

Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos aisladas en un hospital colombiano: caracterización molecular y evaluación *in vitro* de péptidos antimicrobianos derivados del LL37

Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria from a colombian hospital: molecular characterization and *in vitro* activity of LL37-derived peptides

Paola A Santos¹, Luz M Salazar², Sharon Ochoa³, Jeannette Navarrette⁴

Resumen

Introducción. La resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram negativas representa una amenaza crítica para la salud pública, particularmente en entornos hospitalarios. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la distribución de genes de carbapenemasas y evaluar la actividad de péptidos derivados de LL37 frente a aislados clínicos colombianos.

Métodos. Se analizaron 63 aislados clínicos Gram negativos resistentes a carbapenémicos recolectados entre 2020–2021. La identificación bacteriana se realizó mediante el sistema Vitek 2 y la susceptibilidad antimicrobiana con el sistema BD Phoenix. La detección de genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM* y *blaIMP* se llevó a cabo por PCR convencional. La actividad antibacteriana de los péptidos LL37-1 y D-LL37 se determinó mediante ensayos de microdilución basados en resazurina para establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). La cinética de crecimiento bacteriano se evaluó a niveles subinhibitorios.

Resultados. *Klebsiella pneumoniae* fue la especie predominante (65%). Se observó alta resistencia a carbapenémicos, especialmente en *Klebsiella spp.* El gen *blaKPC* fue el más

1 Relaciones microbianas y Epidemiológicas aplicadas al Laboratorio Clínico y Molecular – REMA, Facultad Ciencias de la Salud Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7356-083X>
Scholar Google: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Paola+Andrea+santos+Ruiz&btnG=
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001047060

2 Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7869-0991>
Scholar Google: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Luz+Mary+Salazar+Pulido&oq=
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000260070

3 Laboratorio de Microbiología, Subred Integrada de Servicios de Salud ESE, Hospital El Tunal, Bogotá, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9673-9680>
Scholar Google: https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Sharon+Ochoa&btnG=&oq=Sharon+Ochoa
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000029783

4 Relaciones microbianas y epidemiológicas aplicadas al laboratorio clínico y molecular – REMA, Facultad de Ciencias de la Salud Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-3871-4411>
Scholar Google: <https://scholar.google.com/citations?user=JRGb23kAAAAJ&hl=es>
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000486060

Correspondencia: psantos@universidadmayor.edu.co

frecuente (86%), seguido de *blaNDM* (35%) y *blaVIM* (20%), con coexistencia de múltiples genes en algunos aislados. LL37-1 mostró mayor actividad antibacteriana (CMI: 3.12–12.5 μM) con respecto a D-LL37 (6.25–25 μM). Ambos péptidos retrasaron el crecimiento bacteriano, especialmente en *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*. **Conclusión.** Los resultados evidencian una alta carga de resistencia mediada por carbapenemasas y destacan a LL37-1 como un candidato prometedor. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para validar su eficacia y seguridad en modelos más complejos.

Palabras clave: resistencia a los carbapenémicos, bacterias Gram negativas, carbapenemasas, péptidos antimicrobianos, análogos de LL37.

Abstract

Introduction. Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) represent a serious global health threat, particularly in healthcare settings. This study aimed to characterize of carbapenemase-encoding genes in Colombian Gram-negative clinical isolates. It also evaluated the *in vitro* antibacterial activity of synthetic derived from LL37. **Methods.** Sixty-three carbapenem-resistant Gram-negative clinical isolates collected between 2020 and 2021 were analyzed. Bacterial identification was performed using the Vitek 2 system, and antimicrobial susceptibility testing was conducted with the BD Phoenix system. Carbapenemase genes (*blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP*) were detected by conventional PCR. The antibacterial activity of LL37-1 and D-LL37 peptides was determined using resazurin-based microdilution assays to establish the minimum inhibitory concentrations (MICs). Bacterial growth kinetics were assessed at subinhibitory levels. **Results.** *Klebsiella pneumoniae* was the predominant species (65%). High resistance to carbapenems was observed, especially in *Klebsiella spp.* The *blaKPC* gene was the most frequent (86%), followed by *blaNDM* (35%) and *blaVIM* (20%), with multiple genes coexisting in some isolates. LL37-1 showed greater antibacterial activity (MIC: 3.12–12.5 μM) than D-LL37 (6.25–25 μM). Both peptides inhibited bacterial growth, particularly in *Klebsiella spp.* and *Escherichia coli*. **Conclusion.** The results indicate a high prevalence of carbapenemase-mediated resistance and highlight LL37-1 as a promising candidate. However, further studies are needed to validate its efficacy and safety in more complex models.

Keywords: carbapenem resistance, Gram-negative bacteria, carbapenemases, antimicrobial peptides, LL37 analogs.

Introducción

La resistencia a los antibióticos, especialmente entre las bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos (CR-GNB), supone una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial. Comprender las tendencias epidemiológicas, así como los mecanismos de resistencia, es fundamental para desarrollar estrategias de tratamiento eficaces.

En las últimas décadas, las infecciones causadas por bacterias CR-GNB se han convertido en un problema importante en los hospitales, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (1). Entre los patógenos más relevantes se encuentran las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, así como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), conocidas por su capacidad para desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, incluida la producción de carbapenemasas y betalactamasas de espectro extendido (2).

Las carbapenemasas, enzimas que degradan carbapenémicos, antibióticos considerados de última elección, representan el mecanismo más importante de resistencia a estos fármacos. Estas enzimas, codificadas por genes móviles como *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*, confieren resistencia cruzada a la mayoría de los betalactámicos y son altamente transmisibles a

través de plásmidos y transposones, lo que facilita su propagación dentro de la misma especie y entre especies (3,4). Además, mecanismos complementarios como la pérdida de porinas, la sobreexpresión de bombas de eflujo y la formación de biopelículas aumentan la persistencia bacteriana y complican la acción de los antimicrobianos (5).

La distribución geográfica de los genes de carbapenemasas tiene patrones regionales. En América Latina se ha documentado la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia en una misma cepa bacteriana, lo que refleja la complejidad epidemiológica de estos patógenos (6). En Colombia, varios estudios han informado de la circulación de cepas de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) portadoras de *blaKPC* y *blaNDM*, asociadas a brotes hospitalarios y a un aumento constante de infecciones nosocomiales difíciles de tratar (7,8). Por lo tanto, la caracterización molecular de estas bacterias es esencial para comprender la dinámica de la transmisión de genes de resistencia, implementar medidas de control y orientar el tratamiento antimicrobiano.

El impacto clínico de las infecciones por CR-GNB es considerable. La eficacia limitada de los antibióticos disponibles ha dado lugar a la urgente necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, seguras y eficaces. En este contexto, los péptidos antimicrobianos (PAMs) se han convertido en una estrategia prometedora (9,10).

Los PAMs son moléculas catiónicas, anfipáticas y de cadena corta (12 a 50 aminoácidos) que forman parte de la inmunidad innata de animales, plantas y microorganismos (11). Entre ellos, la catelicidina humana LL37 es uno de los péptidos mejor caracterizados, ejerciendo un efecto bactericida a través de la desestabilización de la membrana celular y la modulación inmunológica; así como mediante actividad anti-biopelícula y propiedades inmunorreguladoras adicionales (12,13). Sin embargo, su aplicación terapéutica está limitada por la susceptibilidad a la degradación proteolítica, citotoxicidad moderada y eficacia limitada contra patógenos altamente resistentes (14,15).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado derivados del LL37 con modificaciones estructurales que buscan mejorar su estabilidad y potencia antimicrobiana (16,17). En este sentido, el presente estudio evalúa los péptidos LL37-1 y D-LL37, análogos del LL37, descritos previamente. El péptido LL37-1, un análogo sintético en configuración de aminoácidos L, sustituciones específicas en sitios sensibles a la proteasa y modificaciones terminales (acetilación y/o amidación N/C-terminal) para mejorar la estabilidad de la alfa hélice y la interacción con la membrana; y D-LL37, un estereoisómero compuesto íntegramente por aminoácidos D, que confiere resistencia a la degradación enzimática. Estas estrategias de diseño tienen como objetivo

equilibrar la potencia, la estabilidad y la biocompatibilidad (18,19).

En América Latina, algunos estudios han investigado parcialmente la actividad antimicrobiana de análogos del LL37 (20), pero no hay reportes sobre la caracterización simultáneamente de la distribución de genes carbapenemasas y la susceptibilidad a los péptidos en aislados clínicos de Colombia. De este modo, trabajos que combinan la evaluación del perfil molecular de los CR-GNB con la actividad de péptidos derivados del LL37, representa un paso clave hacia el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas contra los patógenos hospitalarios multirresistentes. Este estudio contribuye a comprender los mecanismos de resistencia y a explorar innovaciones terapéuticas basadas en el LL37.

Materiales y métodos

Aislados bacterianos y condiciones de crecimiento

Se incluyeron en el estudio todos los aislados clínicos que cumplieron simultáneamente los siguientes criterios de inclusión: (i) identificación como bacterias Gram negativas mediante los métodos microbiológicos rutinarios del laboratorio clínico y (ii) resistencia a carbapenémicos, definida de acuerdo con los puntos de corte establecidos por guías internacionales CLSI, para al menos uno de los

antibióticos de esta familia (imipenem, meropenem o ertapenem).

Bajo esta definición operativa de bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos (CR-GNB), se incluyeron de manera consecutiva y no selectiva, un total de 63 aislados clínicos Gram negativos, recolectados aleatoriamente, de diferentes muestras clínicas: orina (n = 17), líquido peritoneal (11), sangre (n = 10), secreción no especificada (4), catéter (4), secreción orotraqueal (3), líquido abdominal (3), secreción traqueal (2) y otros tipos de muestras (9); provenientes de la Subred Sur de Servicios de Salud de Bogotá (Colombia) durante el periodo de estudio comprendido entre en 2020 (n = 24) y 2021 (n = 39).

Los aislados se identificaron utilizando el sistema automatizado Vitek 2 con la tarjeta ID-GNB (Biomerieux, Reino Unido). Las cepas bacterianas se criopreservaron por duplicado a -80°C en caldo LB (Luria Bertani) suplementado con glicerol al 30% para su posterior análisis.

Para la realización de los experimentos, cada criovial se sometió a descongelación gradual y dilución en caldo BHI (Brain Heart Infusion), y luego se incubó durante 24 h a 37°C en agitación, ajustando la densidad óptica $OD_{590} \sim 0.5$. Posteriormente se realizó una dilución hasta obtener la bacteria para el ensayo en una $OD_{590} \sim 0.05$ (correspondiente a $\sim 3.5 \times 10^5$ unidades for-

madoras de colonias - UFCs). La absorbancia de cada suspensión se confirmó en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas clínicas se determinó utilizando el sistema automatizado BD Phoenix 100™, con el panel NMIC-101 para la identificación del antibiograma de Gram negativos. Se evaluó la susceptibilidad a la ampicilina (AMP), la amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), la piperacilina-tazobactam (TZP), la cefuroxima (CXM), la cefuroxima-axetil (CAE), la cefoxitina (FOX), la ceftazidima (CAZ), la ceftriaxona (CRO), cefepima (FEP), ertapenem (ERT), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), colistina (CST) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). Se utilizaron los puntos de corte reportados del CLSI 2013 M100-S23 (21). Se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 1705 como control de calidad en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

Caracterización molecular de la resistencia a carbapenémicos

Todos los aislamientos se sometieron a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, para la identificación de genes de carbapenemasas pertenecientes a la

clase A (*blaKPC*) y a la clase B o metaloenzimas (*blaNDM*, *blaVIM* y *blaIMP*).

El ADN total se extrajo a partir de cultivos bacterianos de 24 horas y mediante el uso del kit Promega Wizard® Genomic DNA Purification, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se cuantificó en espectrofotómetros NanoDrop™ 2000/2000c para verificar su con-

centración y pureza y se conservó a -20°C hasta su uso. Los cebadores específicos para los respectivos genes fueron seleccionados y optimizados a partir de secuencias reportadas en estudios de PCR para carbapenemasas y ajustados con base en regiones conservadas disponibles en GenBank. Las condiciones se estandarizaron de acuerdo con los requisitos de cada cebador (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de cebadores empleados para amplificar los genes carbapenemasas.

Gen	Secuencia	Tm	%GC	Amplímero	Ref
<i>blaKPC</i>	F: 5'- ATGTCACTGTATCGCCGTCT -3'	58	50	798 pb	(22)
	R: 5'- TTTTCAGAGCCTTACTGCCC -3'				
<i>blaNDM</i>	F: 5'- GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC -3'	60	50	621 pb	(23)
	R: 5'- CGGAATGGCTC5'-ATCACGATC -3'	62	55		
<i>blaVIM</i>	F: 5'- GATGGTGT'TTGGTCGCATA -3'	57	47	390 pb	(23)
	R: 5'- CGAATGCGCAGCACCAG -3'	59	65		
<i>blaIMP</i>	F: 5'- GTTTATGTTTCATACCTGGTT -3	58	40	488 pb	(22)
	R: 5'- CCAACATTTTTGTTGTTGCT -3'				

Cada reacción PCR convencional se llevó a cabo utilizando 12.5 μL de *2X PCR Master Mix* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), con 2 μL de ADN bacteriano (100 ng/ μL) y 0.6 μL de cada cebador (10 μM) y agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 25 μL .

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 voltios por 60 minutos. Las condiciones de la PCR se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes carbapenemasas.

Clase de carbapenemasa	Gen	Condiciones del ciclo térmico				
		Desnaturalización inicial	30-35 ciclos			Extensión final
			Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	
Clase A	<i>blaKPC</i>	94°C/5 min	94°C/40 s	54°C/1 min	72°C/2 min	72°C/5 min
Clase B	<i>blaNDM</i>	94°C/5 min	94°C/40 s	54°C/1 min	72°C/2 min	72°C/5 min
	<i>blaVIM</i>	94°C/5 min	94°C/40 s	51°C/1 min	72°C/2 min	72°C/5 min
	<i>blaIMP</i>	94° C/5 min	94° C/40 s	47° C/1 min	72° C/2 min	72° C/5 min

Péptidos sintéticos: obtención y preparación

Los péptidos LL37-1 y D-LL37 fueron adquiridos de manera comercial en forma liofilizada de la marca Biomatik, desde la empresa SurGenoma S.A.S. A partir del material liofilizado se prepararon soluciones stock individuales en agua desionizada estéril (H₂O-D_i) a una concentración de 1000 µM, de acuerdo con su peso molecular. Estas soluciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso experimental.

Actividad antibacteriana de los péptidos LL37-1 y D-LL37

La capacidad de los péptidos LL37-1 y D-LL37 para inhibir el crecimiento de los 63 aislamientos resistentes, fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (24), utilizando resazurina como indicador de viabilidad (25,26).

Para llevar a cabo el montaje del experimento, en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos de fondo plano, se adicionó un volumen de 100 µL de caldo LB, con diluciones seriadas de los péptidos LL37-1 y D-LL37, desde 100 a 0.20 µM, concentración final. Luego, se mezclaron por separado con 100 µL del cultivo de los aislamientos bacterianos OD₅₉₀ ~0.05. Las placas

se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se agregaron 30 µL de resazurina al 0.01% a cada pocillo y las placas se incubaron nuevamente durante 4 a 6 horas adicionales a 37°C protegidas de la luz. Las bacterias viables se detectaron colorimétricamente. Un cambio de color de azul a rosa indica crecimiento celular. La CMI se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones estandarizadas (27). En este estudio, la CMI correspondió a la concentración del pozo inmediatamente anterior a aquel donde se observó el cambio de color del indicador, estableciéndose como la concentración mínima del péptido capaz de inhibir el crecimiento visible de las bacterias (28).

Se utilizaron como controles cultivos sin bacterias (control de medio) y cultivos con bacterias sin péptidos (control positivo de crecimiento). La CMI fue obtenida a partir de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Actividad antibacteriana de los PAMs mediante cinética de crecimiento

De otro modo, evaluamos la capacidad de los péptidos LL37-1 y D-LL37 para inhibir o alterar la cinética de crecimiento de los aislamientos resistentes a carbapenémicos durante las fases de crecimiento: fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria, durante 48 horas.

Los cultivos bacterianos en caldo BHI ($OD_{590} \sim 0.05$) se mezclaron en placas de microtitulación de 1000 pocillos, de fondo plano, con los péptidos a concentraciones subinhibitorias ($0.5 \times CMI$ y $0.25 \times CMI$), en un volumen final de $300 \mu L$. Las placas se incubaron a $37^\circ C$ con agitación durante 48 h, en un equipo BioScreen C (OY Growth Curves-Type FP1100C) con mediciones cinéticas de la absorbancia a 590 nm tomadas cada 3 horas (23 mediciones en total). Se utilizaron como controles cultivos sin bacterias (control de medio) y cultivos con bacterias sin péptidos (control positivo de crecimiento). La CMI se realizó por triplicado en dos experimentos independientes. Fueron considerados los resultados que mostraron un valor de probabilidad inferior a 0.001 ($P < 0.001$), lo que reveló una significación estadística entre el crecimiento de la cepa sin tratamiento y con tratamiento a una concentración específica de los péptidos.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 9. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student para evaluar los resultados de entre los grupos experimentales. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

Resultados

Caracterización de las cepas resistentes a carbapenémicos

Los 63 aislamientos bacterianos resistentes a carbapenémicos evaluados en este estudio, provienen principalmente de los servicios hospitalarios UCI de adultos, cirugía general, hospitalización general y hospitalización de medicina interna. En su mayoría de pacientes mayores de 40 años.

La identificación del género y la especie reveló que correspondían a bacterias como *K. pneumoniae*, 41 (65%), *E. coli*, 8 (13%), *P. aeruginosa*, 6 (10%), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), 3 (5%), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), 2 (3%), y otras bacterias Gram negativas, 3 (8%), entre las que se detectaron *Klebsiella ozaenae* (*K. ozaenae*), *A. baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*).

Se realizó un panel de sensibilidad para diferentes antibióticos, como los aminoglucósidos y los betalactámicos, incluidas las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos (Material complementario, tabla S1). Para este estudio, nos centramos en los carbapenémicos imipenem, ertapenem y meropenem. La Tabla 3 describe el porcentaje de resistencia identificado para los carbapenémicos.

Tabla 3. Porcentaje de resistencia a los carbapenémicos de los aislamientos clínicos.

Bacterias	Número total de cepas	%Resistencia a ertapenem	%Resistencia a meropenem	%Resistencia a imipenem
<i>K. pneumoniae</i>	41	100	90	88
<i>K. oxytoca</i>	3	100	100	100
<i>K. ozaenae</i>	1	100	100	100
<i>E. coli</i>	8	29	14	14
<i>A. baumannii</i>	1	0	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	6	0	100	100
<i>S. marcescens</i>	2	0	50	0
<i>S. maltophilia</i>	1	NA*	NA*	NA*

*NA: No realizado para el aislamiento

Como se resume en la Tabla 3, se observó que las cepas de *Klebsiella spp* presentaron alta resistencia a los tres fármacos carbapenémicos, mientras que en el caso de *E. coli*, se observó un perfil de baja resistencia a estos antibióticos. Para *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, esta resistencia se da al imipenem y al meropenem, pero no al ertapenem. Las dos cepas de *Serratia* solo mostraron resistencia al meropenem.

Identificación de genes de carbapenemasa en las cepas analizadas

De las 63 cepas de bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos analizadas mediante PCR convencional, se detectó la

presencia de los genes *blaKPC*, *blaNDM* y *blaVIM* de carbapenemasa en proporciones variables, mientras que el gen *blaIMP* no se identificó en ninguna de las cepas. El gen *blaKPC* fue el más prevalente, detectado en el 86% de las cepas analizadas, seguido del *blaNDM* en aproximadamente el 35% y el *blaVIM* en el 20%, como se menciona en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de genes de resistencia en aislados clínicos.

Bacterias	Número total de cepas	% <i>blaKPC</i>	% <i>blaNDM</i>	% <i>blaVIM</i>	% <i>blaIMP</i>
<i>K. pneumoniae</i>	41	100	46	15	0
<i>K. oxytoca</i>	3	100	100	0	0
<i>K. ozaenae</i>	1	0	100	0	0
<i>E. coli</i>	8	71	29	43	0
<i>A. baumannii</i>	1	100	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	6	83	33	33	0
<i>S. marcescens</i>	2	100	0	50	0
<i>S. maltophilia</i>	1	NA	NA	NA	NA

*NA: No realizado para el aislamiento

K. pneumoniae fue la especie más representativa, con 41 aislados (65%), todos ellos portadores del gen *blaKPC*. Además, el 46% de estas cepas dieron positivo para *blaNDM* y el 15% para *blaVIM*, lo que sugiere la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia en algunos aislados. En el caso de *K. oxytoca*, las tres cepas aisladas (100%) dieron positivo para *blaKPC* y *blaNDM*, mientras que *K. ozaenae* solo dio positivo para *blaNDM*.

En el caso de *E. coli*, el 71% de las cepas dieron positivo para *blaKPC*, el 29% para *blaNDM* y el 43% para *blaVIM*, lo que muestra una diversidad genotípica que refleja la gran capacidad de esta especie para adquirir plásmidos portadores de genes de

resistencia. *S. marcescens* mostró *blaKPC* en el 100% de sus cepas y *blaVIM* en el 50%, mientras que *P. aeruginosa* mostró *blaKPC* en el 83%, *blaNDM* en el 33% y *blaVIM* en el 33%.

Se identificaron cuatro cepas bacterianas como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa* que presentaban los genes *blaKPC* + *blaNDM* + *blaVIM* simultáneamente (Tabla 4). Las características descritas anteriormente son importantes en salud pública, ya que estas bacterias tienen la capacidad de transmitir estos genes y por ende desarrollar resistencia a los antimicrobianos.

El único aislado de *A. baumannii* fue positivo para *blaKPC*, sin que se detectaran otros

genes, y *S. maltophilia* fue negativo para todos los genes de carbapenemasa evaluados. Estos resultados confirman que la producción de carbapenemasa, especialmente del tipo KPC, es el mecanismo predominante de resistencia en las bacterias Gram negativas analizadas, con la coexistencia de genes de metalobetalactamasas (NDM y VIM) en proporciones menores.

Actividad antibacteriana *in vitro* de los PAMs (CMI y curvas de crecimiento).

La prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando resazurina como indicador de viabilidad demostró que ambos

péptidos exhibían actividad antibacteriana contra las cepas clínicas evaluadas (Tabla 5). En general, el péptido LL37-1 mostró mayor potencia que su análogo D-LL37, con valores de CMI que oscilaron entre 3.12 y 12.5 μM , mientras que D-LL37 mostró valores entre 6.25 y 25 μM . Las cepas de *E. coli* fueron las más sensibles (CMI = 3.12 μM para LL37-1), mientras que *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* mostraron la menor susceptibilidad (CMI = 12.5-25 μM).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de LL37-1 y D-LL37.

Bacterias	Número total de cepas	CMI (μM)	
		LL37-1	D-LL37
<i>K. pneumoniae</i>	41	6.25	12.5
<i>K. oxytoca</i>	3	6.25	12.5
<i>K. ozaenae</i>	1	6.25	12.5
<i>E. coli</i>	8	3.12	6.25
<i>A. baumannii</i>	1	6.25	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	6	12.5	25
<i>S. marcescens</i>	2	12.5	12.5
<i>S. maltophilia</i>	1	25	25

De otro modo, la evaluación de las curvas de crecimiento de cada uno de los aislados permitió comparar el crecimiento de las bacterias estudiadas en presencia y ausencia de los péptidos LL37-1 y D-LL37 en concentraciones subinhibitorias (5.0 y 2.5 μM). Para este experimento, solo se incluyeron

aislados bacterianos de *Klebsiella spp*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, considerando que son los más prevalentes y clínicamente significativos. La Figura 1 muestra las diferentes fases de la curva de crecimiento de algunos de los aislados bacterianos evaluados.

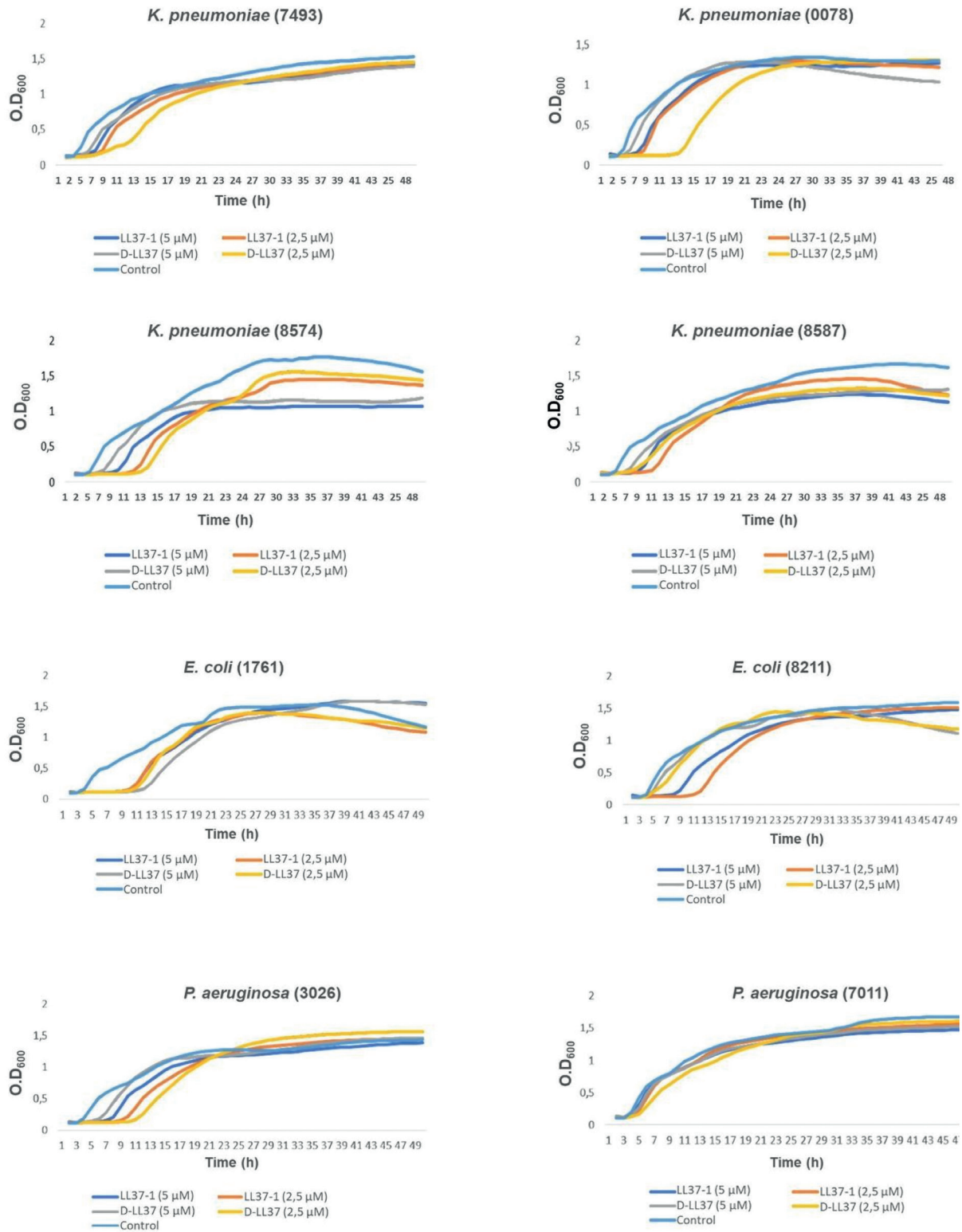


Figura 1. Curvas de crecimiento en presencia de LL37-1 y D-LL37. Crecimiento bacteriano de aislados clínicos de *K. pneumoniae* (7493, 0078, 8574, 8587), *E. coli* (1761, 8211), *P. aeruginosa* (3026, 7011), resistentes a carbapenémicos, en presencia de los péptidos análogos LL37-1 y D-LL37 a las concentraciones de 5.0 y 2.5 μM. Cultivo bacteriano en ausencia de péptidos, fueron incluidos como control de crecimiento (CC).

Los datos representan la media ± DS obtenido a partir de tres réplicas biológicas independientes.

Como se observa en la Figura 1, los péptidos prolongaron el período de crecimiento logarítmico y aumentaron el tiempo necesario para que las bacterias alcanzaran la fase estacionaria a concentraciones subinhibitorias (2.5 y 5 μ M). Este efecto fue particularmente evidente en las cepas de *Klebsiella spp.* y *E. coli*, mientras que en *P. aeruginosa* no se observó inhibición a concentraciones tan bajas. La inhibición parcial y transitoria sugiere una pérdida de estabilidad o una posible degradación de los péptidos durante el período de incubación, lo que podría explicar la recuperación del crecimiento bacteriano después de las primeras 5 h de exposición.

En general, los resultados sugieren que el LL37-1 muestra una actividad superior frente a los patógenos multirresistentes analizados, lo que puede atribuirse a una mayor interacción electrostática con la membrana bacteriana o a una menor susceptibilidad a las proteasas bacterianas en comparación con el análogo D-LL37.

Discusión

La alta prevalencia del gen *blaKPC* observada en este estudio reafirma su predominio como la principal carbapenemasa circulante en América Latina, en consonancia con informes previos que describen las enzimas de tipo KPC como el mecanismo primordial de resistencia a los car-

bapenémicos entre las Enterobacteriales (29,30). En Colombia, se ha informado ampliamente de la diseminación generalizada de *K. pneumoniae* portadora de *blaKPC* en hospitales terciarios y unidades de cuidados intensivos, donde estos clones persisten como reservorios de resistencia causando brotes recurrentes (6). Esto refleja la marcada presión selectiva asociada al uso prolongado de carbapenémicos y la persistencia de plásmidos y linajes epidémicos en los entornos sanitarios.

La coexistencia de *blaKPC* y *blaNDM* detectada en varios aislados es especialmente preocupante, ya que combina enzimas de clase A (serina carbapenemasa) y clase B (metalobetalactamasa), lo que da lugar a una resistencia casi completa a los betalactámicos y a opciones terapéuticas limitadas (31,32). Las pruebas genómicas previamente reportadas señalan que los plásmidos portadores de *blaNDM* suelen albergar genes adicionales que confieren resistencia a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, lo que favorece los fenotipos multirresistentes (33). En *E. coli* y *K. oxytoca*, las diversas combinaciones de genes sugieren una transferencia horizontal activa mediada por integrones y transposones Tn4401, lo que facilita la diseminación entre especies (34).

La detección de *blaVIM* en *E. coli*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa* respalda su propagación regional, especialmente en condiciones de alta presión antibiótica (35,36). Aunque

menos frecuente, la circulación conjunta de *blaVIM* con otras carbapenemasas complica el tratamiento, ya que los inhibidores de betalactamasa actuales muestran una actividad limitada contra las metaloenzimas (4). Por el contrario, la ausencia de *blaIMP* concuerda con su baja prevalencia en América Latina (37). La detección de *blaKPC* en *A. baumannii* sugiere una transferencia de genes entre géneros, mientras que la ausencia de genes de carbapenemasa en *S. maltophilia* es coherente con su resistencia intrínseca mediada por las betalactamasas L1/L2 y los sistemas de eflujo (38). En conjunto, estos hallazgos revelan un escenario epidemiológico complejo impulsado por la transferencia horizontal de genes y la diversidad clonal, lo que subraya la necesidad de la vigilancia molecular y el control de las infecciones.

De otro modo, los péptidos evaluados LL37-1 y D-LL37 mostraron actividad inhibidora contra cepas resistentes a los carbapenémicos, con CMI que oscilaron entre 3.12 y 25 μM , comparables a estudios anteriores con análogos de LL37 (17,19,39). LL37-1 demostró una mayor potencia, probablemente debido a su configuración L nativa y a la retención de residuos anfipáticos críticos para la unión a la membrana. Por el contrario, la estereoquímica invertida del enantiómero D, podría estar asociada a cambios en la afinidad de interacción con los componentes de la envoltura bacteriana, a pesar de la mayor estabilidad proteolítica

(19), aunque este aspecto no fue evaluado directamente. El retraso en el crecimiento bacteriano observado es consistente con un mecanismo de acción asociado a la disrupción de la membrana (40). Sin embargo, el restablecimiento parcial del crecimiento podría explicarse por mecanismos adaptativos bacterianos. En este sentido, es consistente con otros estudios que sugieren que procesos como la remodelación lipídica de la membrana, modificaciones en el lipopolisacárido o la activación de bombas de eflujo podrían contribuir a la disminución de la susceptibilidad a péptidos antimicrobianos (41). Dado que estos mecanismos no fueron evaluados directamente en el presente estudio, su participación debe considerarse como hipótesis plausibles que requieren validación experimental adicional.

En general, estos resultados confirman la coexistencia de múltiples genes de carbapenemasas en aislados colombianos y destacan al LL37-1 como un candidato antimicrobiano prometedor. La optimización estructural y la combinación con betalactámicos podrían mejorar la eficacia y la estabilidad, ofreciendo nuevas estrategias terapéuticas contra *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, multirresistentes.

Este estudio presenta limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, los aislados clínicos proceden de una única Subred hospitalaria, lo que podría limitar la generalización de

los hallazgos a otros contextos epidemiológicos. Asimismo, la ausencia de tipificación clonal y caracterización genómica impide establecer relaciones filogenéticas, rutas de transmisión o la arquitectura genética completa de los determinantes de resistencia. Finalmente, la falta de validación en modelos *in vivo* restringe la interpretación de la eficacia observada *in vitro* en escenarios clínicos. En conjunto, estas limitaciones resaltan la necesidad de estudios futuros que integren enfoques genómicos, evaluación toxicológica y modelos animales, con el fin de consolidar el potencial terapéutico de estos compuestos en contextos clínicamente relevantes.

Conclusiones

Este estudio resalta la complicada epidemiología molecular de las bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos en Colombia, caracterizada por la prevalencia del gen *blaKPC* y la coexistencia de los genes *blaNDM* y *blaVIM* entre los aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. La detección simultánea de múltiples clases de carbapenemasas refleja una alta presión selectiva derivada del uso extensivo de antibióticos y enfatiza la urgente necesidad de fortalecer los programas de vigilancia molecular y control de infecciones en los entornos de salud de América Latina. La evaluación de los péptidos derivados de LL37 demostró que

tanto LL37-1 como D-LL37 poseen una actividad antibacteriana medible contra aislados resistentes a los carbapenémicos, destacando a LL37-1 como el péptido de mayor eficacia frente a la ruptura de la membrana. Estos resultados indican que la optimización estructural racional de LL37-1 puede mejorar aún más su potencial terapéutico. En conjunto, los datos genéticos y funcionales respaldan la relevancia de integrar el perfil de resistencia molecular con la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas. LL37-1 se perfila como un prototipo prometedor para el futuro desarrollo preclínico, ya sea como agente independiente o en combinación con betalactámicos convencionales, para combatir las infecciones causadas por patógenos Gram negativos multirresistentes.

Declaración sobre la disponibilidad de datos

El conjunto de datos adicionales está disponible previa solicitud a los autores.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Fuente de financiación

Este trabajo fue financiado por la Subdirección de Investigaciones de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Convocatoria Acuerdo 101 de 2023.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Subred Integrada de Servicios de Salud ESE - Hospital El Tunal por su ayuda en la recolección de aislados clínicos.

Contribuciones de los autores

PS realizó los experimentos, participó en el análisis de datos y contribuyó a la redacción del manuscrito. SO recolectó los aislados bacterianos, realizó la identificación bacteriana y las pruebas antimicrobianas. LS diseñó los péptidos, analizó los resultados y participó activamente en la redacción del manuscrito. JN diseñó el estudio y revisó críticamente el manuscrito. Todos los autores revisaron el manuscrito y aprobaron la versión final.

Aspectos éticos y transparencia

Este estudio quedó exento del requisito de obtener aprobación ética, ya que se trabajó con un banco de aislados completamente

anonimizado. No se utilizaron animales ni seres humanos y no se presentaron imágenes ni datos humanos potencialmente identificables en su manuscrito.

Referencias

1. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240077611>. 2023. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2023.
2. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Sep;12(9):826–36. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x PubMed PMID: 16882287.
3. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(Suppl 1):S28–36. doi:10.1093/infdis/jiw282 PubMed PMID: 28375512.
4. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(Suppl 7):S521–8. doi:10.1093/cid/ciz824 PubMed PMID: 31724045.
5. Bo L, Sun H, Li YD, Zhu J, Wурpel JND, Lin H, et al. Combating antimicrobial resistance: the silent war. *Frontiers in Pharmacology*. 2024. doi:10.3389/fphar.2024.1347750
6. Medina VA, García-Vega AS, Rodríguez F, Triviño-García ES, Robledo JA, Leal AL, et al. Epidemiological Genomics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals across Colombia. *npj Antimicrobials and Resistance*. 2025 Jul 21;3(1):64. doi:10.1038/s44259-025-00127-x
7. Bustos-Moya G, Josa-Montero D, Perea-Ronco J, Gualtero-Trujillo S, Ortiz-Aroca J, Novoa-Bernal Á, et al. Factors related to successful control of an outbreak by *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 in an intensive care unit in Bogotá, Colombia. *Infectio*. 2016;20(1). doi:10.1016/j.infect.2015.07.001

8. Saavedra SY, Bernal JF, Montilla-Escudero E, Arévalo SA, Prada DA, Valencia MF, et al. Complexity of Genomic Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Colombia Urges the Reinforcement of Whole Genome Sequencing-Based Surveillance Programs. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73. doi:10.1093/cid/ciab777
9. Niño-Vega GA, Ortiz-Ramírez JA, López-Romero E. Novel Antibacterial Approaches and Therapeutic Strategies. *Antibiotics*. 2025 Apr 1;14(4). doi:10.3390/antibiotics14040404
10. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*. 2018. doi:10.3390/biom8010004 PubMed PMID: 29351202.
11. Talapko J, Meštrović T, Juzbašić M, Tomas M, Erić S, Horvat Aleksijević L, et al. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. *Antibiotics*. 2022. doi:10.3390/antibiotics11101417
12. Yang J, Zhang J, Feng Z, Ma Y. The Role and Mechanisms of Antimicrobial Peptides in Overcoming Multidrug-Resistant Bacteria. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/molecules30010128 PubMed PMID: 39795190.
13. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacological Reports*. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences; 2016. p. 802–8. doi:10.1016/j.pharep.2016.03.015 PubMed PMID: 27117377.
14. Zhang HQ, Sun C, Xu N, Liu W. The current landscape of the antimicrobial peptide melittin and its therapeutic potential. *Frontiers in Immunology*. 2024. doi:10.3389/fimmu.2024.1326033
15. Doherty A, Murphy R, Heise A, Fitzpatrick F, Fitzgerald-Hughes D. Antimicrobial spectrum against wound pathogens and cytotoxicity of star-arranged poly-l-lysine-based antimicrobial peptide polymers. *J Med Microbiol*. 2024;73(9). doi:10.1099/jmm.0.001886 PubMed PMID: 39268705.
16. Zeth K, Sancho-Vaello E. The human antimicrobial peptides dermcidin and LL-37 show novel distinct pathways in membrane interactions. *Frontiers in Chemistry*. 2017. doi:10.3389/fchem.2017.00086
17. Voronko OE, Khotina VA, Kashirskikh DA, Lee AA, Gasanov VA oglu. Antimicrobial Peptides of the Cathelicidin Family: Focus on LL-37 and Its Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/ijms26168103 PubMed PMID: 40869425.
18. Santos P, Muñoz L, Cruz C, Navarrete J, Pinilla G. Péptidos antimicrobianos LL-37 y sus derivados frente a microorganismos de importancia clínica: Una alternativa a la resistencia microbiana. In: *Ciencia transdisciplinaria para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad* [Internet]. 2021. p. 198–215. Available from: https://drive.google.com/file/d/1_sfAIUHw6XKAMAea8wNicSdscQvTr55O/view
19. Alba MLS, Durán-Rodríguez AT, Pulido LMS, Escobar-Pérez J, Gutiérrez SA, Ospina JN, et al. Peptides DLL37-1 and LL37-1, an alternative to inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *An Acad Bras Cienc*. 2022;94(3):1–19. doi:10.1590/0001-376520220210848 PubMed PMID: 36350889.
20. Villa LM, Cortés JA, Leal AL, Meneses A, Meléndez MP, De Grebo N. Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* in colombian hospitals. *Revista Chilena de Infectología*. 2013;30(6):605–10. doi:10.4067/S0716-10182013000600005 PubMed PMID: 24522302.
21. CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. A CLSI supplement for global application. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.
22. Urmi UL, Nahar S, Rana M, Sultana F, Jahan N, Hossain B, et al. Genotypic to phenotypic resistance discrepancies identified involving β -lactamase genes, *blaPC*, *blaIMP*, *blaNDM-1*, and *blaVIM* in uropathogenic *klebsiella pneumoniae*. *Infect Drug Resist*. 2020;13. doi:10.2147/IDR.S262493

23. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1). doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
24. Jaglal P, Pillay M, Mlisana K. Resazurin microtitre plate assay and Sensititre® MycoTB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance in a high tuberculosis resistance setting. *Afr J Lab Med.* 2019;8(1). doi:10.4102/ajlm.v8i1.840
25. Sharma D, Poonam, Shrivastava R, Bisht GS. In Vitro Efficacy of Lipid Conjugated Peptidomimetics Against *Mycobacterium smegmatis*. *Int J Pept Res Ther.* 2020 Mar 1;26(1):531–7. doi:10.1007/s10989-019-09859-7
26. Casanova M, Maresca M, Poncin I, Point V, Olleik H, Boidin-Wichlacz C, et al. Promising antibacterial efficacy of arenicin peptides against the emerging opportunistic pathogen *Mycobacterium abscessus*. *J Biomed Sci.* 2024 Dec 1;31(1). doi:10.1186/s12929-024-01007-8 PubMed PMID: 38287360.
27. Chung CR, Chien CY, Tang Y, Wu LC, Hsu JBK, Lu JJ, et al. An ensemble deep learning model for predicting minimum inhibitory concentrations of antimicrobial peptides against pathogenic bacteria. *iScience.* 2024 Sep 20;27(9). doi:10.1016/j.isci.2024.110718
28. Braissant O, Astasov-Frauenhoffer M, Waltimo T, Bonkat G. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.547458
29. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences.* 2017;6(1):1. doi:10.3390/medsci6010001
30. Shahcheraghi F, Aslani MM, Mahmoudi H, Karimitabar Z, Solgi H, Bahador A, et al. Molecular study of carbapenemase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems and determining their clonal relationship using pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol.* 2017;66(5). doi:10.1099/jmm.0.000467
31. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2019. doi:10.1111/nyas.14223
32. Yang JW, Nam JH, Lee KJ, Yoo JS. Effect of temperature on carbapenemase-encoding plasmid transfer in *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms.* 2024;12(3). doi:10.3390/microorganisms12030454
33. Somboro AM, Sekyere JO, Amoako DG, Essack SY, Bester LA. Diversity and proliferation of metallo- β -lactamases: A clarion call for clinically effective metallo- β -lactamase inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology.* 2018. doi:10.1128/AEM.00698-18
34. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017. doi:10.1080/21505594.2016.1222343
35. Adelowo OO, Vollmers J, Mäusezahl I, Kaster AK, Müller JA. Detection of the carbapenemase gene *bla* VIM-5 in members of the *Pseudomonas putida* group isolated from polluted Nigerian wetlands. *Sci Rep.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-33535-3
36. Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, et al. Global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiological Research.* 2023. doi:10.1016/j.micres.2022.127249
37. Echegorry M, Marchetti P, Sanchez C, Olivieri L, Faccione D, Martino F, et al. National Multicenter Study on the Prevalence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in the Post-COVID-19 Era in Argentina: The RECAPT-AR Study. *Antibiotics.* 2024 Dec 1;13(12). doi:10.3390/antibiotics13121139
38. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012. doi:10.1128/CMR.00019-11
39. Li C, Cai Y, Luo L, Tian G, Wang X, Yan A, et al. TC-14, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide with broad-spectrum antibacterial activity and high safety profile. *iScience.* 2024 Jul 19;27(7). doi:10.1016/j.isci.2024.110404
40. Liu Y, Cui P, Tan R, Ru S. Rapid Membrane-Penetrating Hybrid Peptides Achieve Efficient Dual Antimicrobial and Antibiofilm Activity through a Triple Bactericidal Mechanism. *ACS Omega.* 2024 Jun 18;9(24):26133–48. doi:10.1021/acsomega.4c01577

41. Tajer L, Paillart JC, Dib H, Sabatier JM, Fajloun Z, Abi Khattar Z. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides in the Modern Era: An Updated Review. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. doi:10.3390/microorganisms12071259

© 2026 – Paola A Santos, Luz M Salazar, Sharon Ochoa, Jeannette Navarrette



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). Use, distribution, or reproduction in other forums is permitted, provided that the original author and copyright owner are credited and the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution, or reproduction is permitted that does not comply with these terms.