Naturaleza y Tecnología
Número especial
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

9º Encuentro Anual de
Estudiantes
26 al 28 de octubre de 2022

EFECTO DE PÉPTIDOS TRICOMICIDAS EN LA MICROBIOTA VAGINAL: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DE TERAPIAS ALTERNATIVAS

Ana Laura Gómez Méndez[a], María José Cortez Lagos[a], Patricia Nayeli Alva Murillo[a]

[a]Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, Guanajuato, Gto, C.P, 36050, México. pn.alva@ugto.mx

Resumen

El uso indebido de antibióticos en el cuidado de la salud ha propiciado el aumento de la resistencia antimicrobiana en patógenos de humanos, presentándose en patógenos asociados con infecciones de transmisión sexual, como el parásito *Trichomonas vaginalis*, agenta causal de la tricomoniasis. Actualmente, se han reportado aislamientos de *T. vaginalis* resistentes a metronidazol (MTZ) y tinidazol, únicos fármacos aprobados por la FDA para su tratamiento, lo cual es un problema de salud pública. Por lo que el desarrollo de terapias alternativas se vuelve apremiante. En ese sentido, los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas atractivas como tratamiento alternativo o complementario. En nuestro grupo de trabajo se ha reportado que algunos PAM y sus derivados (LL-37, KR-20, FK-13-NH_2 y KR-12) reducen la viabilidad y el crecimiento de *T. vaginalis* (sensible y resistente a MTZ), sin presentar efectos hemolíticos o citotóxicos significativos contra células de mamíferos. Sin embargo, se desconoce el efecto de los PAM sobre la microbiota vaginal, componente esencial del tracto genitourinario femenino que ayuda a mantener su homeostasis. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del péptido FK-13-NH_2 sobre el crecimiento de la microbiota vaginal, particularmente *Lactobacillus vaginalis* y *Lactobacillus acidophilus.*

Palabras clave: microbiota vaginal; resistencia microbiana; péptidos antimicrobianos

Naturaleza y Tecnología
Número especial
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

9º Encuentro Anual de
Estudiantes
26 al 28 de octubre de 2022

DCNE Semana de Innovación, Emprendimiento e Investigación

EFFECT OF TRICHOMONICIDAL PEPTIDES ON THE VAGINAL MICROBIOTA: IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE THERAPIES

Abstract

Antibiotic resistance is increased by the misuse of antibiotics in healthcare; this resistance is also reported in pathogens associated with sexually transmitted diseases, such as the parasite *Trichomonas vaginalis* which causes trichomoniasis. Currently, some *T. vaginalis* isolates have been reported to be metronidazole (MTZ) and tinidazole-resistant. These are the only drugs approved by the FDA for trichomoniasis treatment, which becomes a public health problem. For this, the development of alternative therapies becomes urgent. In this sense, antimicrobial peptides (AMPs) are attractive molecules for use as an alternative or complementary treatment. In our lab group, it has been reported that some AMPs and their derivates (LL-37, KR-20, FK-13-NH_2 y KR-12) reduce the viability and growth of *T. vaginalis* (one sensitive- and one resistant-strain to MTZ), without exerting either hemolytic or cytotoxic effects against mammalian cells. However, it is unknown their effect on vaginal microbiota. Considering that vaginal microbiota helps to maintain the female genital tract homeostasis, it is important to test the effect of these peptides on the vaginal microbiota. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of FK-13-NH_2 on the growth of the vaginal microbiota, particularly *Lactobacillus vaginalis*, and *Lactobacillus acidophilus.*

Keywords: vaginal microbiota; microbial resistance; antimicrobial peptides.

1. Introducción

El uso excesivo e indebido de antibióticos en el cuidado de la salud, el manejo inadecuado de los desechos y la transmisión ambiental, son algunos factores que han llevado al aumento de la resistencia antimicrobiana en patógenos de humanos, así como a su persistencia (Miethke, 2021). Es por ello por lo que la investigación y el descubrimiento de nuevos medicamentos es un reto global

en el que la industria farmacéutica tiene un papel fundamental. El procedimiento para desarrollar un nuevo fármaco es muy largo y requiere una gran inversión, sin olvidar que antes de que un medicamento llegue al mercado ha de ser sometido a un largo proceso que implica el descubrimiento y la experimentación con la molécula elegida, ensayos en animales y pruebas en humanos (Román, 2013).

T. vaginalis es un parásito y el agente causal de la enfermedad de transmisión sexual (ETS) llamada tricomoniasis. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay aproximadamente 340 millones de casos de ETS curables al año; 170 millones de esos casos son causados por *T. vaginalis*, lo que hace que la tricomoniasis sea la ETS no viral más común en el mundo (Cudmore y Garber, 2010). Aproximadamente el 75% y 50% de los hombres y mujeres, respectivamente, son asintomáticos. Cuando hay síntomas, en mujeres se observa leucorrea abundante, espumosa, fétida y de color amarillo verdoso, prurito, dispareunia y disuria, que se acentúan durante la menstruación. A la especuloscopia se observa eritema vaginal y cervical que muchos autores denominan “vagina en empedrado” y “cérvix en fresa”, debido a la dilatación de los capilares y a las hemorragias puntiformes (Cadena y col., 2006). Durante la infección, el pH vaginal puede aumentar hasta 5.0 (Lin y col., 2012). Por su parte, los síntomas en los varones son: secreción uretral serosa o purulenta, prurito en el glande, edema prepucial, erección dolorosa, eyaculación precoz y disuria (Ozdemir y col., 2011). La infección causada por *T. vaginalis* aumenta el riesgo de contraer el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); además, se sugiere que la tricomoniasis es un factor de riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino y de próstata agresivo (Prashini y col, 2002).

Actualmente existen dos fármacos de la familia de los 5-nitroimidazoles aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la tricomoniasis. El metronidazol (MTZ), que tiene una amplia actividad antimicrobiana, es la droga de elección. El MTZ, en forma oral a una dosis de

200-250 mg tres veces al día por siete días, fue el régimen de tratamiento tradicional para la tricomoniasis por muchos años, después de su lanzamiento inicial tuvo un éxito superior al 90% (Khambatta, 1971). A principio de los años 70´s, una única dosis oral de 2 g de MTZ fue considerada tan eficaz como el régimen de 7 días; así, este nuevo esquema se volvió más común gracias a la mayor conveniencia y apego al tratamiento. El éxito ha ido del 82- 100%, pero aún pueden ocurrir fallas (Jikipii y Jokipii, 1980). Aunado a esto, los pacientes sometidos a tratamientos con MTZ suelen presentar efectos secundarios como náuseas, vómito, calambres estomacales, dolor de cabeza, entre otros, que pueden llegar a ser incómodos y ocasionar que se abandone el tratamiento. Se han reportado aislamientos clínicos de *T. vaginalis* resistentes a MTZ (2.2-9.6%), lo cual es un problema de salud pública (Graves y col., 2020). Por ello el desarrollo de terapias alternativas se vuelve apremiante.

En ese sentido, los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas atractivas como tratamiento alternativo o complementario, ya que tienen propiedades microbicidas e inmunomoduladoras. En nuestro grupo de trabajo, se ha evaluado el efecto de la catelicidina humana LL-37 -con actividad microbicida e inmunomoduladora previamente reportada-, así como de péptidos derivados de ésta (KR-20, FK-13-NH_2 y KR-12) sobre el crecimiento y viabilidad de *T. vaginalis*. Ramírez-Ledesma y col. (2022) reportaron que el LL-37 y sus tres péptidos derivados inhiben la viabilidad y el crecimiento de los trofozoítos de una cepa resistente (CDC-085) y otra sensible (GT-13) a MTZ, de manera dependiente de la concentración (2, 5, 10 y 50 µM), siendo el FK-13-NH_2 el péptido más efectivo. Al mezclarse la concentración mínima inhibitoria 50 (MIC_{50}) de cada péptido con la MIC_{50} del MTZ, el crecimiento de ambas cepas de T. *vaginalis* se abate (0.02% de crecimiento). Además, con ninguna mezcla mencionada anteriormente se presenta efecto hemolítico ni citotóxico estadísticamente significativo. Sin embargo, el efecto de estos péptidos sobre la microbiota vaginal no había sido evaluado.

La microbiota asociada a la vagina está dominada por bacterias del género *Lactobacillus*. Estas bacterias son microorganismos inocuos que forman parte de la microbiota autóctona y, tan solo en casos excepcionales, han sido asociados a procesos patológicos en pacientes con enfermedades previas extremadamente graves. Se considera que la microbiota vaginal constituye la principal línea de defensa contra la colonización de patógenos oportunistas, por su capacidad de producir ácido láctico y bacteriocinas, y cuya integridad es fundamental para mantener la salud sexual y reproductiva. Con el advenimiento de la clasificación por métodos moleculares (fundamentalmente el análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S) se ha observado que los lactobacilos predominantes en vagina son *L. crispatus, L. iners, L. jensenii* y *L. gasseri*. También son frecuentes *L. salivarius* y *L. vaginalis*. Por último, aparecen con alguna frecuencia lactobacilos ambientales y colonizadores del tubo digestivo *como L. rhamnosus, L. casei* y *L. plantarum* (Reid, 2012). Teniendo en cuenta la relevancia de estos microorganismos en la homeostasis vaginal, en este proyecto se evaluó el efecto del PAM FK-13-NH_2 sobre la microbiota vaginal.

2. Objetivo

Determinar el efecto de FK-13-NH_2 sobre el crecimiento de *Lactobacillus vaginalis* y *Lactobacillus acidophilus*.

3. Metodología

3.1 *Péptido*

El péptido FK-13-NH_2 (FKRIVQRIKDFLRNH_2) se obtuvo de la casa comercial BIOMATIK®, con ≥95% pureza.

3.2 *Curva de crecimiento microbiana*

Se utilizaron las cepas certificadas de *L. acidophilus* (ATCC 4356) y *L. vaginalis* (ATCC 49540) donadas por el Dr. Luis Felipe Padilla Vaca del Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato. Las bacterias fueron cultivadas en agar MRS mediante el método de estría cruzada. Con ayuda de un asa microbiana, se tomó y cultivó una colonia bacteriana en 10 mL de caldo MRS estéril y se incubó durante 24 h a

37°C en agitación. Al día siguiente se inocularon 5 mL de la suspensión bacteriana en 250 mL de caldo MRS estéril. Se monitoreo (0-48 h) el crecimiento bacteriano por turbidimetría (DO_{600}). Para cada lectura se realizó la captura de datos en el programa Microsoft Excel y se obtuvo la gráfica en el mismo programa. Adicionalmente, se calculó el tiempo de generación de cada cepa, mediante la siguiente fórmula (Mendigan y col., 2012):

$$G = \frac{t}{3.3 \log\left(\frac{b}{B}\right)}$$

Donde:

G= tiempo de generación
t= intervalo de tiempo en h o min
($t_{final} - t_{inicial}$)
b= DO_{600} al término del intervalo
B= DO_{600} al inicio del intervalo

3.3 *Cálculo de unidades formadoras de colonia (UFC)/mL*

Se inoculó una colonia de *L. acidophilus* o *L. vaginalis* en tubos separados con 2 mL de caldo MRS estéril y se creció durante 24 h a 37°C en agitación. Posteriormente, se hizo la lectura del blanco (caldo MRS) en el espectrofotómetro (DO_{600}). En un tubo de 15 mL se agregó caldo MRS y cultivo bacteriano hasta alcanzar la DO_{600} de 0.1. Se realizaron diluciones seriadas del cultivo bacteriano ajustado a 0.1 (DO_{600}). Para *L. acidophilus* se hicieron diluciones 1:1,000 y para *L. vaginalis* 1:1,000,000. De las diluciones se tomaron 100 µL, se colocaron en agar MRS y se esparcieron con un asa en toda la placa hasta sequedad. Se realizaron tres placas por dilución. Se incubaron durante 24 a 48 h a 37°C. Posteriormente, se realizó el conteo de las UFC. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces de manera independiente.

3.4 *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)*

Se inocularon 5 mL de caldo MRS con una colonia bacteriana y se incubó toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm) por 24 h. Una vez cumplido el tiempo, se realizaron diluciones seriadas de los péptidos (10X las concentraciones requeridas; 500-9.76 µM) en ácido acético al 0.01% con 0.2% de albúmina sérico bovina (BSA), en tubos de vidrio cubiertos con sigmacote (Hancock, 1999).

Se disolvió el péptido en H_2O a un volumen final suficiente para todas las pruebas de un día. Se diluyó en un volumen de ácido acético al 0.02% con un 0.4% de BSA para obtener las concentraciones requeridas (0-50 μM). Se diluyeron los cultivos bacterianos en caldo MRS hasta obtener $2-7x10^5$ UFC/mL. Se colocaron 90 μL de la suspensión bacteriana en cada pozo de la columna 1-11 de una microplaca. En la columna 12 no se dispensó la suspensión bacteriana, solo fueron colocados 90 μL de caldo MRS (control de esterilidad). Se adicionaron 10 μL del péptido FK-13-NH_2 a cada pocillo de la columna 1-10 (la columna 11 es el control de crecimiento, sin péptido). Se incubó a 37°C por 24-48 h. La concentración mínima bactericida (CMB) se determina plaqueando los primeros 3 pozos (dilución 1:10) donde no se observe crecimiento visible, e incubando a 37°C por 18 h. La mínima concentración del péptido que previene cualquier formación de colonia residual es la CMB.

4. Resultados y Discusión

Lactobacillus es un género de bacterias que predominan en la microbiota vaginal en mujeres en edad reproductiva, producen ácido láctico y compuestos antimicrobianos (ej. bacteriocinas) que inhiben el crecimiento de la mayoría de los patógenos y mantienen un ambiente óptimo en la vagina (Martín et al. 2014). Por lo que la alteración en la microbiota vaginal pudiera favorecer el establecimiento de infecciones como la tricomoniasis, VIH y VPH (Kenyon y col., 2013; Van de Wijgert y Jespers, 2017). *L. acidophilus* y *L. vaginalis* fueron descritas por primera vez por el médico alemán A. Döderlein en 1894 y las denominó “Los bacilos de Döderlein” en su honor (Sánchez Hernández y col., 2012). Durante la infección por *T. vaginalis*, se ve perturbada la predominancia de estos bacilos, ya que el parásito induce un ambiente alcalino que no es favorable para los *Lactobacillus* y, por ende, la microbiota se ve alterada, ocasionando vaginitis. El único tratamiento empleado contra esta enfermedad consiste en fármacos de la familia de los 5-nitroimidazoles, como el MTZ. Derivado de la resistencia que han presentado algunos aislamientos clínicos de *T. vaginalis* a estos compuestos, las investigaciones se han enfocado en

identificar moléculas con actividad tricomonicida. En nuestro grupo de trabajo se ha reportado que algunos péptidos antimicrobianos y sus derivados reducen la viabilidad y el crecimiento de *T. vaginalis* (sensible y resistente a MTZ), sin presentar efectos hemolíticos o citotóxicos contra células de mamíferos. Sin embargo, se desconocía si afectaban el crecimiento de bacterias propias de la microbiota vaginal. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto del péptido FK-13-NH_2 sobre lactobacilos. En la figura 1 se muestra el monitoreo del crecimiento bacteriano de *L. acidophilus* durante 48 h, la fase estacionaria se alcanza a las 24 h de crecimiento. Además, al calcular el tiempo de generación del cultivo, este fue de 61.82 min.

En la figura 2 se observa el crecimiento de *L. vaginalis*, que llega a la fase exponencial de crecimiento alrededor de las dos horas, y a la fase estacionaria a 24 h. Al igual que con la cepa anterior se calculó el tiempo de generación (G) obteniendo un resultado de 92.86 min.

Para poder determinar la CMI del péptido antimicrobiano FK-13-NH_2 es necesario trabajar con un número conocido de UFC de la bacteria. Es por ello por lo que se determinó la densidad bacteriana de cada cepa al medir la DO_{600} a 0.1. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado y se promediaron los resultados. Cuando el cultivo bacteriano de *L. acidophilus* está ajustado a una DO_{600} de 0.1 se tienen $4.63x10^6$ UFC/mL; mientras que la densidad bacteriana para *L. vaginalis* es de $5.16x10^6$ UFC/mL. Posteriormente, se determinó la CMI del péptido FK-13-NH_2 sobre ambas cepas de lactobacilos. La concentración máxima elegida fue de 50 µM, concentración que prácticamente abate el crecimiento de *T. vaginalis*. Además, con las diluciones realizadas se abarcó la CMI_{50} del FK-13-NH_2 (11 µM) sobre la cepa de *T. vaginalis* resistente a MTZ. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la interacción de las bacterias con el péptido. El péptido (0.976-50 µM) no afectó el crecimiento de *L. acidophilus* ya que se mantuvo la turbidez en el cultivo bacteriano. El anterior es un resultado esperado, ya que la CMI_{50} del péptido -combinado con la CMI_{50} del MTZ- que se pretende emplear contra *T. vaginalis* corresponde a 11 µM,

por lo que no estaría generando daño a la microbiota.

Por su parte, con las máximas concentraciones empleadas del FK-13-NH_2 (12.5, 25 y 50 µM) no hubo crecimiento bacteriano de *L. vaginalis.* Entonces, se tomaron 100 µL de la dilución 1:10 de los primeros tres pozos donde *L. vaginalis* no creció a simple vista y se plaquearon en agar Mueller Hinton (MH). Después de la incubación se observaron colonias bacterianas en las placas de 50 y 25 µM era nulo; sin embargo, en la placa de 12.5 µM sí hubo crecimiento bacteriano (300 UFC/mL). La CMB del FK-13-NH_2 fue de 25 µM para *L. vaginalis*. Aún hace falta evaluar el efecto de los péptidos LL-37, KR-20 y KR-12 sobre el crecimiento de lactobacilos.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos indican que el péptido FK-13-NH_2 no afecta el crecimiento de *L. acidophilus* ni de *L. vaginalis*, al emplearlo a la CMI_{50} de la cepa de *T. vaginalis* resistente a metronidazol. Con lo cual se sugiere que el péptido puede emplearse como tratamiento alternativo contra el parásito.

6. Referencias bibliográficas

Cadena, V. D., Miranda, N. & Calderón, N. (2006) Tricomoniasis urogenital. *Medicina Familiar* 3(4), 84–9.

Cudmore, S. L. & Garber, G.E. (2010). Prevention or treatment: the benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. J Infect Public Health. 3(2), 47–53

Graves KJ, Novak J, Secor WE, Kissinger PJ, Schwebke JR, Muzny CA. (2020). A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in Trichomonas vaginalis. Parasitology. 147(13):1383- 1391.

Hancock, R. E. W. (1999). Modified MIC method for cationic antimicrobial peptides. Hancock Laboratory Methods. Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia. Available online at: http://www. cmdr. ubc. ca/bobh/method/modified-mic-method-for-cationicantimicrobial-peptides/Online posting date: September, 19.

Jikipii L, Jokipii AM. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. J Infec Dis 1980; 141: 317-325.

Kenyon C., Colebunders R., Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review. Am. J. Obstet. Gynecol. 2013;209:505–523. doi: 10.1016/j.ajog.2013.05.006.

Khambatta RB. Metronidazole in giardiasis. Ann Trop Med Parasitol 1971; 65: 487-489. 6.

Lin MC, Hui CF, Chen JY, Wu JL. (2012). The antimicrobial peptide, shrimp anti-lipopolysaccharide factor (SALF), inhibits proinflammatory cytokine expressions through the MAPK and NF-kappaB pathways in *Trichomonas vaginalis* adherent to HeLa cells. Peptides. ;38(2):197–20.

Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, D.P. Clark. 2012. Brock Biology of Microorganisms, 13ª ed. Benjamin Cummings.

Martín R, Miquel S, Langella P, Bermúdez -Humarán LG. (2014). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. Virulence. ;5(3):413 - 423. doi:10.4161/viru.27864.

Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T. et al. (2021) Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. Nat Rev Chem 5, 726–749

Ozdemir E, Keleştemur N, Kaplan M. Trichomonas vaginalis as a rare cause of male factor infertility at a hospital in East Anatolia. Andrología. 2011 Aug;43(4):283–5.

Prashini M, Wilkinson D, Connolly C, Moody J, Willen A. (2002) Trichomonas vaginalis is associated with pelvic inflammatory diseases in women infected with HIV. Clin Infect Dis. 34:519-22.

Ramírez-Ledesma, M. G., Rodríguez, M. C., Alva-Murillo, N., & Avila, E. E. (2022). The antimicrobial peptides LL-37, KR-20, FK-13 and KR-12 inhibit the growth of a sensitive and a metronidazole-resistant strain of Trichomonas vaginalis. *Parasitology Research*, 1-10.

Reid G. Probiotic and prebiotic applications for vaginal health. J. AOAC Int 2012: 95: 31-34.

Sánchez-Hernández, J. A., Coyotécatl-García, L. L., Enríquez-Guerra, M. Á., Mendoza-López, E., MuñozZurit, G., & Rivera-Tapia, J. A. (2008). Incidencia del bacilo de Döderlein y su influencia en la presencia de otros microorganismos en el canal vaginal. Universitas Médica, 49(2), 172-179.

Sutcliffe S, Neace C, Magnuson NS, Reeves R, Alderete JF. (2012). Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis--a proposed molecular mechanism. PLoS Pathog. ;8(8), 1002801.

Vázquez F, José García M, Pérez F, Palacio V. (2001) Trichomonas vaginalis: treatment and resistance to nitroimidazoles. Enferm Infecc Microbiol Clin. 19(3),114–24.

Figuras y Tablas

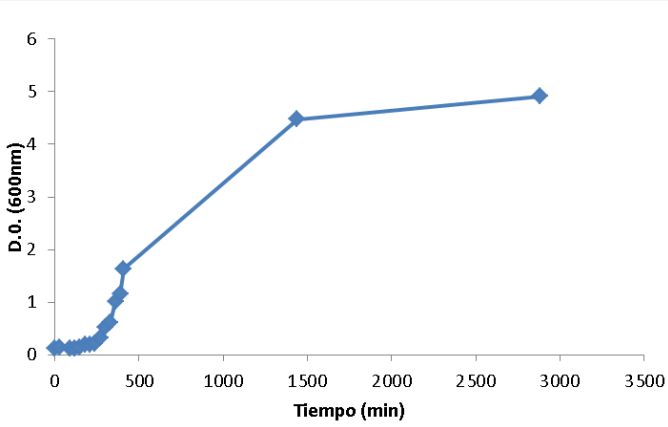

Figura 1. Curva de crecimiento de *L. acidophilus*

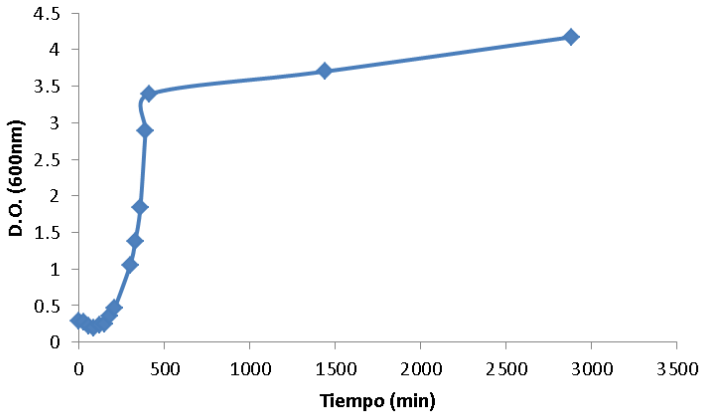

Figura 2. Curva de crecimiento de *L. vaginalis.*

Tabla 1. Efecto del péptido FK-13-NH_2 sobre el crecimiento de *L. acidophilus* y *L. vaginalis*

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FK-13-NH_2 (µM)	50	25	12.5	6.250	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	0.976	C+	C-
L. vaginalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L.acidophilus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, turbidez observada; -, sin turbidez.