

Bacteriocinas como alternativa farmacológica ante el reciente aumento de infecciones por *C. difficile* en México; proyecto teórico-experimental sobre la caracterización e identificación de Thuricina CD por cromatografía de líquidos de alta resolución

Atziri Gabriela Galicia-Alemán, Luis Fernando Hernández-Sánchez, José Carlos Lugo-González

¹Universidad La Salle México, Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad de México, México.
atz.gal03@gmail.com, luisgreen033@gmail.com, jc.lugo@lasallistas.org.mx

Resumen. En la última década la infección por *Clostridioides difficile* (ICD) se ha convertido en un problema creciente de salud, lo que ha propiciado que los métodos para su detección y tratamiento deban ser cada vez más avanzados. Recientemente, se identificó a la bacteriocina Thuricina CD como inhibidora contra *C. difficile*. El objetivo de este proyecto es proponer una metodología teórico-experimental en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la detección de Thuricina CD, con el fin de reducir el tiempo de experimentación. Mediante simulaciones se ha logrado reducir teóricamente el tiempo de identificación, lo que aporta indirectamente al desarrollo de aplicaciones con esta bacteriocina en el campo de la salud, mediante el uso de tecnologías innovadoras. Con base en estos resultados es posible ahorrar valiosos recursos y tiempo en el laboratorio.

Palabras Clave: Thuricina CD, *C. difficile*, CLAR = HPLC.

1 Descripción de la problemática prioritaria abordada

En los últimos años la infección por *Clostridioides difficile* se ha convertido en un problema de repercusión mundial. Actualmente, la prevalencia de cepas hipervirulentas resistentes es cada vez mayor y se sabe que la ICD es causante del 15-25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos, del 50-75% de colitis asociada a antibióticos y del 90-100% de colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos^[1]. En México, la incidencia de *C. difficile* en mujeres va del 34-62%, mientras que en hombres va del 38-66% y la edad promedio va de 53 a 60 años.^[8,9] En nuestro país también ha aumentado exponencialmente el número de casos considerados como enfermedades nosocomiales debidas a la ICD. Esto ha sido considerado un factor agravante en los pacientes hospitalizados por covid-19.^[5,7] La bacteria *C. difficile* puede infectar a nuestro organismo por contacto con agua potable, albercas, suelos, hospederos intermediarios y por ingesta de alimentos contaminados^[1,3] y además es importante señalar que la ICD está asociada a un consumo previo de antibióticos en los pacientes.^[6,7]

Los esfuerzos por enfrentar este problema han ido enfocados en la creación de nuevos antibióticos como el cadazolid y la surotomicina, así como el uso de anticuerpos monoclonales como el bezlotoxumab.^[2] En contraparte, la Thuricina CD es un antimicrobiano de dos componentes que muestra actividad contra *C. difficile*, en un intervalo tan bajo como el nanomolar. Esta es una bacteriocina producida por *Bacillus thuringiensis* DPC 6431, una cepa aislada de muestra fecal

humana. Se compone por dos péptidos conocidos como Trn α y Trn β , que actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de una amplia gama de aislados clínicos de *C. difficile* [4].

En este proyecto, con fines analíticos y perspectivas experimentales, proponemos la detección de Thuricina CD mediante la técnica de identificación y separación cromatográfica de mayor eficiencia (CLAR), integrando los principios fisicoquímicos de la separación química con una finalidad científico-social.

2 Objetivo

Buscamos aportar conocimiento sólido y verificable con el uso de tecnologías innovadoras en la investigación y el desarrollo de futuras terapias farmacológicas para afrontar esta creciente problemática en México y el mundo, atendiendo la problemática prioritaria en materia de salud conforme al ODS 3 Salud y bienestar y el ODS 9 Industria, Innovación e Infraestructura.

3 Propuesta de solución

Nuestro estudio se basa en las siguientes condiciones previas reportadas en la literatura como punto de partida:[4]

- Condiciones iniciales de la separación: extracción en fase sólida de la matriz inicial.
- Separación cromatográfica de los dos componentes de la mezcla; Trn(alfa) y Trn(beta), Mediante CLAR en fase reversa C18.

Estos estudios logran la separación de ambos componentes, pero tienen la desventaja de producir tiempos de análisis cromatográficos muy grandes, superiores a los 40 minutos. A partir de estas condiciones, nosotros simulamos condiciones experimentales para disminuir los tiempos de análisis, buscando que esto pueda aportar de manera significativa en estudios posteriores, especialmente en los que tengan por objetivo hacer frente a la ICD en México y el mundo.

Calculamos teóricamente el valor de logP (índice de hidrofobicidad) de ambos componentes de Thuricina CD para simular el cromatograma de separación utilizando el software en Excel "HPLC teaching assistant", mediante la modificación de parámetros cromatográficos como el flujo y la composición de la fase móvil. Nuestro estudio se ha realizado cambiando la fase móvil de acetonitrilo a metanol, lo cual significaría un ahorro de más del 50% en los costos de disolventes de grado HPLC y una gran reducción (40 veces) en los tiempos de análisis.

4 Discusión de resultados e impactos obtenidos

En el simulador se pueden variar parámetros de columna y la composición de la fase móvil metanol/agua, también se puede establecer el valor de flujo volumétrico y establecer los valores de logP de los analitos problema. En este caso, calculamos (Chemskech™) los valores logP de los componentes Trn(α) y Trn(β) de Thuricina CD que son 3.5 y 0.8 respectivamente. Con el fin de obtener una separación con una resolución aceptable con el menor tiempo posible ajustamos el flujo a 3.3 mL/min.

En ambas simulaciones se obtienen 2 picos bien definidos y resueltos con un tiempo de elución total de 1.0 y 0.8 minutos (80 y 90% de MeOH respectivamente). Los picos se encuentran separados uno de otro, lo que indica un resultado favorable. Mediante estas optimizaciones teóricas se puede lograr reducir el tiempo de identificación en laboratorio de Thuricina CD, aportando al

desarrollo de aplicaciones en el campo de la salud (ODS 3) por medio de herramientas tecnológicas innovadoras (ODS 9).

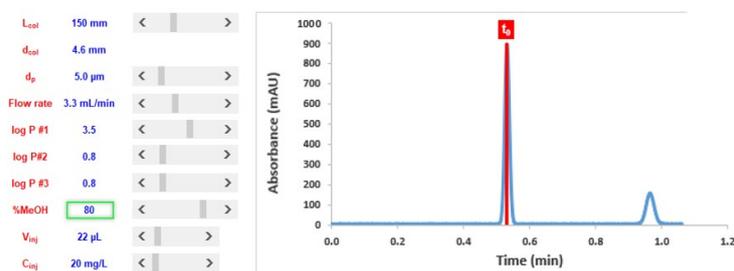


Figura 1. Cromatograma obtenido al ajustar el flujo en 3.3 mL/min con un porcentaje de metanol de 80. Recorte del simulador HPLC teaching assistant.

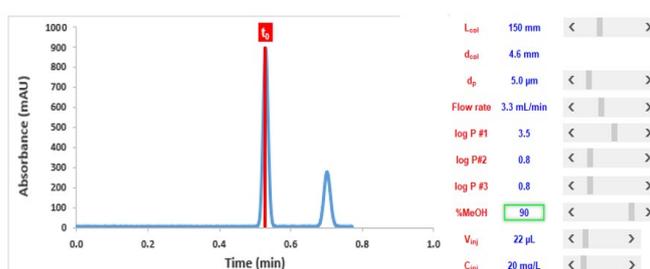


Figura 2. Cromatograma obtenido al ajustar el flujo en 3.3 mL/min con un porcentaje de metanol de 90. Recorte del simulador HPLC teaching assistant.

5 Conclusiones y perspectivas futuras

Las optimizaciones propuestas muestran resultados teóricos favorables, con base en estos resultados es posible ahorrar valiosos recursos y tiempo en el laboratorio, así mismo, con el uso de los simuladores, tanto estudiantes como investigadores adquieren una manera de predecir los resultados de experimentos en HPLC, así como experiencia en el manejo de las variables relevantes de esta técnica. Estas separaciones se pueden realizar con las columnas disponibles en la Facultad de Ciencias Químicas, las cuáles son la columna analítica Beckman Ultrasphere ODS DABS 5 µm, y la columna analítica Waters Spherisorb 5 µm ODS 2.

A corto plazo, proponemos complementar este estudio con otras composiciones de fase móvil (p. Ej. agua-acetonitrilo) con el uso de simuladores más robustos y con diseños experimentales que nos permitan corroborar nuestras predicciones. Otro aspecto para indagar experimentalmente es el efecto del pH en la fase móvil.

Es importante destacar que esta metodología puede ser adaptada a cualquier otra bacteriocina de interés, ya sea para desarrollo de alternativas contra bacterias patógenas en el sector clínico, alimentario o agrario; lo que puede traducirse en aplicaciones significativas debido a la amenaza que representa la ICD aunada a una resistencia antimicrobiana creciente.

6 Agradecimientos

Agradecemos al doctor Marco Antonio Loza Mejía por haber leído y corregido el trabajo, así como por auxiliarnos en la alineación de este con los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

A Jorge Garza Comparán de la licenciatura de Diseño Gráfico y Digital de la Universidad La Salle por apoyarnos en la realización de la cápsula de divulgación.

También agradecemos a la Facultad de Ciencias Químicas por habernos brindado el apoyo para participar en este concurso de Investigación.

7 Referencias

1. A.T. Abreu y AbreuJ.A. Velarde-Ruiz VelascoM.R. Zavala-SolaresJ.M. Remes-TrocheR.I. Carmona-SánchezJ.M. Aldana-LedesmaA. Camacho-OrtizR. Contreras-OmañaR. Díaz-SeoaneC.T. Elizondo-VázquezE. Garza-GonzálezG. Grajales-FigueroaO. Gómez-EscuderoJ.S. Jacobo-KaramM. Morales-ArámbulaL.O. Olivares-GuzmánJ. Sifuentes-OsornioA.G. Siu-MoguelR. Soto-SolísL.R. Valdovinos-GarcíaM.A. Valdovinos-DíazG. Vázquez-Elizondo, S.A. Lazo-de la Vega Jasso. (2019). Consenso sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*. Revista de Gastroenterología de México, 84(2), pp: 204-219. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.12.001>
2. Zhong Peng, Lifen Ling, Charles W. Stratton, Chunhui Li, Christopher R. Polage, Bin Wu, Yi-Wei Tang (2018). Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. Emerging Microbes & Infections, 7(1), pp:1-13 <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0019-4>
3. K. Warriner, C. Xu, M. Habash, S. Sultan, S.J. Weese. (2016). Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection?. Journal of Applied Microbiology, 122 (3), pp: 542-553. <https://doi.org/10.1111/jam.13338>
4. Mary C. Rea, Clarissa S. Sit, Evelyn Clayton, Paula M. O'Connor, Randy M. Whittall, Jing Zheng, John C. Vederas, R. Paul Ross, Colin Hill. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. PNAS, 107(20), pp: 9352-9357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913554107>
5. Sahil Khanna, Collen S. Kraft. (2021). The interplay of SARS-CoV-2 and *Clostridioides difficile* infection. Future Microbiology, 16(6), pp: 439-443. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0275>
6. R. Morfín-Otero, S. Petersen-Morfina, S.A. Aguirre-Díaza, H.R. Pérez-Gómez, E. Garza-González, E. González-Díaza, S. Esparza-Ahumada, J.A. Velarde-Ruiz Velasco, G. León-Garnica, R. Escobedo-Sánchez, E. Rodríguez-Noriega. (2020). Diarrea asociada a *Clostridioides difficile* en pacientes de servicios quirúrgicos en México. Revista de Gastroenterología de México, 85(3), pp: 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.05.003>
7. J.M. Remes-Troche. (2020). Un cuento de nunca acabar. *Clostridioides difficile*, un factor más a vigilar en el postoperatorio. Revista de Gastroenterología de México, 85(3), pp: 225-226. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.11.005>
8. AA. Martínez Rodríguez, LO. Estrada Hernández, P. Tomé Sandoval, J. Salazar Salinas. (2018). Diarrea por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados. Medicina Interna de México, 34(1), pp: 9-18. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i1.1921>
9. Sosa-Hernández O, Matías-Téllez B, González-Martínez J, Juárez-Vargas R, González-González NE, Estrada-Hernández A, Ruíz-Santana M, Bravata-Alcántara JC, Bello-López JM. (2021). Implementation of control measures against an outbreak due to *Clostridioides difficile* producing toxin B in a tertiary hospital in Mexico. J Prev Med Hyg. (62)E584-E513. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2021.62.2.1420> Bacteriocinas como alternativa farmacológica ante el reciente aumento de infecciones por *C. difficile* en México; proyecto teórico-experimental sobre la caracterización e identificación de Thuricina CD por cromatografía de líquidos de alta resolución