CTX-M sin exposición a concentraciones sub inhibitorias de Melitina mostró valores superiores a

la cepa control ATCC 700603 en 4 de 5 cepas. Melitina a concentración sub inhibitoria de 0,5xMIC, disminuyó significativamente la actividad enzimática BLEE en las 5 cepas de trabajo ($p<0,02$). La concentración sub inhibitoria más alta de Melitina, 40 $\mu\text{g/ml}$, logró inhibir un 67% la actividad hidrolítica de BLEE tipo CTX-M comparado con la cepa no expuesta. No se observaron diferencias significativas entre las cepas sin exposición a Melitina y las cepas expuestas a la concentración sub inhibitoria 0,25xMIC, solo se evidenció una inhibición del 32% de la actividad hidrolítica en las cepas 14B y 16B (Tabla 2 y Figura 4).

Los valores de la actividad enzimática BLEE fueron muy variados tuvieron un amplio rango (294 - 4589 mU/mg de proteínas). La mediana obtenida de las cepas *E. coli* BLEE de la dosis 0,25xMIC (2747 mU/mg de proteínas) fue mayor a la mediana de las cepas sin exposición a Melitina (2560 mU/mg de proteína). Sin embargo, la mediana de las cepas tratadas con la dosis 0,5xMIC de Melitina fue menor: 1685 mU/mg de proteínas, lo que demuestra, en promedio, una inhibición de la actividad hidrolítica del 34%.

V. DISCUSIÓN

La actividad enzimática hidrolítica en las cepas de *E. coli* BLEE tipo CTX-M sin exposición a Melitina, mostraron valores altos y variables. Esta variabilidad ha sido observada por Queenan et al. (27) quien reportó en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, productoras de BLEE valores de actividad enzimática desde 350 hasta 17,000 mU/mg de proteínas. Andreasen et al. (28) reportaron en cepas de *E. coli* blaTEM-1 y blaOXA-1, una actividad enzimática entre 149 y 15 mU/mg de proteínas respectivamente. Este amplio rango en la actividad hidrolítica que presentan las β -lactamasas podría explicarse desde el tipo de enzima y sus variantes (CTX-M-1, CTX-M15, TEM, SHV, etc.), condiciones de cultivo, el empleo de inductores, o incluso la fase de crecimiento bacteriano en el cual se aislaron las enzimas. En nuestro caso, las enzimas β -lactamasas fueron BLEE, extraídas en fase logarítmica donde previamente se ha determinado que la producción, específicamente de las enzimas BLEE tipo CTX-M, es mayor comparada con las otras fases de crecimiento, independientemente del uso de inductores como β -lactámicos (29).

Estudios han demostrado que Melitina es efectiva al inhibir y erradicar biopelículas bacterianas empleando dosis MIC o sub MIC (30). Dosis sub inhibitorias de Melitina 0,5xMIC, 0,25xMIC y 0,125xMIC han demostrado ser efectivas al reducir la producción de metabolitos que actúan como factores de virulencia tales como piocianina, elastina y ramnolípido en *Pseudomonas aeruginosa* (31). En nuestro estudio se ha demostrado que la concentración sub inhibitoria 0,5xMIC de Melitina interfiere con la actividad hidrolítica de enzimas β -lactamasas en todas las cepas de *E.*

coli tipo CTX-M. Se logró alcanzar una reducción promedio del 40% con la dosis 0,5xMIC y una reducción máxima de 67% en la cepa 14B. Además, el uso de la dosis 0,25xMIC logró reducir la producción de enzimas BLEE en un 32% en las cepas 14B y 16B.

El péptido Melitina a concentraciones sub inhibitorias ha demostrado la capacidad de permeabilizar la membrana bacteriana in vivo y alcanzar blancos intracelulares (15). Recientemente, Melitina ha demostrado inhibir la ATP sintasa F1F0, enzima encargada la síntesis e hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP), enzima esencial requerida para mantener la actividad celular y asegurar la supervivencia bacteriana (32). Respecto a nuestros hallazgos, será necesario realizar ensayos posteriores para conocer el mecanismo de acción del péptido Melitina para ejercer la inhibición de la actividad hidrolítica de BLEE en *E. coli* CTX-M. El efecto inhibitorio pudo haber afectado al ARN mensajero (transcripción), la formación de la pre- β -lactamasa (traducción) o la enzima funcional en su forma final activa. Nuestros resultados, todavía preliminares, permiten proponer una línea de investigación sobre Melitina como una alternativa complementaria para el manejo de *E. coli* BLEE.

Por otro lado, y de manera complementaria, la reducción de la actividad enzimática de la CTX-M de *E. coli* BLEE podría explicarse por la producción bacteriana de especies reactante de oxígeno los cuales pueden dañar componentes celulares como el ADN y los lípidos de membrana en presencia de péptidos antimicrobianos. De hecho, el daño oxidativo puede resultar en modificaciones que puedan desestabilizar e inactivar las proteínas (33). Yang H. et al demostraron que las dosis MIC entre 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ de Melitina, inducen en las bacterias un estrés oxidativo de menor intensidad comparado

con las concentraciones superiores a la MIC. Por tal motivo, es posible que el empleo de nuestras dosis sub inhibitorias 0,5xMIC de Melitina pueda haber generado estrés oxidativo que se manifestó como inhibición de la actividad hidrolítica de la enzima β -lactamasas (31).

La exposición a un agente antimicrobiano, incluso si se emplean dosis sub inhibitorias del mismo, puede ocasionar un retardo en el inicio de la fase de crecimiento bacteriano y con ello afectar la actividad enzimática durante las primeras horas de incubación (34). Nuestros resultados han demostrado que las dosis sub inhibitorias de Melitina no retardan el crecimiento bacteriano de las cepas *E. coli* BLEE al inicio y durante la llegada de la fase logarítmica media de la bacteria, fase donde se extrajeron las enzimas β -lactamasas. De lo anterior, se deduce que cualquier efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolítica de enzimas BLEE detectado post exposición correspondería a los efectos propios de Melitina.

Melitina es considerado un péptido antimicrobiano y es el principal componente de la Apitoxina o veneno de abeja. El análisis de densitometría nos permitió demostrar que Melitina se encontraba presente en Apitoxina en un 54%, seguido de fosfolipasas A2 en un 10%. Nuestros hallazgos del perfil electroforético en la fracción de Apitoxina <10kDa evidenciaron la ausencia de proteínas mayores a 10 kDa como hialuronidasa y fosfolipasas A2. Esto demostró la eficiencia del sistema de purificación para obtener Melitina en cantidad y calidad suficiente para los ensayos microbiológicos. Además, un estudio previo, empleando el mismo sistema de purificación para la obtención de la fracción <10 kDa de Apitoxina y aplicando UHPLC demostró solamente la presencia de Melitina como el único componente proteico (21).

El péptido Melitina ha demostrado tener actividades antibacterianas significativas frente a cepas sensibles y resistentes. Sin embargo, la literatura muestra discrepancias entre los valores de MIC reportados. Se observó que el promedio de la MIC de Melitina obtenido para las cepas de estudio *E. coli* BLEE tipo CTX-M fueron menores, pero cercanos, a la MIC de *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE. Esta diferencia, puede explicarse a la presencia de una cápsula de polisacáridos presente en *K. pneumoniae* que le confiere una protección adicional frente a los péptidos como Melitina cuyo mecanismo de acción lítico es a nivel de la membrana celular.

En relación con estudios previos, nuestros resultados de la MIC de Melitina frente a *E. coli* BLEE tipo CTX-M demostraron ser cinco veces más alto a lo reportado por Lima et al. (MIC₉₀ ~10 µg/ml en Mueller Hinton Broth) (35). Esta diferencia en los valores de la MIC se debería principalmente al medio de cultivo usado CA-MHB, el cual presenta un alto contenido de aminoácidos aniónicos de la caseína hidrolizada, los cuales podrían interactuar con Melitina de carga eléctrica positiva y causar su precipitación, dejando sin efecto al péptido (36). Sin embargo, en concordancia con nuestro estudio, Al-ni et al. quienes emplearon también CA-MHB evaluaron la susceptibilidad de *E. coli* provenientes de aislamientos clínicos y en *E. coli* ATCC 25922 frente a Melitina y reportó valores de MIC cercanos (30 µg/ml) a nuestro MIC promedio para *E. coli* BLEE tipo CTX-M (37).

Algunas limitaciones en nuestro estudio fueron: a) La cantidad de cepas de estudio. Al ser provenientes de un cepario, debían cumplir con un perfil genotípico el cual redujo nuestra población de cepas a estudiar, b) Otros péptidos presentes en la Apitoxina de peso molecular menor a 10 kDa como Apamina y el Péptido Degranulador de

Mastocitos también pueden estar presentes en la fracción <10 kDa, pero en cantidad insignificante en comparación a Melitina, por lo que la actividad inhibitoria hallada se atribuye principalmente a Melitina, c) Para determinar la actividad enzimática, se trabajó con el extracto crudo de enzimas del cultivo, por lo cual el ensayo detecta la actividad hidrolítica de cualquier BLEE incluidas las enzimas tipo CTX-M. Sin embargo, en nuestras cepas de estudio solo se descartó la presencia las enzimas BLEE tipo TEM y SHV, las cuales son las más frecuentemente reportadas después de las enzimas tipo CTX-M. Por lo tanto, no se descarta la presencia de otro tipo de enzima BLEE en nuestras cepas de estudio, cuya actividad enzimática se haya superpuesto.

Finalmente, es conveniente destacar que, con el fin de responder a nuestros objetivos fue necesario desarrollar una metodología para detectar y cuantificar la producción de enzimas β -lactamasas en cepas de *E. coli* BLEE tipo CTX-M la cual puede aplicarse a la investigación del efecto inhibitorio de la actividad enzimática de Melitina sobre bacterias de distinta especie productoras de BLEE, otros tipos de BLEE (SHV, TEM, etc.) u otras β -lactamasas como las carbapenemasas.

VI. CONCLUSIONES

1. La actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M pertenecientes a *E. coli* fue reducida post exposición a una concentración sub inhibitoria de 0,5xMIC del péptido Melitina.
2. El sistema de purificación de péptidos permitió obtener a Melitina de origen natural a partir de Apitoxina, dentro de la fracción de Api<10 kDa con una alta pureza.
3. Las concentraciones sub inhibitorias de Melitina sobre *E. coli* BLEE fueron para el promedio de 0,5xMIC y 0,25xMIC de 31 y 15,5 µg/ml respectivamente.
4. La dosis sub inhibitoria de 0,5xMIC de Melitina inhibió la actividad enzimática BLEE en todas las cepas de estudio, con una reducción máxima del 67% mientras que, la dosis de 0,25xMIC de Melitina logró una inhibición parcial a nivel grupal.

VII.RECOMENDACIONES

- Ampliar el número de cepas de estudio e incluir ensayos de reproducibilidad para la actividad enzimática.
- Extender el estudio sobre otras enzimas tipo BLEE e incluso carbapenemasas que generan resistencia a antimicrobianos de un impacto crítico para la salud pública.
- La metodología de estudio puede ser útil como modelo para la evaluación de otros péptidos antimicrobianos.
- Se recomienda profundizar estudios enfocados a determinar el nivel de acción de Melitina para afectar la actividad hidrolítica de enzimas BLEE tipo CTX-M y determinar si el efecto fue sobre sobre la vía metabólica de formación de la enzima (ARN mensajero o pre β lactamasa) o sobre la enzima funcional, con el fin de obtener posibles blancos terapéuticos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. WHO bacterial priority pathogens list, 2024 [Internet]. Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024 [citado 27 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
2. Husna A, Rahman M, Badruzzaman A, Sikder M, Islam M, Rahman M, et al. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines* [Internet] 2023 [citado 20 de julio de 2024];11:2937. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937>
3. Castanheira M, Simner P, Bradford P. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resist* [Internet]. 2021 [citado 20 de noviembre del 2023];3(3). Disponible en: <https://academic.oup.com/jacamr/article/3/3/dlab092/6322891>
4. Abodakpi H, Wanger A, Tam VH. What the Clinical Microbiologist Should Know About Pharmacokinetics/Pharmacodynamics in the Era of Emerging Multidrug Resistance: Focusing on β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Lab Med* [Internet]. 2019 [citado 28 de junio de 2024];39(3):473–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31383269/>
5. Kaderabkova N, Bharathwaj M, Furniss R, Gonzalez D, Palmer T, Mavridou D.

- The biogenesis of β -lactamase enzymes. *Microbiology* [Internet]. 2022 [citado 27 de abril de 2024];168(8):001217. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10235803/>
6. Readman J, Dickson G and Coldham N. Translational Inhibition of CTX-M Extended Spectrum β -Lactamase in Clinical Strains of *Escherichia coli* by Synthetic Antisense Oligonucleotides Partially Restores Sensitivity to Cefotaxime. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 20 de junio de 2024] 7:373. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00373/full>
 7. Mantsala P. and Lehtinen H. Secretion of fl-lactamase by *Escherichia coli* in vivo and in vitro: effect of cerulenin. *Antonie van Leeuwenhoek* [Internet]. 1982. [citado 26 de junio de 2024];48: 353-364. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6756301/>
 8. Brown-Skrobot S, Novick R, Projan S, Inventors., Johnson&Johnson assignee. Inhibition of expression of beta-lactamase using esters of fatty acid alcohols. United States [Internet].1995 [citado 20 de noviembre de 2023]; US5466685. Disponible en: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US38416633&_fid=WO1994026262
 9. Shah P, Hsiao F, Ho Y, Chen C. The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. *Proteomics* [Internet]. 2016 [citado 20 de junio de 2024];16(8):1225–37. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26648572/>

10. Le CF, Fang C, Sekaran SD. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology [Internet] 2017. [citado 20 de junio de 2024];61e02340-16. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aac.02340-16>
11. Mardirossian M, Quentin B. et al. Fragments of the Nonlytic Proline-Rich Antimicrobial Peptide Bac5 Kill Escherichia coli Cells by Inhibiting Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 [citado 27 de abril de 2024];62(8):1–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105812/10>.
12. Jamasbi E, Mularski A, Separovic F. Model Membrane and Cell Studies of Antimicrobial Activity of Melittin Analogues. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2016 [citado 22 de noviembre de 2023];16:40–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26139117/>
13. Rios A, Moutinho C, Pinto F, Del Fiol F, Jozala A, Chaud M., et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*. Elsevier GmbH [Internet]. 2016 [citado 21 de noviembre de 2023];191:51–80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524653/>
14. Memariani H, Memariani M, Shahidi-dadras M, Nasiri S. Melittin : from honeybees to superbugs. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019 [citado 23 de noviembre de 2023];103(8):3265–76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30824944/>
15. Shi W, Li. C, Li. M, Zong. X, Han. D, CHen Y. Antimicrobial peptide melittin

- against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016 [citado 23 de noviembre de 2024];100(11):5059–67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866983/>
16. Park C, Lee D. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010 [citado 23 de noviembre de 2023];394(1):170–2. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.138>
17. Abd El-Wahed AA, Khalifa SAM, Sheikh BY, Farag MA, Saeed A, Larik FA, et al. Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. In: *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. 2018 [citado 28 de junio de 2024]: 459–84. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444641816000139>
18. Räder K, Wildfeuer A, Wintersberger F, Bossinger P, Mücke HW. Caracterización del veneno de abeja y sus principales componentes mediante cromatografía líquida de alta resolución. *J Cromatógrafo* [Internet]. 1987 [citado 24 de julio de 2024];408:341-8. Disponible en: doi: 10.1016/s0021-9673(01)81820-3. PMID: 3429530.
19. MERCK. Melittin from honey bee venom [Internet]. *Sigmaaldrich.com*. [citado el 27 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/product/sigma/m2272>
20. Eurogentec. Melittin, honey bee [Internet]. *Eurogentec. Synchronic*; [citado el 27 de junio de 2024]. Disponible en:

<https://www.eurogentec.com/en/catalog/melittin-honey-bee-1-mg~55725042-ddfc-4dac-82b0-b7c138fccb51>

21. Cuya Lozada, Gianina. Análisis Molecular de la Fracción <10 KDa de la Apitoxina De *Apis Mellifera* y su efecto sobre la Apoptosis Celular. [Tesis de pregrado] Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2019. [citado el 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4184>
22. Murakami J, López G, Paredes M, Cuya G, Talledo M. Production and characterization of bee venom in Chulucanas, Piura. *Agroindustrial Sci* [Internet]. 2019 [citado 23 de noviembre de 2023];9(2):205–10. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8085629>
23. Laemmli UK. Nature Publishing Group. *Nat Publ Gr* [Internet]. 1970; [citado 27 de junio de 2024]:228:680–5. Disponible en: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
24. CLSI. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition [Internet]. [citado 20 de noviembre 2023]. Disponible en: www.clsi.org.
25. Dolzani L, Milan A, Scocchi M, Lagatolla C, Bressan R, Benincasa M. Sub-MIC effects of a proline-rich antibacterial peptide on clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* [Internet]. 2019 [citado 5 de diciembre de 2023];68(8):1253-1265. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31215857/>
26. GraphPad Software. Curve Fitting Guide - Comparing slopes and intercepts

- [Internet]. Boston, MA. [citado 5 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/slopeandintercept.htm>
27. Queenan A, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of Inoculum and β -Lactamase Activity in AmpC- and Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by Using NCCLS ESBL Methodology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 18 de marzo de 2024]; 42(1):269–75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715764/>
 28. Andreasen M, Hansen K, Pedersen M, Mollerup S, Jelsbak L, Schønning K. Piperacillin-Tazobactam Resistance Mechanisms in *Escherichia coli* and Identification of a CTX-M-255 β -Lactamase Selectively Conferring Resistance to Penicillin/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *bioRxiv* [Internet]. 2022 [citado 18 de marzo de 2024]; 2022.09.21.508968. Disponible en: <http://biorxiv.org/content/early/2022/09/25/2022.09.21.508968.abstract>
 29. Kjeldsen T, Overgaard M, Nielsen S, Bortolaia V, Jelsbak L, Sommer M, et al. CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli* is dependent on cefotaxime concentration, growth phase and gene location. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 [citado 27 de abril de 2024]; 70(1):62–70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25182062/28>.
 30. Galdiero E, Siciliano A, Gesuele R, Di Onofrio V, Falanga A, Maione A, et al. Melittin inhibition and eradication activity for resistant polymicrobial biofilm isolated from a dairy industry after disinfection. *Int J Microbiol* [Internet]. 2019

- [citado 14 de marzo de 2024];2019:125654442. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/4012394/>
31. Hongyan Yang, Ma R, Chen J, Xie Q, Luo W, Sun P, et al. Discovery of Melittin as Triple-Action Agent: Broad-Spectrum Antibacterial, Anti-Biofilm, and Potential Anti-Quorum Sensing Activities. *Molecules* [Internet]. 2024 [citado 14 de marzo de 2024];29(3):558. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules29030558>
 32. Nehme H, Ayde H, El Obeid D, Sabatier J, Fajloun Z. Potential inhibitory effect of apis mellifera's venom and of its two main components—melittin and pla2—on escherichia coli flf0-atpase. *Antibiotics* [Internet]. 2020 [citado 27 de abril de 2024];9(11):1–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7699247/>
 33. Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 18 de abril de 2024];15(7):385–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
 34. Andersson D, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014 [citado 27 de abril de 2024];12(7):465–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3270>
 35. Lima W, Batista F, Lima I, Simião D, Brito J, da Cruz Nizer W, et al. Antibacterial, anti-biofilm, and anti-adhesive activities of melittin, a honeybee venom-derived peptide, against quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Nat Prod Res* [Internet]. 2022 [citado 14 de marzo de 2024];36(24):6381–8. Disponible en:

<https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2032047>

36. Mercer DK, Torres MDT, Duay SS, Lovie E, Simpson L, von Köckritz-Blickwede M, de la Fuente-Nunez C, O’Neil DA and Angeles-Boza AM Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* [Internet]. 2020 [citado 10 de marzo de 2024]; 10:326. Disponible en: doi: 10.3389/fcimb.2020.00326
37. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine* [Internet]. 2015[citado 10 de marzo de 2024];22(2):245–55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25765829/>

IX. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

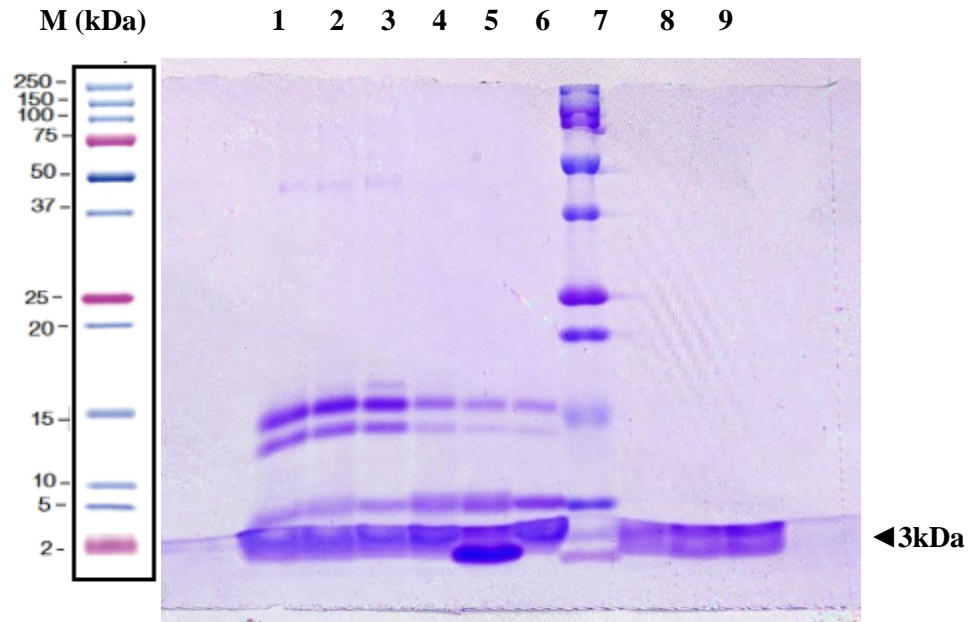


Figura 1. Perfil electroforético de Melitina y Apitoxina. Apitoxina pura y las fracciones proteicas en gel denaturante al 19% de poliacrilamida. Carril 1-3: Apitoxina pura. Carril 4-6: Fracción Api <30kDa. Carril 7: Marcador de peso molecular. Carril 8: Melitina comercial (PM=2.8 kDa). Carril 9-10: Fracción Api<10kDa (Melitina pura). Tinción azul de Coomassie.

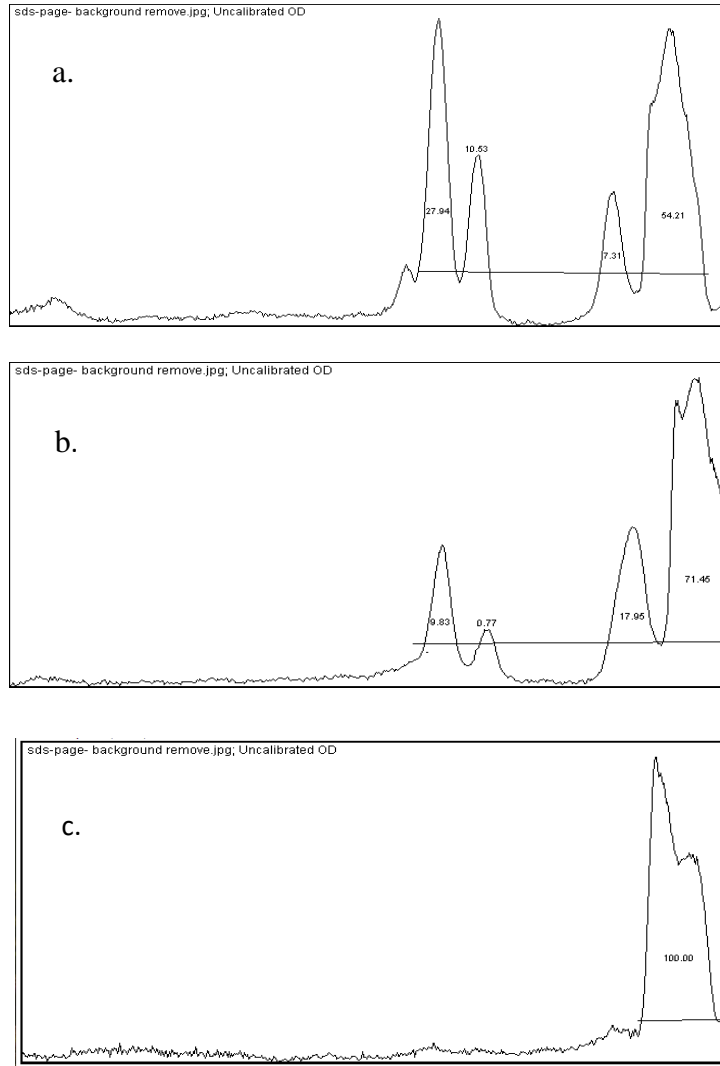


Figura 2. Densitometría de Apitoxina pura. Se empleó un algoritmo de análisis de partículas integrales para calcular la densidad de cada perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE: a) Apitoxina pura, muestra los picos de todos los componentes proteicos presentes en Apitoxina purificada, b) Fracción Apitoxina menor a 30 kDa (Api<30), c) Fracción Apitoxina menor a 10 kDa (Api<10), Melitina alcanzó un InDen del 100%.

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y dosis sub inhibitorias de Melitina sobre *E. coli* BLEE tipo CTX-M

Cepa	MIC µg/ml	0,5xMIC µg/ml	0,25xMIC µg/ml
5B	60	30	15
11B	60	30	15
12B	50	25	12.5
14B	80	40	20
16B	60	30	15

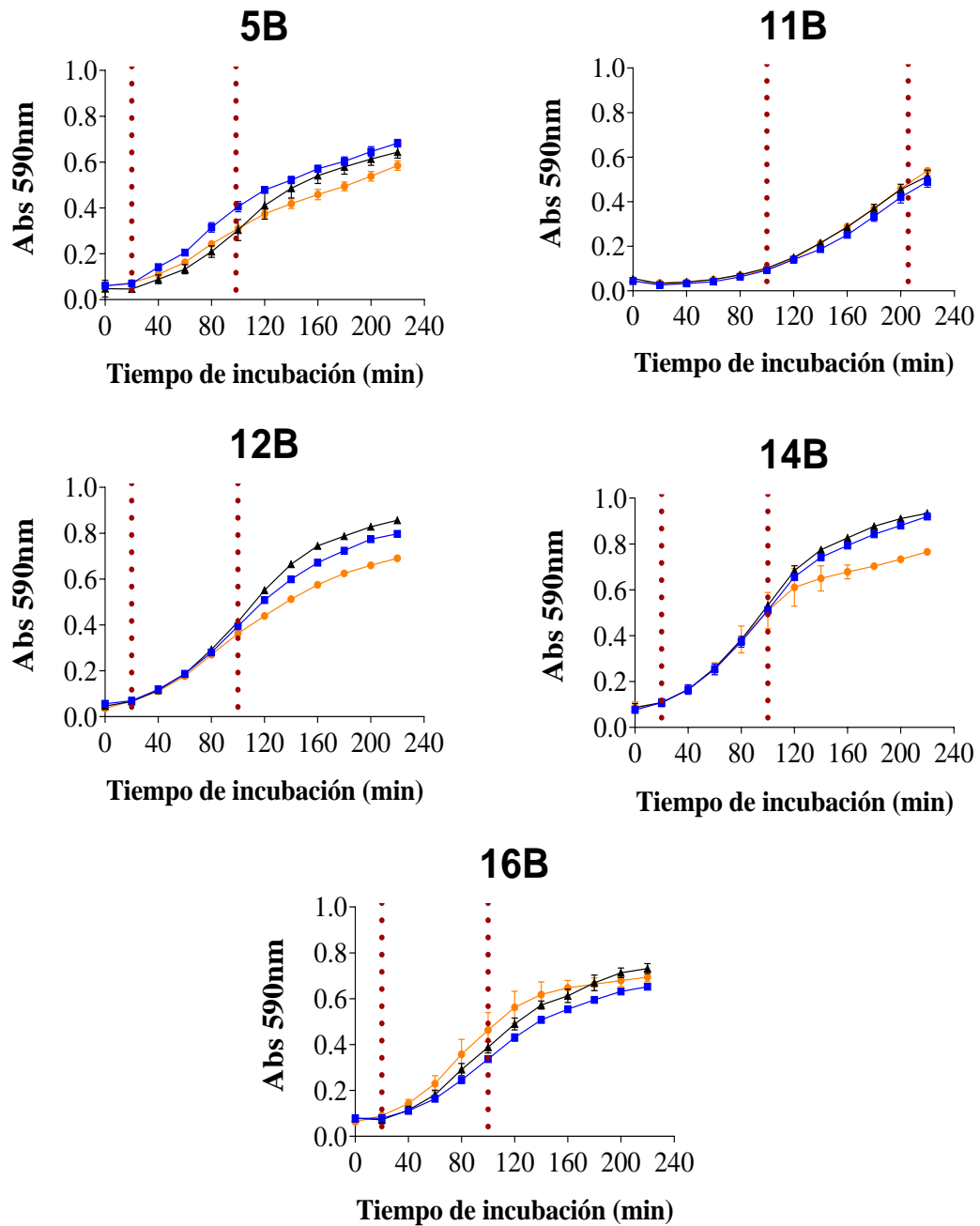


Figura 3. Curvas de crecimiento de cepas *E. coli* BLEE tipo CTX-M expuestas a dosis sub inhibitorias de Melitina. Dosis 0 (●), 0,25xMIC (▲) y 0,5xMIC (■) μg/ml de Melitina. El cultivo fue realizado por triplicado. Las barras de error muestran la dispersión de las tres réplicas del cultivo. Las líneas transversales indican el inicio y termino la fase logarítmica media.

Tabla 2. Actividad hidrolítica de *E. coli* BLEE tipo CTX-M post exposición con Melitina en base a la MIC de cada cepa.

Actividad hidrolítica β-lactamasas mU/mg de proteína			
Cepa	Control	0,25xMIC	0,5xMIC^a
5B	4 327	4 589 (-6.1%)	3 292 (23.9%)
11B	2 561	2 745 (-7.2%)	1 684 (34.2%)
12B	3 322	3 671 (-10.5%)	2 156 (35.1%)
14B	897	6 07 (32.3%)	294 (67.2%)
16B	1 438	977 (32.1%)	872 (39.4%)

^a $p < 0.05$

En paréntesis se expresa el porcentaje de inhibición de enzimas β -lactamasas comparados con su control (cepas sin previa exposición a Melitina).

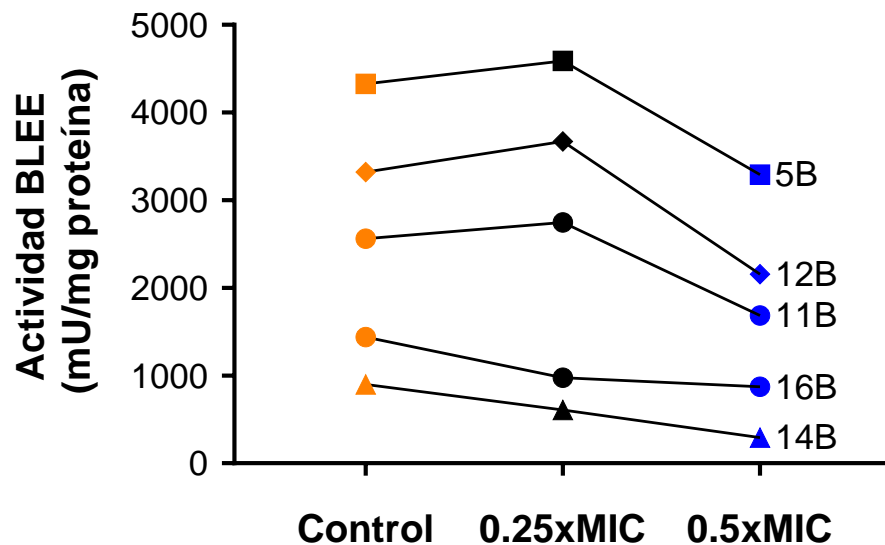


Figura 4. Comparación de la actividad hidrolítica de los sobrenadantes de *E. coli* BLEE tipo CTX-M post exposición con Melitina. Según dosis sub inhibitoria 0,25xMIC y 0,5xMIC para cada cepa 5B (■), 11B (●), 12B (▼), 14B (◆) y 16B (▲). La actividad enzimática BLEE fue normalizada por la concentración de proteínas. Los experimentos fueron realizados por duplicado. Los controles fueron las cepas sin previa exposición a Melitina.

ANEXOS

Anexo 1: Procedimiento para la caracterización molecular de *E. coli* BLEE

Se empleó ADN plasmídico de cepas *E. coli* BLEE que fueron extraídos por el método de lisis alcalina. Se cultivaron las cepas a 37 °C entre 18 a 24 horas en caldo Luria Bertani (LB) (Miller, Sigma-Aldrich), luego se centrifugaron a 14 000 rpm por 30 segundos. El *pellet* bacteriano fue resuspendido en 100 µl de Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0 mantenida en refrigeración) y 200 µl de Solución II recién preparada (NaOH 0,2 N en SDS 1%). La suspensión se homogenizó e incubó en hielo por 10 minutos. Luego, se agregó 100 µl de Solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial, mantenida en refrigeración) y se volvió a incubar en hielo por 10 minutos. Finalizada la incubación se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el plásmido a partir del sobrenadante con lavados sucesivos en cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), dos volúmenes de alcohol absoluto y 1 ml de etanol al 70°. El precipitado formado (ADN plasmídico) fue resuspendido con 40 µl de buffer TE 1X y 1 µl RNAsa 10 mg/ml. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

La identificación de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} fue mediante PCR convencional. La reacción final de 25 µl consistió en buffer Green GoTaq® 1x, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador, 0,625 U/µl de Taq polimerasa GoTaq® G2 Hot Start (Promega, USA), y 5 µl de ADN plasmídico. Las secuencias de los cebadores específicos fueron para *bla*_{CTX-M} (Sentido: 5´- ATG GTT AAA AAA TCA CTG CG-3´; Antisentido: 5´- TTA CAA ACC GTC GGT GAC-3´), *bla*_{TEM} (Sentido: 5´-ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC-3´; Antisentido: 5´- ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC-

3'), *bla*_{SHV} (Sentido: 5'-CAC TCA AGG ATG TAT TGT G-3'; Antisentido: 5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC G-3'). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con buffer TAE 1x. Los tamaños de los amplicones fueron determinados por comparación con el marcador Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Se incluyó como control positivo un pool de ADN con genes *bla* identificados por secuenciamiento. El agua de grado molecular se usó como control negativo.