



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“Evaluación de la actividad de dos péptidos de catelicidina contra *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus casseliflavus*.”**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:**

**Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Presenta:**

**Teresa Monserrat Silis Moreno**

**Dirigido por:**

**Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito**

**Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito**  
**Presidente**

**Mtro. Edwin Esaú Hernández Arvizu**  
**Secretario**

**Dr. José Antonio Cervantes Chávez**  
**Vocal**

**Dr. José Alejandro García Arredondo**  
**Suplente**

**Mtra. Cecilia Quiroga Hernández**  
**Suplente**

**Centro Universitario, Querétaro, Qro.**

**Enero 2020**

**México**

## Resumen

En la actualidad, el aumento de bacterias patógenas resistentes a antibióticos es un problema grave de salud pública que requiere de atención inmediata, incluyendo, el desarrollo de tratamientos eficientes. En 2016, Hernández-Arvizu comprobó que existe actividad antimicrobiana en el veneno de la víbora de cascabel queretana *Crotalus aquilus*, una especie endémica del centro de México, que se encuentra ampliamente distribuida en el estado de Querétaro. Posteriormente, en 2019 identificó al gen que codifica a la catelicidina de *C. aquilus* y diseñó dos péptidos sintéticos, la catelicidina predicha y un péptido derivado, conformados por 34 y 23 aminoácidos, respectivamente. Ambos fueron retados contra tres diferentes especies de bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando su actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de estos dos péptidos de catelicidina de *Crotalus aquilus* contra *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus casseliflavus* y *Salmonella typhimurium*. El ensayo se realizó de acuerdo con lo establecido en los manuales del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) para el método de microdilución en caldo, obteniendo las siguientes dosis inhibitorias; para el péptido 1, *Staphylococcus saprophyticus*: 2 µg/ml; *Enterococcus casseliflavus*: 2 µg/ml y *Salmonella typhimurium*: 2 µg/ml. Para el péptido 2, *Staphylococcus saprophyticus*: 4 µg/ml; *Enterococcus casseliflavus*: 4 µg/ml y *Salmonella typhimurium*: 8 µg/ml. Por lo tanto, los dos péptidos evaluados tuvieron actividad antimicrobiana contra las cepas de las tres especies seleccionadas.

## Palabras clave

Catelicidina, Actividad antimicrobiana, *Crotalus aquilus*

## Summary

Currently, the increase in antibiotic-resistant pathogenic bacteria is a serious public health problem that requires immediate attention, including the development of efficient treatments. In 2016, Hernández-Arvizu verified that there is antimicrobial activity in the venom of the rattlesnake *Crotalus aquilus*, an endemic species from central Mexico, which is distributed in the state of Querétaro, to which it owes its common name. Later in 2019, he identified the gene that encodes the cathelicidin of *C. aquilus* and designed two synthetic peptides, the predicted cathelicidin and a derived peptide, consisting of 34 and 23 amino acids, respectively. Both were challenged against three different species of bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrating their antimicrobial activity. In the present work the antimicrobial activity of these two cathelicidin peptides against *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus casseliflavus* and *Salmonella typhimurium* was determined. The test was carried out in accordance with the guidelines of the Institute of Clinical and Laboratory Analysis (CLSI) for the method of broth microdilution, obtaining the following inhibitory doses; for peptide 1, *Staphylococcus saprophyticus*: 2 µg/ml; *Enterococcus casseliflavus*: 2 µg/ml and *Salmonella typhimurium*: 2 µg/ml. For peptide 2, *Staphylococcus saprophyticus*: 4 µg/ml; *Enterococcus casseliflavus*: 4 µg/ml and *Salmonella typhimurium*: 8 µg/ml. Therefore, the two evaluated peptides showed antimicrobial activity against the strains of the three selected species.

## Keywords

Cathelicidin, Antimicrobial [activity](#), *Crotalus aquilus*

## **Dedicatorias**

A mis padres y hermanos, por estar siempre a mi lado.

## **Agradecimientos**

A mis padres, por darme la vida, educarme y amarme. Por enseñarme que el esfuerzo tiene recompensa y brindarme todo su apoyo sin dudar de mí. Papá, gracias por ser el pilar de la familia. Mamá, gracias por darme todo a cambio de nada.

A mis hermanos, por estar a mi lado sin dudas, por los juegos, risas y también peleas, por ser incondicionales.

A mis abuelos, por ser una inspiración del trabajo duro y honesto, por sus historias y su gran apoyo a lo largo de mi vida.

A mi tía Miriam, por siempre cuidar de nosotros.

A mi familia Moreno López por estar siempre unidos.

A Pablo, por impulsarme a seguir y superarme, por confiar en mí y hacer que yo misma lo haga.

A Fernanda y Estela, porque a pesar de los años la amistad perdura.

A Sabina y Jessica, por brindarme un pedacito de sus corazones y regalarme dos hermanas que no sabía que iba a encontrar.

A Andira Hernández y Cecilia Quiroga, por darme la oportunidad de ser parte del equipo CVA, permitirme aprender de ellas y brindarme su ayuda de buena fe.

A la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, por su apoyo invaluable a lo largo de la carrera.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda y al M. en C. Edwin Hernández, por permitirme realizar este proyecto.

Al Dr. Antonio Cervantes y a su equipo de trabajo Evelia y Diana, por ayudarme dentro de su laboratorio y asesorar mi trabajo.

Al Dr. Alejandro García, por el tiempo y la paciencia brindados durante mi estancia en su laboratorio.

A Cecilia Quiroga, por aceptar asesorar mi trabajo, escuchar y guiarme.

Al Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro y a su equipo de trabajo, Guillermo, Eva y Ricardo por facilitar la toma de muestras y el manejo de los ejemplares.

Al M. en C. Óscar Rayas por su apoyo para la toma de muestras.

A todos los maestros que hicieron parte de mi formación profesional.

Agradezco a todas las personas que han cruzado por mi camino, a Dios y al destino, por permitirme crecer, aprender y seguir adelante.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Contenido

<u>Resumen</u> .....	2
<u>Palabras clave</u> .....	2
<u>Summary</u> .....	3
<u>Keywords</u> .....	3
<u>Dedicatorias</u> .....	4
<u>Agradecimientos</u> .....	4
<u>Índice de ilustraciones</u> .....	7
<u>Índice de tablas</u> .....	7
<u>Introducción</u> .....	8
<u>Revisión Bibliográfica</u> .....	10
<u><i>Crotalus aquilus</i></u> .....	10
<u>Descripción de la especie</u> .....	10
<u>Taxonomía</u> .....	10
<u>Hábitat y Distribución</u> .....	11
<u>Sistema inmunitario</u> .....	12
<u>Principales enfermedades infecciosas en reptiles</u> .....	15
<u><i>Staphylococcus saprophyticus</i></u> .....	16
<u><i>Enterococcus casseliflavus</i></u> .....	17
<u><i>Salmonella tiphymurium</i></u> .....	17
<u>Péptidos antimicrobianos</u> .....	18
<u>Estructura</u> .....	19
<u>Mecanismos de acción</u> .....	19
<u>Funciones inmunomoduladoras</u> .....	21
<u>Catelicidinas</u> .....	22
<u>Péptidos antimicrobianos encontrados en serpientes</u> .....	23
<u>Catelicidina de <i>Crotalus aquilus</i> y su péptido derivado</u> .....	23
<u>Hipótesis</u> .....	26
<u>Objetivo General</u> .....	26
<u>Objetivos específicos</u> .....	26
<u>Justificación</u> .....	26
<u>Metodología</u> .....	27
<u>Ensayo antimicrobiano</u> .....	27

Código de campo cambiado

<u>Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....</u>	<u>29</u>
<u>Resultados .....</u>	<u>30</u>
<u>Discusión.....</u>	<u>34</u>
<u>Conclusiones.....</u>	<u>40</u>
<u>Perspectivas.....</u>	<u>40</u>
<u>Bibliografía .....</u>	<u>41</u>

### Índice de ilustraciones

Ilustración 1 Organización en $\alpha$ -hélice predicha para la catelicidina de <i>C. aquilus</i> en el servidor HeliQuest. ....	<u>¡Error! Marcador no definido.</u>
Ilustración 2 Organización en $\alpha$ -hélice predicha para el péptido de 23 aminoácidos por el servidor Heliquest.....	<u>¡Error! Marcador no definido.</u>
Ilustración 3 Diseño experimental. ....	<u>¡Error! Marcador no definido.</u>

### Índice de tablas

Tabla 1 Absorbancias y análisis estadístico de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC BAA-750 .....	<u>30</u>
Tabla 2 Absorbancias y análisis estadístico de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 .....	<u>31</u>
Tabla 3 Absorbancia y análisis estadístico de <i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 700327 .....	<u>32</u>
Tabla 4 Concentración mínima inhibitoria obtenida en $\mu\text{g/ml}$ .....	<u>33</u>
Tabla 5 Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{M}$ .....	<u>33</u>

## Introducción

La resistencia a los antimicrobianos se define como “la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los agentes antimicrobianos actúen contra ellos.” En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten (OMS, 2017).

En 2017, un informe de la organización mundial de la salud destacó la inexistencia de nuevos antibióticos en fase de desarrollo para combatir la resistencia a los antimicrobianos, menciona que los pocos fármacos que se están desarrollando son modificaciones de antibióticos ya existentes y se indica que existen en la actualidad muy pocas opciones terapéuticas para las infecciones por microorganismos resistentes, las cuales causan alrededor de 250 000 muertes cada año.

Respecto a la salud veterinaria, la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) describe que hoy en día en muchos países los agentes antimicrobianos están disponibles sin ningún control, por lo que, conociendo el estatus preocupante de la resistencia antimicrobiana y las consecuencias de esta, dentro de su “Resolución N°. 26: Combatir la resistencia a los agentes antimicrobianos y promover el uso prudente de agentes antimicrobianos en los animales” (2015), se promueve la investigación para desarrollar alternativas al uso de agentes antimicrobianos en animales, incluyendo el desarrollo de vacunas y otras herramientas para las enfermedades prioritarias.

Los péptidos antimicrobianos son un mecanismo de defensa que se encuentra presente en una gran diversidad de organismos, desde moluscos hasta mamíferos, lo que sugiere que su presencia data desde etapas evolutivas primitivas. Estos péptidos son sustancias del sistema inmunológico que interactúan con la membrana de los patógenos y que además tienen funciones inmunomoduladoras (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007).

Hernández-Arvizu en 2019 trabajó con dos péptidos sintéticos; la catelicidina predicha de *C. aquilus* y un péptido derivado de ésta, conformados por 34 y 23 aminoácidos, respectivamente. Ambos fueron retados contra tres diferentes especies de bacterias: *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus casseliflavus*; demostrando actividad antimicrobiana contra ellas. Derivado de esta investigación, el presente trabajo caracterizó la eficacia antimicrobiana de estos dos péptidos de catelicidina frente a tres especies diferentes de microorganismos que presentan importancia en la salud humana y animal, de los cuales se tienen reportes de resistencia a antimicrobianos.

## *Crotalus aquilus*

### Descripción de la especie

Los machos adultos de *Crotalus aquilus* son grandes, generalmente exceden los 600 mm de longitud total, y las hembras un poco más pequeñas. El espécimen más grande reportado fue de 683 mm de longitud total (Campbell y Lamar, 1989). La forma del cuerpo es robusta y de talla grande; las escamas de la región dorsal de la cabeza, cuerpo y cola son aquilladas; el número de escamas de la región dorsal del cuerpo es de 21-23-17; presenta 22 escamas caudales y 151 escamas ventrales y posee una escama anal simple. El color de esta especie es café grisáceo, con parches dorsales más oscuros a lo largo del cuerpo. En la cabeza se observan un par de manchas café oscuro en la región occipital, así como franjas laterales café oscuro con bordes blancos que inician en la región preocular y supraocular, y terminan en las escamas supralabiales. La región ventral del cuerpo es de color crema y la zona caudal de color claro con anillos café oscuro (Ramírez-Bautista et al, 2000).

La víbora oscura queretana realiza su principal actividad durante las mañanas en días cálidos. Ramírez-Bautista et al (2000) mencionan que los hábitos de *Crotalus aquilus* son diurnos y crepusculares principalmente en áreas pedregosas del bosque de encino.

Su distribución se restringe únicamente a la región de la meseta central y partes de la Sierra Madre Oriental (Campbell y Lamar, 1989), tratándose de una especie endémica de México. Por lo anterior, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentra sujeta a protección especial.

### Taxonomía

Reino: *Animalia*,

Filo: *Chordata*,

Subfilo: *Vertebrata*,

Clase: *Reptilia*,

Orden: *Squamata*,

Suborden: *Serpentes*,

Familia: *Viperidae*,

Subfamilia: *Crotalinae*,

Género: *Crotalus*,

Grupo: *triseriatus*,

Especie: *C. aquilus*.

(Correa-Cano, *et al.*, 2006).

Nombre común: Cascabel Oscura de Querétaro, Hocico de puerco, Chiauhcóatl. (CONABIO, 2019).

La serpiente de cascabel oscura queretana pertenece al grupo *Crotalus triseriatus*. Este grupo contiene 9 especies *C. aquilus*, *C. armstrongi*, *C. campbelli*, *C. lepidus*, *C. morulus*, *C. pusillus*, *C. ravus*, *C. tlaloci* y *C. triseriatus* (Bryson *et al.*, 2010; Bryson *et al.*, 2014).

#### Hábitat y Distribución

*Crotalus aquilus*, la víbora de cascabel queretana, originalmente descrita como *C. triseriatus aquilus* por Klauber (1952), es endémica de México y habita afloramientos rocosos en bosques de pino-encino, mezquite-pastizales abiertos, bosques de matorrales subtropicales, y una variedad de cultivos de campo (Carbajal *et al.*, 2015). *Crotalus aquilus* se encuentra en el extremo sur de la meseta mexicana y en la mitad norte del Cinturón Volcánico Transmexicano, en los estados de Aguascalientes, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz; desde 1800 hasta 2627 m sobre el nivel del mar (Vázquez & Quintero 2005; Meik *et al.*, 2007). Otros autores indican que *C.*

*aquilus* puede encontrarse incluso a alturas mayores sobre 3100 m sobre el nivel del mar.

## Sistema inmunitario

La piel de los reptiles está conformada por una gruesa capa de queratina. Al ser la primera barrera física tiene la función de brindar protección ante los agentes del medio exterior. También cuentan con el mecanismo llamado ecdisis, una renovación fisiológica del último estrato de la piel.

Por otro lado, la mucosa de los reptiles carece de esta protección de queratina por lo que hace a estas superficies vulnerables ante eventos adversos, sin embargo, estas barreras mucosas no parecen presentar afecciones frecuentes ante microorganismos, por lo que es probable que existan mecanismos y compuestos fisiológicos responsables de brindarles protección (Jacobson, 2007).

En reptiles se presenta un sistema linfático constituido por redes linfáticas que forman plexos y grandes depósitos en forma de cisternas semejantes a los linfonodos en mamíferos. A su vez tienen estructuras que permiten bombear la linfa llamados corazones linfáticos, entre los principales están el yugular, el subclavio, el lumbar y el torácico (O'Malley, 2007).

El timo en serpientes es un órgano bilateral situado inmediatamente anterior al corazón. Éste es el primer órgano linfoide en desarrollarse. Es una fuente de linfocitos T, los cuales controlan la cinética de la inmunidad celular. Se ha descrito en la literatura como la involución y degeneración del timo en reptiles está ligada a factores medioambientales.

El bazo en reptiles es esférico, oval o triangular y elongado, rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso. En serpientes, este órgano es único pues está formado casi en su totalidad por pulpa blanca. Alrededor del 50 al 70% de los linfocitos esplénicos reptilianos son derivados del timo y se encuentran localizados en las áreas yuxta-arteriolar timo-dependientes. En algunas serpientes, el bazo se continúa con el páncreas, formando un "esplenopáncreas". Al igual que sucede en

**Comentado [UdMO1]:** Decía humoral. Revisa si el timo tiene esta función!

el timo, su involución y la arquitectura normal se pueden observar en condiciones medioambientales óptimas y estacionales, sin embargo, en ambos órganos a pesar de su reestructuración estacional, en adultos, no se mantiene la misma celularidad que en un individuo joven.

Existen diferentes compuestos inmunes no adaptativos presentes en secreciones y superficies mucosas, algunos de los cuales se expresan de manera constitutiva (Jacobson, 2007).

Dentro de estos factores podemos mencionar a los interferones, los cuales son una familia de citocinas con actividad antiviral. Se clasifican en tipo I y tipo II. Los interferones de tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) son proteínas que presentan actividad antiviral, mientras que los interferones tipo II ( $\gamma$ ) efectúan funciones de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares, la activación de macrófagos y la maduración de células T + CD4. Los interferones modulan la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa en procesos infecciosos e inflamatorios. También han sido reconocidos como potentes reguladores del crecimiento celular.

Otro factor es la transferrina que se encuentra en el plasma de todos los vertebrados. Esta proteína tiene una alta capacidad de unirse al hierro y secuestrarlo para así privar de este constituyente a los microorganismos que lo usan como factor de crecimiento. Las transferrinas presentan actividad bacteriostática y fungistática. Diversas investigaciones han determinado que temperaturas febriles están relacionadas al aumento de transferrinas y la actividad antimicrobiana que desarrollan.

La lisozima, factor antimicrobiano producido principalmente por la línea celular de monocitos y macrófagos, degrada el peptidoglicano en la pared celular de la bacteria, siendo bactericida contra bacterias Gram positivas.

El complemento es un complejo de 30 factores solubles y moléculas de unión a membrana que son parte de la llamada cascada inflamatoria del complemento. Esta cascada es filogenéticamente antigua, encontrándose incluso en invertebrados. Sus actividades biológicas afectan tanto a la inmunidad innata

como a la inmunidad adaptativa y sus funciones incluyen la lisis de microorganismos, la opsonización, el desencadenamiento de funciones celulares por la unión a receptores específicos y la depuración inmunitaria al eliminar complejos inmunitarios de la circulación (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007). Las moléculas que integran el sistema de complemento son glicoproteínas con diversas actividades fisicoquímicas. Entre los componentes más destacable se pueden mencionar la molécula C1q, cuya característica principal es su capacidad de unirse a la fracción Fc de las inmunoglobulinas cuando estas forman complejos antígeno-anticuerpo. Otro componente del complemento es la convertasa de C3, la cual escinde las moléculas C3 en C3a y C3b, las cuales se van anclando a la membrana del microorganismo por acción covalente. C3b también actúa como un focalizador para seguir con la activación del complemento, que en el caso de la ruta clásica y de las lectinas, sucede cuando un componente C3b se une a un complejo C4b2a y se forma la convertasa de C5. En el caso de la ruta alternativa, sucede cuando un componente C3b se une de manera covalente a otro C3b que formaba parte de la convertasa de C3, formando así la convertasa de C5. Esta enzima, al escindir el componente C5, desencadena el ensamble sobre la superficie del microorganismo del complejo de ataque a membrana (MAC) el cual está formado por los componentes C5b, C6, C7, C8 y un polímero de C9. Otro componente importante es la proteína de unión a mananos (MBP), de la ruta de las lectinas, la cual es similar a C1q en estructura. La MBP se une a extremos de manosa, fucosa y glucosamina de polisacáridos o glicoproteínas de membranas bacterianas. Cuando esto pasa, experimenta un cambio en su conformación y se activa su serin-proteasa (MASP), la cual actúa sobre C4 y C2 para producir una convertasa de C3 de la ruta clásica (Iañez, 1999).

Brown (2002) y Sunyer & Lambris (1998), describen que el sistema de complemento en reptiles está compuesto de múltiples isoformas de C3. Se especula que esto expande la capacidad inmunológica de reconocimiento.

Con formato: Sin Resaltar

## Principales enfermedades infecciosas en reptiles

Las enfermedades causadas por microorganismos son numerosas, sin embargo, entre estas podemos destacar las siguientes:

Las neumonías descritas en ofidios son de manera frecuente de tipo infeccioso producidas por un diverso número de agentes etiológicos, entre los que predominan las bacterias Gram negativas como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *E. coli*, *Acinetobacter* y micobacterias como *Mycobacterium chelonae*. (Rojas, Gómez, & Brieva, 2015). Douglas R. Mader (2005) describe como la neumonía puede ser de origen primario o secundaria a otra enfermedad, como la estomatitis.

Los procesos neumónicos en reptiles son generalmente derivados de malas condiciones ambientales o una dieta inadecuada, lo que se confirma porque los agentes involucrados son microorganismos oportunistas que forman parte de su microbiota o del ambiente. Algunos signos clínicos que se pueden observar en un animal que cursa por esta enfermedad son estertores, posición ortopnéica, disnea y secreción nasal (Jacobson, 2007).

La estomatitis es una condición de frecuente diagnóstico en la clínica de animales silvestres. Se relaciona principalmente con eventos estresantes como deficiencias medioambientales, nutricionales o una enfermedad subyacente, las cuales terminan favoreciendo el crecimiento de gérmenes patógenos (Peñuela & Brieva, 2007).

Varios autores indican que esta es una enfermedad causada por agentes etiológicos diversos y que en casos avanzados el pronóstico es casi siempre malo pues existe la posibilidad de diseminación hematógena, con complicaciones como neumonía, osteomielitis o gastroenteritis.

Otra enfermedad común son las gastroenteritis cuyas principales causas de esta patología son parásitos (helmintos y protozoarios), bacterias (*Salmonella* spp. *Shigella* spp. y *Proteus* spp.), infecciones virales (parvovirus, adenovirus),

cambios bruscos en la dieta, presencia de cuerpos extraños o iatrogénica (Galindo, 2005).

Entre estas causas, *Salmonella* es uno de los principales microorganismos que causa enfermedad gastrointestinal en reptiles. Numerosos autores han reportado aislamientos en individuos sanos en ambientes cautivos y en vida silvestre, así como aislamientos de úlceras en tracto gastrointestinal en serpientes (Mader, 2005).

Muchos reptiles albergan este microorganismo como parte de su microbiota, lo que puede dificultar la interpretación de su presencia. Los animales afectados con *Salmonella* usualmente no muestran signos clínicos. Estudios recientes muestran el aislamiento de *Salmonella* de hueso y sangre de serpientes con enfermedades vertebrales. Otro sitio de aislamiento que menciona Douglas R. Mader (2005), ha sido en lesiones por dermatitis vesicular tanto en serpientes como en lagartos. Este género bacteriano tiene importancia en la salud pública por su potencial zoonótico.

### *Staphylococcus saprophyticus*

La morfología de esta bacteria son cocos Gram positivos que se disponen en racimos con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ . No son móviles, no forman esporas y no son hemolíticos, Presentan reacción negativa coagulasa, descarboxilación de la ornitina, reducción de nitratos a nitritos y de fermentación de xilosa. Mientras que da resultados positivos en las siguientes pruebas: urea, catalasa, fermentación de maltosa y sacarosa (Gil, 2019).

En 2009 Denamiel *et al*, realizaron un estudio donde se caracterizó la prevalencia y el perfil de resistencia de *Staphylococcus* aislados de piodermas en perros y gatos, encontrando un porcentaje del 12.6% de *S. saprophyticus* resistentes a antibióticos betalactámicos.

Así mismo se reportó a este organismo como la segunda causa de infecciones urinarias en humanos y se describe como responsable de numerosas

infecciones nosocomiales (Gil, 2019). Lo que le otorga importancia dentro de la investigación de resistencia antimicrobiana a este microorganismo.

### *Enterococcus casseliflavus*

Estas son bacterias Gram positivas de forma cocobacilar, miden menos de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y se pueden observar formando cadenas, pares o de manera individual. Su crecimiento óptimo es a 37°C y a diferencia de otros enterococos, *E. casseliflavus* presenta un flagelo corto con el que se ha demostrado logra tener movilidad. Es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa negativa que no forma endosporas, son organismos quimiorganotrofos, no producen gas y fermentan carbohidratos para producir ácido láctico (Díaz, Rodríguez, & Raisa, 2010).

*E. casseliflavus* ha sido aislado del tracto gastrointestinal de especies animales domésticas y silvestres como parte de la microbiota y demuestra, como todos los Enterococos, resistencia natural a muchos antibióticos, además de que pueden adquirir esta misma a través del uso inadecuado de fármacos (Petrona & Bárcenas, 2014).

Este microorganismo se ha catalogado como patógeno oportunista, siendo de los principales causantes de infecciones intrahospitalarias tanto en humanos como en animales, pudiendo provocar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteremias, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central, intrabdominales y pélvicas (Díaz, Rodríguez & Raisa, 2010). Lo que en conjunto con su resistencia natural a diversos antibióticos lo convierte en un patógeno de importancia médica sujeto de investigación.

### *Salmonella typhimurium*

Su morfología corresponde a la de la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de un bacilo Gram negativo de 0.7 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, móvil, con flagelos distribuidos en forma peritrica, son anaerobios facultativos y no forman esporas (Tunes & Blas 2007). *S. typhimurium* no presenta afinidad por ningún

hospedador específico, por lo que afecta a diversas especies de animales domésticos, silvestres y al hombre. Los cuadros clínicos que pueden observarse son infección gastrointestinal e infección sistémica principalmente lo cual puede variar en cronicidad y signos clínicos según el hospedero, (Barreto, Castillo, & Retama, 2016).

Fàbrega, Ballesté-Delpierre & Vila (2015), mencionan que la gastroenteritis por salmonelosis se trata con fluoroquinolonas y cefalosporinas, pero en ciertas áreas del mundo, se han detectado cepas resistentes a dichos compuestos, en su estudio revisan los mecanismos por los cuales la bacteria lleva esto a cabo.

Fierro *et al.* mencionan, en su estudio realizado en 2011, que el uso indebido de antibióticos, incluyendo la subdosificación, la terapia con un único principio activo y, en algunos casos, la utilización de antibióticos como preventivos principalmente mediante la inclusión de los mismos en el alimento ha ocasionado el desarrollo de resistencia a antimicrobianos en bacterias asociadas a animales de consumo, por lo que el estudio de nuevos agentes antimicrobianos eficientes es indispensable para la salud pública.

## Péptidos antimicrobianos

El sistema inmunitario utiliza como efectores múltiples moléculas y receptores unidos a la membrana celular. En presencia de una infección o lesión existe la producción de moléculas solubles determinadas que pueden actuar de manera local, estas incluyen péptidos antimicrobianos tales como defensinas, y catelicidinas. (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007).

Los péptidos antimicrobianos pertenecen a una familia de sustancias con complejos mecanismos de acción relacionados a la interacción de estos con la membrana del patógeno para así afectar de manera interna a la célula, además de interactuar con el huésped mediante funciones inmunomoduladoras (Tellez & Castaño, 2010).

Existe una gran variedad de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS), entre los que se encuentran el LPS (Lipopolisacáridos) de las bacterias

Gram negativas y las lipoproteínas de bacterias Gram positivas. Los diferentes PAMPS interactúan con receptores celulares como el CD14, el TLR4 (Toll-Like Receptor) y el TLR2. Posterior al reconocimiento de estas moléculas, se inicia una cascada de señalización que finaliza con la translocación del factor nuclear NF- $\kappa$ B (Factor de transcripción nuclear kappa) hacia el núcleo y la consecuente transcripción de los genes que codifican para péptidos antimicrobianos (Castañeda *et al*, 2009).

### Estructura

La mayor parte de los péptidos antimicrobianos presentan carga positiva, lo que significa que son de carácter catiónico, esto se debe al gran contenido de arginina y lisina (residuos con carga positiva). Generalmente presentan una carga neta entre +2 y +9 y una proporción substancial ( $\geq 30\%$ ) de residuos hidrofóbicos. Además, en muchos de los péptidos que se han evaluado ha sido añadida una amidación en el extremo C terminal, la cual refuerza este carácter catiónico. La capacidad de los péptidos antimicrobianos para interactuar con las membranas es brindada al adoptar estructuras anfipáticas con extremos hidrófobos que enfrentan a otras moléculas hidrofílicas (Tellez & Castaño, 2010).

El principio estructural fundamental subyacente a todas las clases de péptidos es el diseño anfipático adoptado debido a la organización espacial de los grupos de aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos de la molécula. Algunos péptidos lineales como el de la polilla de seda, cecropin y el péptido magainin de la rana de uña africana (*Xenopus laevis*), después de entrar en contacto con una membrana, adoptan una estructura anfipática helicoidal secundaria. Los péptidos como las batenecinas y defensinas tienen una hoja  $\beta$  anti-paralela relativamente rígida restringida por los enlaces disulfuro como marco, alrededor del cual se organizan residuos catiónicos e hidrofóbicos (Brahmachary *et al*, 2004).

### Mecanismos de acción

Existen diversos mecanismos de acción, los cuales comprenden desde la interacción con la membrana plasmática, la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; hasta las funciones moduladoras, quimiotácticas y en el proceso de cicatrización (Tellez & Castaño, 2010).

Su carga catiónica y su anfipaticidad hace más fácil su interacción con las paredes celulares y membranas de los microorganismos, así mismo, se han propuesto diferentes mecanismos que explican sus funciones de promover por sí mismos la captación de agentes extraños, ejercer una acción detergente sobre la membrana celular y funcionar como poros en la membrana celular (Tellez & Castaño, 2010).

Los experimentos *in vitro* sugieren que los péptidos antimicrobianos generalmente funcionan mediante la interrupción selectiva de las membranas microbianas, esto conduce a la muerte celular debido a la pérdida de gradientes electroquímicos, la reducción de la resistencia al estrés osmótico, la filtración de contenidos celulares e interrupción de los procesos metabólicos (Lee *et al.*, 2017).

El primer paso en la interacción de los péptidos antimicrobianos con las bacterias es producido por la atracción electrostática dada por su carga positiva hacia las superficies aniónicas de las paredes bacterianas, carácter dado por la presencia de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos en las Gram negativas. Posterior a esta primera interacción, los péptidos desestabilizan áreas en la membrana externa lo que permite el paso a través de la bicapa lipídica, una vez que se encuentran dentro de la membrana, estos péptidos modifican su conformación y causan daños internos o en la membrana (Tellez & Castaño, 2010).

Se refieren tres mecanismos por los cuales los péptidos antimicrobianos interactúan con la membrana. Estos se describen a continuación.

Mecanismo de barril: al alcanzar una concentración suficiente los péptidos se introducen en la membrana para colocarse de manera perpendicular para crear poros hidrofílicos que provocan la pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana de las células patógenas. Estos poros se forman de manera irregular y pueden variar en cuanto a duración y tamaño (Tellez & Castaño, 2010).

Mecanismo de forma anular o toroidal: cuando los péptidos alcanzan una concentración límite, estos inducen a los lípidos de la membrana a plegarse, con lo

que se forma un poro conformado por los péptidos y los mismos lípidos. El poro se logra estabilizar por las interacciones hidrofóbicas del péptido que envuelven a las cabezas de los lípidos, orientando a los grupos hidrofílicos hacia el centro del poro, lo que secuestra el agua dentro del mismo, desestabilizando la membrana celular. (Tellez & Castaño, 2010).

Mecanismo de alfombra: a diferencia de los mecanismos anteriores, aquí los péptidos no se insertan en la membrana, sino que forman una serie de agregados en la cara externa de la membrana en forma de micelas causando que esta se debilite y eventualmente se lise, dañando la célula por pérdida de su citoplasma (Tellez & Castaño, 2010).

#### Funciones inmunomoduladoras

Además de su acción antimicrobiana dentro de la inmunidad innata, estos péptidos también actúan como inmunomoduladores, algunas de estas funciones van desde inducir la expresión de genes en monocitos, la quimiotaxis, la inducción de citocinas y la diferenciación celular. De esta manera se ven involucrados en la curación de lesiones y angiogénesis (Tellez & Castaño, 2010).

Se ha reportado que las defensinas pueden funcionar como agentes quimiotácticos, atrayendo células inflamatorias como neutrófilos, linfocitos B y macrófagos, además de que generan la activación tanto de estas células como de células epiteliales. Al mismo tiempo, las defensinas pueden presentar actividad antiinflamatoria por la inducción de IL-10 o SLPI (Secretory Leucocyte Protease Inhibitor). Rivas *et al* (2006) también mencionan que las células del bazo estimuladas con  $\alpha$ -defensinas humanas aumentan la producción de citocinas, así como la proliferación linfocitaria. Este mismo tipo de defensinas, cuando se administran a ratones, producen aumento sérico de IgG1, IgG2 e IgG2b. Así mismo, describen que se ha demostrado que el reclutamiento de las células dendríticas por parte de las defensinas puede iniciar y facilitar la respuesta inmune adaptativa.

Respecto a la actividad de las catelicidinas como inmunomoduladores, la catelicidina más estudiada es la LL-37 de humanos. Además de su acción directa con la membrana microbiana, este péptido puede actuar como quimioatrayente para

células linfoides, también estimula la producción de quimiocinas y aumenta la expresión de diversos receptores. Además, puede inhibir la muerte celular programada de los neutrófilos y aumentar la fagocitosis (Agier *et al.*, 2018).

En relación con otros péptidos antimicrobianos y su actividad inmunomoduladora aún existe un amplio campo de estudio para conocer todas sus implicaciones.

### Catelicidinas

Pertenecen a un numeroso grupo de péptidos antimicrobianos catiónicos. Sus espectros de actividad son variados y cubren una variedad de organismos que incluyen bacterias, hongos y virus envueltos. Además, neutralizan los efectos de la endotoxina bacteriana. Estas características hacen que esta familia de péptidos sean buenos candidatos en vista de un uso terapéutico (Olascoaga *et al.*, 2018).

La función de las catelicidinas incluye efectos quimiotácticos de leucocitos, la estimulación de la angiogénesis y la expresión de componentes extracelulares de la matriz (Molina, 2008).

Los péptidos antimicrobianos de la familia catelicidina, contienen péptidos señal altamente conservados y una pro-región Cathelin (inhibidor de catepsina L), sin embargo, muestran heterogeneidad en el dominio C-terminal que codifica el péptido maduro, el cual puede tener un tamaño de 12 a 80 residuos de aminoácidos (Bals, 2000). Tienen un mecanismo de acción similar al de las defensinas, específicamente con unión a los lipopolisacáridos bacterianos, pero además con capacidad quimiotáctica sobre monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4<sup>+</sup>, inhibiendo la respuesta celular inducida por células CD4<sup>+</sup> mediante la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (Hosokawa, 2006).

### Péptidos antimicrobianos encontrados en serpientes

Numerosos autores han reportado la presencia de distintos péptidos antimicrobianos en diversas especies de serpientes, algunos ejemplos se mencionan a continuación.

Con formato: Fuente: Cursiva

Wang *et al* (2008), reportan la purificación de un péptido similar a catelicidina, a partir del veneno de la serpiente *Bungarus fasciatus*, el cual demostró un buen efecto inhibitor ante diferentes cepas de microorganismos a bajas concentraciones y sin mostrar efecto hemolítico.

Algunos péptidos similares a  $\beta$ -defensinas han sido encontrados y reportados por Torres & Kuchel (2004) en venenos de diversos organismos, incluyendo serpientes.

Un péptido inusual en reptiles llamado Omwaprina, miembro de la familia proteica de las Waprinas fue aislada de la especie *Oxyuranus microlepidotus* por Nair *et al* (2007). Este péptido demostró actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas.

Según varios autores, en serpientes se han caracterizado numerosos péptidos antimicrobianos pertenecientes al grupo de las catelicidinas, como la batroxidina de la serpiente *Bothrops atrox*, la crotalicidina de *Crotalus durissus terrificus*, Hc-CATH de la serpiente marina *Hydrophis cyanocinctus*, NA-CATH de la cobra china *Naja atra*, entre otras.

### Catelicidina de *Crotalus aquilus* y su péptido derivado

En 2019, Hernández-Arvizu diseñó dos péptidos sintéticos a partir de la identificación del gen que codifica a la catelicidina de *C. aquilus*, la catelicidina predicha conformada por 34 aminoácidos y un péptido derivado conformado por 23 aminoácidos. Ambos fueron probados frente a tres especies de bacterias demostrando su actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Mediante una serie de procesos bioinformáticos se determinó que la catelicidina madura tiene la siguiente secuencia: KRFKFFKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVSFPF, componiéndose 13 lisinas, 2 argininas, 6 fenilalaninas, 4 valinas, 2 prolinas, 2 serinas, 2 isoleucinas, 1 leucina, 1 glicina y 1 metionina; conteniendo un total de 15 residuos básicos, que le otorgan una carga neta de +15. Adicionalmente, en la región C-terminal se añadió una

amidación con lo que la carga neta finalmente es +16. Este péptido tiene un peso de 4171.32 Da y un punto isoeléctrico de 12.09, que asciende a 14 tomando en cuenta el extremo amidado; su índice de hidrofobicidad (H) es de 0.254 y su momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) es de 0.440. En la Figura 1, se puede observar la organización predicha por el servidor Heliquest para la catelicidina madura de *Crotalus aquilus*.

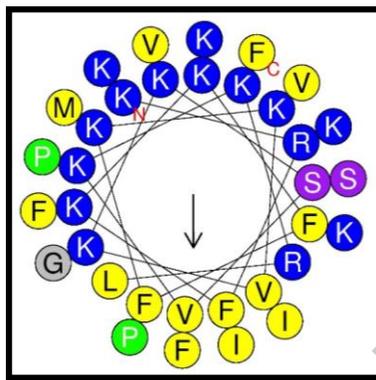


Figura 1 Organización en  $\alpha$ -hélice predicha para la catelicidina de *C. aquilus* en el servidor HeliQuest (tomada de Hernandez Arvizu 2019).

En los péptidos antimicrobianos hay dos características que se deben considerar importantes, estas son el índice de hidrofobicidad y el momento hidrofóbico, ya que, junto con la carga neta y la capacidad para tomar una forma helicoidal, son los factores que influyen sobre la efectividad antimicrobiana o el grado de citotoxicidad que puedan presentar (Dathe & Wieprecht, 1999).

En cuanto a las características del péptido derivado (23 aminoácidos), su secuencia es: FFKKVKKS VKRLKKIFKKPMVI. Tiene un peso molecular de 2848.72 Da, su carga neta es de +11, +12 con el extremo C-terminal amidado, un

punto isoeléctrico teórico de 11.56, índice hidrofóbico (H) de 0.232 y un momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) de 0.536.

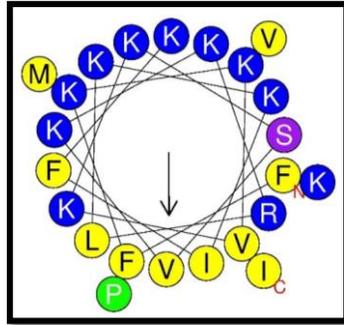


Figura 2 Organización en  $\alpha$ -hélice predicha para el péptido de 23 aminoácidos por el servidor Heliquest (tomada de Hernández Arvizu 2019).

Las características reportadas por Falcao *et al.* (2014) de tres péptidos antimicrobianos de vipéridos sudamericanos son las siguientes: La batroxidina, tiene una carga neta de +16 y un índice hidrofóbico de 0.207; la Crotalidina tiene una carga neta de +16 y un índice hidrofóbico de 0.263 y, por último, la Lachesidina, la cual presenta una carga neta de +16 y un índice de hidrofobicidad de 0.262. Ambos péptidos de *Crotalus aquilus* presentan características similares a estos (Hernández, 2019).

## Hipótesis

El péptido maduro de catelicidina de *Crotalus aquilus* y su péptido derivado tienen efecto antimicrobiano contra las bacterias Gram (+) *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus casseliflavus*, así como contra la bacteria Gram (-) *Salmonella typhimurium*.

## Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano de dos péptidos de catelicidina de *Crotalus aquilus* contra las bacterias Gram (+) *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus casseliflavus*, así como contra la bacteria Gram (-) *Salmonella typhimurium*.

## Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antimicrobiano del péptido maduro de catelicidina de *Crotalus aquilus* contra a *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus casseliflavus*.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano de un péptido derivado de catelicidina de *Crotalus aquilus* frente a *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus casseliflavus*.

## Justificación

La resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de los microorganismos a generar mecanismos que impidan que los antibióticos actúen contra ellos. En la actualidad esto representa una amenaza para la salud pública, la seguridad alimentaria, la salud animal, la producción agropecuaria y por ende para el desarrollo económico (FAO, 2017).

En 2017, un informe de la organización mundial de la salud destacó la inexistencia de nuevos antibióticos en fase de desarrollo para combatir la resistencia a los antimicrobianos.

*Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus casseliflavus* son microorganismos que presentan importancia en la salud humana y animal, de los cuales se tienen reportes de resistencia a antimicrobianos.

El día de hoy existen numerosas investigaciones que proponen a los péptidos antimicrobianos de diversas especies como agentes terapéuticos potenciales.

Anteriormente, el péptido maduro de la catelicidina de *Crotalus aquilus* y su péptido derivado demostraron buena actividad antimicrobiana cuando se evaluó su efecto contra tres diferentes especies de bacterias. Es necesario continuar con los estudios y evaluación de su potencial antimicrobiano con la finalidad de proponerlos como alternativa terapéutica.

## Metodología

Se trabajó con alícuotas de dos péptidos sintéticos de la catelicidina de *C. aquilus*, conformados por 34 y 23 aminoácidos predichos mediante análisis bioinformáticos a partir de transcritos obtenidos de biopsias de piel y mucosa oral de la serpiente *Crotalus aquilus* (Hernández, 2019).

## Ensayo antimicrobiano

Se evaluaron tres cepas de laboratorio: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA-750, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327. La técnica utilizada fue microdilución en caldo, la cual se realizó bajo los estándares aprobados en los manuales M07 "Métodos para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias de crecimiento aeróbico" y M100 "Estándares de rendimiento para la prueba de susceptibilidad

antimicrobiana” del CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio, por sus siglas en inglés).

Los péptidos se encontraban en alícuotas de 1 mg/ml, las cuales fueron ajustadas a 512 µg/ml, posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas para obtener las concentraciones sugeridas en los manuales mencionados anteriormente, siendo las siguientes: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 µg/ml.

Los antibióticos evaluados como control fueron ampicilina y gentamicina, con los cuales se realizó el ajuste a las mismas concentraciones antes mencionadas.

Los inóculos se realizaron tomando una colonia aislada de placas de agar no selectivo con una incubación previa de 18 a 24 horas y re suspendiendo en solución salina al 0.85%. Se ajustó la turbidez al estándar 0.5 de McFarland se realizó una medición a 625 nm en espectrofotómetro Thermo Scientific, esperando una absorbancia entre 0.08 – 0.12, en la cual se tiene un aproximado de  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/ml según lo reportado por Balouri *et al.*, (2016). Seguido a esto se realizaron los cálculos y diluciones correspondientes en caldo Mueller Hinton, hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$ , como lo sugiere el manual M07 del CLSI.

Con formato: Fuente: 11 pto

Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos, se colocaron 50 µl con el doble de la concentración final a evaluar de los agentes antimicrobianos, esto con la finalidad de obtener una dilución 1:2 de cada concentración una vez que el inóculo fuera depositado en cada pozo. Después de haber realizado esto, la microplaca se mantuvo a 4°C durante la preparación del inóculo bacteriano.

Finalmente, se añadieron 50 µl del inóculo en cada pozo, respetando un tiempo no mayor a 15 minutos posterior a su ajuste. Se utilizó como control positivo 50 µl de agua estéril más 50 µl de inóculo bacteriano y como control negativo 100 µl de caldo Mueller Hinton estéril. Se realizaron dos microplacas por cepa a evaluar, una placa para los antibióticos y otra para los dos péptidos correspondientes. El ensayo se realizó por triplicado, quedando el diseño experimental de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
B	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
C	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	Control negativo	Control positivo	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
D	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
E	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
F	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
G	0.25 µg/ml	0.25 µg/ml	0.25 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 3 Diseño experimental, donde en azul se muestran los pozos usados en un agente (ampicilina o pep23) y en melocotón los usados en otro (gentamicina o pep34).

Concluido este proceso, cada microplaca fue sellada con plástico film e incubada a 37°C por 20 horas.

### Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo por la comparación de la turbidez de los pozos control con aquellos que contenían los agentes antimicrobianos, tanto a simple vista como por lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 655 nm en un lector de placas.

Posteriormente se determinó la MIC, definida por el CLSI como “la concentración más baja de un agente antimicrobiano que previene el crecimiento

Con formato: Normal

visible de un microorganismo". Y a estos valores obtenidos, se calculó la media aritmética y la desviación estándar para los valores de absorbancia obtenidos en la lectura.

## Resultados

### Resultados

Se muestran las absorbancias de los ensayos antimicrobianos con las cepas de *S. saprophyticus* ATCC BAA-750 (Tabla 1) *S. typhimurium* ATCC 14028 (Tabla 2) y *E. casseliflavus* ATCC 700327 (Tabla 3) obtenidas a una longitud de onda de 655 nm en el lector de microplacas. En cada tabla se pueden observar la media aritmética, la desviación estándar y la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La comparación se llevó a cabo tomando como referencia los valores obtenidos del control positivo (agua estéril más inóculo) y del control negativo (caldo Mueller Hinton estéril).

Tabla 1 Absorbancias y análisis estadístico de *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA-750.

<b><i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC BAA-750</b>						
	Control (+)	Control (-)	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 23	Péptido 34
Absorbancia 1	0.291	0.034	0.039	0.03	0.033	0.091
Absorbancia 2	0.287	0.018	0.046	0.03	0.018	0.032
Absorbancia 3	0.237	0.031	0.097	0.031	0.032	0.036
Media aritmética	0.271666667	0.02766667	0.06066667	0.030333	0.02766667	0.053
Desviación estándar	0.030088758	0.0085049	0.0316596	0.00057735	0.0083865	0.0329697
MIC µg/ml	-	-	1 µg/ml	0.125 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml

Tabla 2 Absorbancias y análisis estadístico de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>						
	Control (+)	Control (-)	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 23	Péptido 34
Absorbancia 1	0.399	0.031	0.033	0.039	0.03	0.078
Absorbancia 2	0.323	0.018	0.02	0.037	0.018	0.032
Absorbancia 3	0.394	0.029	0.033	0.041	0.03	0.034
Media aritmética	0.372	0.026	0.0286667	0.039	0.026	0.048
Desviación estándar	0.042508823	0.007	0.0075056	0.002	0.0069282	0.026
MIC µg/ml	-	-	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	2 µg/ml	8 µg/ml

**Con formato:** Fuente: (Predeterminada) +Cuerpo (Calibri), 11 pto

**Con formato:** Normal, No conservar con el siguiente

**Con formato:** Fuente: (Predeterminada) +Cuerpo (Calibri), 11 pto

**Con formato:** Normal, No conservar con el siguiente

Tabla 3 Absorbancia y análisis estadístico de *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327.

<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 700327						
	Control (+)	Control (-)	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 23	Péptido 34
Absorbancia 1	0.297	0.178	0.042	0.077	0.046	0.068
Absorbancia 2	0.23	0.019	0.025	0.049	0.018	0.03
Absorbancia 3	0.257	0.029	0.043	0.034	0.035	0.059
Media aritmética	0.261333333	0.0753333	0.03766	0.053333333	0.033	0.0523333
Desviación estándar	0.033709544	0.0890524	0.009073	0.021825062	0.0141067	0.0198578
MIC µg/ml	-	-	0.125 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en el caso de *S. saprophyticus* ATCC BAA-750 en el ensayo con ampicilina fue de 1 µg/ml, con gentamicina de 0.125 µg/ml, el péptido de 34 aminoácidos 4 µg/ml y el péptido derivado, de 23 aminoácidos, de 2 µg/ml. Con *S. typhimurium* ATCC 14028, la concentración de ampicilina fue de 0.5 µg/ml, la gentamicina obtuvo una concentración de 0.25 µg/ml, el péptido de 23 aminoácidos una de 2 µg/ml y el péptido completo fue de 8 µg/ml. En el caso de *E. casseliflavus* ATCC 700327 la ampicilina fue a una concentración de 0.125 µg/ml, la gentamicina a una de 1 µg/ml, el péptido de 23 aminoácidos a 2 µg/ml y el péptido de 34 aminoácidos de 4 µg/ml. Según el manual M100 del CLSI, todos estos valores están dentro del rango establecido al cual las bacterias se consideran susceptibles a los antibióticos evaluados.

En la Tabla 4 se muestra el resumen y la comparación de las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas de cada uno de los agentes antimicrobianos.

Tabla 4 Concentración mínima inhibitoria obtenida en µg/ml

<b>Concentración Mínima Inhibitoria</b>				
<b>Microorganismos</b>	<b>Ampicilina</b>	<b>Gentamicina</b>	<b>Péptido 23 aminoácidos</b>	<b>Péptido 34 aminoácidos</b>
<i>S. saprophyticus</i> ATCC BAA-750	1 µg/ml	0.125 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	2 µg/ml	8 µg/ml
<i>E. casseliflavus</i> ATCC 700327	0.125 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml

En la Tabla 5 se muestra la concentración mínima inhibitoria expresada en micromoles.

Tabla 5 Concentración mínima inhibitoria en µM.

<b>Concentración Mínima Inhibitoria en µM</b>				
<b>Microorganismos</b>	<b>Ampicilina</b>	<b>Gentamicina</b>	<b>Péptido 23 aminoácidos</b>	<b>Péptido 34 aminoácidos</b>
<i>S. saprophyticus</i> ATCC BAA-750	2.86 µM	0.26 µM	0.70 µM	0.95 µM
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	1.43 µM	0.52 µM	0.70 µM	1.91 µM
<i>E. casseliflavus</i> ATCC 700327	0.357 µM	0.26 µM	0.70 µM	0.95 µM

## Discusión

Si se comparan los resultados de los cuatro antimicrobianos utilizados se puede observar que en lo que respecta al *Staphylococcus saprophyticus* el más eficiente fue la gentamicina con una concentración mínima inhibitoria de 0.125 µg/ml, seguido por la ampicilina con 1 µg/ml, posteriormente por el péptido de 23 aminoácidos con una concentración de 2 µg/ml y por último el péptido de 34 aminoácidos con 4 µg/ml de concentración.

En cuanto a *Enterococcus casseliflavus*, otra bacteria Gram negativa se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.125 µg/ml frente a la ampicilina, 1 µg/ml fue lo obtenido frente a la gentamicina, mientras que el péptido de 23 aminoácidos obtuvo una concentración de 2 µg/ml y el péptido de 34 aminoácidos presento una concentración mínima inhibitoria de 4 µg/ml.

En el caso de la bacteria Gram negativa *Salmonella typhimurium* presentó una MIC frente a la ampicilina de 0.5 µg/ml, con la gentamicina presentó 0.25 µg/ml, el péptido de 23 aminoácidos obtuvo una concentración de 2 µg/ml y el péptido de 34 aminoácidos de 8 µg/ml.

Como se puede observar, en todos los casos, con excepción del *Enterococcus*, la menor concentración fue dada por la gentamicina, esta diferencia puede ser explicada por su mecanismo de acción, este fármaco actúa inhibiendo la traducción del ADN de la bacteria al unirse a la unidad S30 del ribosoma, con lo que inhabilita el crecimiento bacteriano, mientras que la ampicilina actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular, uniéndose a las proteínas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins), sin embargo, la ampicilina no resiste la acción hidrolítica de las betalactamasas de muchas especies de *Staphylococcus* (Monroy *et al*, 2003).

En el caso del *Enterococcus casseliflavus* la bibliografía refiere que esta bacteria presenta resistencia natural a diversos fármacos, incluyendo aminoglucósidos y β-lactámicos, esta resistencia es dada por la presencia de genes

específicos que modifican la composición de la pared bacteriana y otros mecanismos como la transmisión de plásmidos (Palomo, 2012).

En cuanto a las concentraciones obtenidas por la catelicidina de *Crotalus aquilus* y su péptido derivado se puede apreciar que son más elevadas en comparación con los dos antibióticos utilizados, siendo el péptido de 23 aminoácidos 50% más efectiva que la catelicidina completa frente a las bacterias Gram positivas, mientras que el péptido de 34 aminoácidos obtuvo una concentración cuatro veces mayor a la obtenida por su derivado contra *Salmonella*, lo cual se explica con la naturaleza de estas bacterias y el mecanismo de los péptidos antimicrobianos, el cual se lleva a cabo formando poros en la membrana plasmática de la célula, lo cual en las bacterias Gram negativas se puede ver dificultado por la presencia de la doble pared celular que estas presentan.

Hernández-Arvizu (2019) llevó a cabo un ensayo antimicrobiano mediante microdilución en donde utilizó el péptido catelicidina completo de 34 aminoácidos, un péptido derivado de 23 aminoácidos, ampicilina y gentamicina frente a tres especies de bacterias, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las concentraciones que reporta para las bacterias Gram negativas son de 2 a 4 µg/ml para los péptidos catelicidina, estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente trabajo, pues las concentraciones obtenidas para la bacteria Gram negativa evaluada (*S. typhimurium* ATCC 14028) fueron 8 µg/ml, correspondiente al péptido completo de catelicidina, (teniendo una variación del doble sobre el ensayo de Hernández-Arvizu) y 2 µg/ml para el péptido de 23 aminoácidos. En cuanto a *S. aureus*, una bacteria Gram positiva, Hernández-Arvizu obtuvo concentraciones de 8 µg/ml con el péptido completo y 4 µg/ml con el péptido de 23 aminoácidos, en comparación con nuestros resultados frente a las bacterias Gram positivas (*S. saprophyticus* y *E. casseliflavus*) que presentaron una concentración mínima inhibitoria de 4 µg/ml en los ensayos con el péptido completo y de 2 µg/ml para aquellos con el péptido de 23 aminoácidos.

Al analizar estos resultados podemos darnos cuenta de que estos péptidos son eficientes contra bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las catelicidinas son péptidos catiónicos, esta propiedad permite su interacción con los fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana; también se sabe que son de carácter anfipático, es decir tienen regiones apolares (con aminoácidos hidrofóbicos) y regiones con cargas positivas (aminoácidos catiónicos, arginina, lisina o histidina), lo que facilita que posterior a la atracción de las regiones catiónicas con los fosfolípidos aniónicos, los lipopolisacáridos y los ácidos teicoicos, las regiones polares interaccionen con las cadenas polares de los fosfolípidos, lográndose la inserción del péptido en la membrana microbiana. Aunado a eso, los péptidos antimicrobianos son flexibles, lo cual permite la interiorización de estos hacia el citoplasma bacteriano (Castañeda-Casimiro, J. *et al.*, 2009).

Diversos péptidos antimicrobianos y sus derivados han sido descritos y evaluados frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, un ejemplo es la Crotalicidina (Ctn), reportada por Falcao *et al.* (2014) la cual frente a bacterias Gram positivas obtuvo un rango de concentraciones que va de 32 µg/ml a 128 µg/ml y su péptido derivado (Ctn 1-14) de 36 a 71 µg/ml, por otro lado OH-CATH, reportada por Zhang *et al.* (2010) obtuvo valores que van de 4 a 8 µg/ml, mientras que su derivado OH-CATH30 obtuvo uno de 3.125 a 25 µg/ml, en el caso de lo reportado por Lin Wei *et al.* (2015), la catelicidina de la serpiente marina *Hydrophis cyanocinctus* (Hc-CATH), presenta un rango frente a bacterias Gram positivas de 4.69 a >200 µg/ml, cabe resaltar que en este último estudio se utilizaron diversas cepas de aislados clínicos, por lo que se desconoce su capacidad de resistencia.

En cuanto a la catelicidina de *Crotalus aquilus* se obtuvieron rangos de 4 a 8 µg/ml para el péptido maduro y su derivado obtuvo rangos de 2 a 8 µg/ml. En cuanto a los rangos obtenidos por estos péptidos frente a bacterias Gram negativas, se observa que la Ctn obtuvo valores de 0.25 a 16 µg/ml, su derivado Ctn 1-14 obtuvo rangos mayores a 128 µg/ml, OH-CATH presentó valores de 2 a 16 µg/ml, su derivado OH-CATH30 un rango de 1.56 a 25 µg/ml y Hc-CATH reportan valores de 0.59 hasta >200 µg/m, para el péptido de 34 aminoácidos de *Crotalus aquilus* se obtuvo un rango de 2 a 8 µg/ml y para su derivado de 23 aminoácidos fue de 2 µg/ml para todas las bacterias Gram negativas evaluadas.

Se puede observar que las concentraciones mínimas inhibitorias del péptido de *Crotalus aquilus* y su derivado están en los rangos más bajos, siendo el segundo ligeramente más efectivo.

Por otro lado, al comparar las concentraciones mínimas inhibitorias en escala micromolar ( $\mu\text{M}$ ), se aprecia que existe una diferencia significativa con la ampicilina, cuya concentración efectiva va de  $0.357 \mu\text{M}$  a  $2.86 \mu\text{M}$  para las bacterias Gram positivas y de  $1.43 \mu\text{M}$  para la bacteria Gram negativas, en general los péptidos mantuvieron una diferencia significativa favorable frente a las tres cepas de laboratorio con las cuales se realizó el ensayo. En el caso de la gentamicina, se obtuvo una concentración de  $0.52 \mu\text{M}$  para *S. typhimurium*, siendo más efectiva que ambos péptidos, sin embargo, la diferencia es mínima, siendo sólo de  $0.18 \mu\text{M}$  con respecto al péptido de 23 aminoácidos. En el caso de las bacterias Gram positivas se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de  $0.26 \mu\text{M}$ , mostrando mayor efecto, pero al igual, con una diferencia no significativa.

En general se puede observar que el péptido de 23 aminoácidos presenta concentraciones mínimas inhibitorias ligeramente menores al péptido de 34 aminoácidos. Podemos atribuir esta efectividad a los valores que presenta en cuanto a hidrofobicidad, carga neta y a su momento hidrofóbico, pues a pesar de ser un derivado del péptido maduro conserva valores similares a los obtenidos por otros autores en diversas catelicidinas encontradas en serpientes y que han sido eficientes al evaluarse su actividad antimicrobiana. Un punto importante para resaltar es el hecho de que otros péptidos derivados no han tenido la misma efectividad que su péptido maduro correspondiente y por el contrario sus índices de efectividad presentan concentraciones muy elevadas, como es el caso de la Crotalidina reportada por Falcao *et al* (2014) que frente a *S. aureus* reporta una MIC de  $32 \mu\text{g/ml}$ , mientras que su péptido derivado de 1 a 14 aminoácidos presenta una concentración mínima inhibitoria de más de  $128 \mu\text{g/ml}$ .

Como se menciona antes, en los péptidos antimicrobianos hay dos características que se deben considerar importantes, estas son el índice de hidrofobicidad y el momento hidrofóbico, ya que junto con la carga neta y la

capacidad para tomar una forma helicoidal tendrán influencia sobre la efectividad antimicrobiana o el grado de citotoxicidad que puedan presentar (Dathe & Wieprecht, 1999). En este caso tomaron los primeros 14 aminoácidos del péptido maduro y obtuvieron una carga neta de +9, una hidrofobicidad de -0.012 y un momento hidrofóbico de 0.763, valores que diferían considerablemente del original, en el cual la carga neta se observó de +16, la hidrofobicidad de 0.263 y el momento hidrofóbico de 0.440, diferencia que a su vez se vio reflejada en su capacidad antimicrobiana, siendo la crotalidina más eficaz que su péptido derivado.

Otro ejemplo, es la catelicidina OH-CATH reportada por Zhang *et al* (2010), la cual presenta hidrofobicidad de 0.172, momento hidrofóbico de 0.457 y una carga neta de +15, mientras que su péptido derivado de 30 aminoácidos OH-CATH30, presenta los siguientes valores, hidrofobicidad de 0.235, momento hidrofóbico de 0.417 y carga neta de +12, por último, otro de sus derivados, el péptido OH-CATH6 presenta hidrofobicidad de 0.101, momento hidrofóbico de 0.730 y carga neta de +10. Si comparamos los resultados obtenidos en los ensayos antimicrobianos, se observa una MIC de 2  $\mu\text{g/ml}$  del péptido maduro frente a *E. coli*, de 6.25  $\mu\text{g/m}$  para OH-CATH30 y para OH-CATH6 una concentración de 12.5  $\mu\text{g/ml}$  contra esta misma cepa. En estos valores se puede apreciar la correlación entre la capacidad antimicrobiana del péptido y sus características de carga neta y anfipáticas.

El momento hidrofóbico “es una medida cuantitativa de la anfipaticidad del péptido, se define como la suma vectorial de los aminoácidos individuales” (Dathe, 1999). El mismo autor refiere la hidrofobicidad como “la capacidad de un péptido para pasar de una solución acuosa a una fase hidrofóbica”. Estas dos características en conjunto con la carga neta, la cual se relaciona con la interacción primaria con la membrana bacteriana van a establecer la capacidad del péptido para generar un efecto antimicrobiano, sin embargo, también pueden tener efectos sobre la citotoxicidad de este. Considerando que los valores del péptido derivado de *C. aquilus* son cercanos a los reportados en otros péptidos maduros, podría explicarse la razón por la que su efecto antimicrobiano corresponde a concentraciones mínimas y cercanas a la de la catelicidina madura.

Esto es importante resaltar pues al ser un péptido de menor tamaño hace que su síntesis química disminuya su costo. Por otro lado, no se ha reportado hasta ahora la eficacia de un péptido derivado por sobre la del péptido base. Esta situación expone un punto favorable para continuar con su investigación y su posterior producción con un enfoque clínico y de patente.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Conclusiones

La catelicidina de la víbora de cascabel *Crotalus aquilus* es un péptido con capacidad antimicrobiana que presenta un amplio espectro frente bacterias Gram negativas y Gram positivas. La catelicidina madura completa y su péptido derivado inhiben el crecimiento de las bacterias evaluadas a concentraciones comprendidas entre 0.95 – 1.91  $\mu\text{M}$  y 0.70  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En la mayoría de los casos demostraron ser mejores inhibidores que la ampicilina y la gentamicina, antibióticos utilizados en este trabajo para la comparación de la actividad antimicrobiana.

Los péptidos antimicrobianos son una alternativa para generar nuevos fármacos que actúen frente a microorganismos que actualmente tienen resistencia a los medicamentos disponibles en el mercado. Es importante continuar con los esfuerzos dentro de la investigación de este tipo de moléculas.

## Perspectivas

1. Evaluar capacidad antimicrobiana frente a microorganismos resistentes.
2. Evaluar las interacciones fisiológicas de la catelicidina de *C. aquilus* y su péptido derivado.
3. Establecer el mecanismo de acción específico de estos péptidos frente a diferentes microorganismos.
4. Evaluar la capacidad de acción de estos péptidos frente a otros microorganismos como hongos y parásitos.

**Con formato:** Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Cursiva

## Bibliografía

Agier, J., Rózsalska, S., Wiktorska, M., Zelechowska, M., Pastwinska, J., & Błaszczuk, E. B. 2018. The RLR/NLR expression and pro-inflammatory activity of tissue mast cells are regulated by cathelicidin LL-37 and defensin hBD-2. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1.

Bairbre O'Malley. 2007. *Anatomía y fisiología clínica de especies exóticas*. 1era edición. Servet. España. Páginas 43-45.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.

Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Journal respiratory Research*. 1(3): 141–150.

Barreto, M., Castillo, M. y Retama, P. 2016. *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Rev Chilena Infectol* 2016; 33 (5): 547-557.

Castañeda, J. et al., 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Mediagraphic*. Vol. 18, Núm. 1, Enero-Abril. 19-20.

Campbell, J. y Lamar, W. W. 1989. *The Venomous Reptiles of Latin America*. Cornell University Press. Ithaca and London.

Carbajal-Márquez, R. A., González-Saucedo, Z. Y. & ArenasMonroy, J. C. 2015. *Crotalus aquilus* Klauber, 1952 (Squamata: Viperidae), un nuevo registro estatal para Zacatecas, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 31(1): 131-133.

CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, EE.UU.

CLSI. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Ed. CLSI document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, EE.UU.

Cristina, T. B. 2004. Estudio y caracterización de aislados de *Enterococcus spp* obtenidos de aves silvestres. Universidad Complutense de Madrid. Centro de vigilancia sanitaria veterinaria. Revisado: 09/09/2019 <https://www.visavet.es/es/estudio-y-caracterizacion-de-aislados-de-enterococcus-spp-obtenidos-de-aves-silvestres/72=92/>

Correa-Cano, M., Ochoa-Ochoa, L., O. Flores-Villela, U. García-Vázquez, L. Canseco-Márquez. 2006. Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Dathe, M. & Wieprecht, T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysical Acta* 1462, 71-87.

Denamiel, G, Puigdevall, T., Más, J., Albarells, G., Gentilini, E. 2009. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *InVet*, vol. 11, núm. 2, julio-diciembre. Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina. Páginas 117-122.

Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., Raisa Zhurbenko. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 48(2)147-161.

Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. 2015. Differential impact of ramRA mutations on both ramA transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother*. Dec 17.

Fierro, M. A. *et al.* 2011. Resistencia Antibiótica en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima.

Galindo, M. A. 2005. Manual ilustrado de propedéutica clínica veterinaria en serpientes. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad De Estudios Superiores Cuautitlan. Tesis. México.

Gil, M. 2019. *Staphylococcus saprophyticus: Características y morfología*. *Lifeder Biología. Revista virtual*. Revisado: 09/09/2019 <https://www.lifeder.com/staphylococcus-saprophyticus/>

Hernández-Arvizu. 2019. Identificación y caracterización del efecto antimicrobiano de la catelicidina de *Crotalus aquilus*. Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Ciencias Naturales Maestría en Ciencias Biológicas. México.

Hosokawa, Y. Hosokawa, H. Komatsuzawa, R.B. Goncalves, N. Karimbux, M.H. Napimoga, *et al.* 2006. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol*, 146, pp. 218-225.

Jacobson, E. 2007. Infectious diseases and pathology of reptiles. 1era edición. Taylor & Francis Group. USA. Páginas 131 – 151.

Kindt, T.J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. 2007. Inmunología de Kuby (2nda ed). McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México. 3: 59-60

Klauber, L. M. 1952. Taxonomic Studies of the Rattlesnakes of Mainland México. *Bull. Zool. Soc. San Diego*. (26): 1-143.

Meik, J. M., Mociño-Deloya, E. & Setser, K. 2007. New distribution records for the Querétaro Dusky Rattlesnake *Crotalus aquilus* (Viperidae), with comments on morphology and habitat use. *Western North American Naturalist*, 67: 601-604.

Molina, M.T. 2008. Patogenia de la Rosácea. Actualización: Expresión Anormal de un Péptido Antimicrobiano, la Catelicidina, Estrés Oxidativo y Niveles de Ferritina. *Rev. Chilena Dermatología*. Vol. 25(1):57-61

Nair, D.G.; Fry, B.G.; Alewood, P.; Kumar, P.P.; Kini, R.M. 2007. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. *Biochem. J.* 402, 93–1.

Petrona, H. & Bárcenas, E. C. 2014. Identificación fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de especies de *Enterococcus* en ganado porcino. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León. Facultad de Ciencias Médicas. Páginas 1- 15.

Peñuela, S. M. & Brieva, C. 2007. Revisión de estomatitis ulcerativa. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, vol. 54, núm. I, 2007, pp. 43-49 Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Colombia.

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., Víctor-Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*. vol.48, no.1, enero-febrero.

Rojas-Sereno, Gómez-Acosta, & Brieva-Rico. 2015. Estomatitis ulcerativa infecciosa como consecuencia de un traumatismo en una Boa constrictor con desarrollo de neumonía bacteriana y septicemia. *Mem. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv.* 11: 2

Tellez, G. & Castaño, C. 2010. Antimicrobial peptides. *Asociación Colombiana De Infectología. Revista Infectio.* 14(1): 55-67.

Torres, A.M., Kuchel, P.W., 2004. The b-defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon* 6, 581–588.

Tunes, M. & Blas, G. 2007. *Microbiología Veterinaria: Salmonella*. Editorial Inter-Médica. Buenos aires, Argentina. Páginas: 210 – 214.

Vázquez-Díaz, J. & Quintero Díaz, G. E. 2005. *Anfibios y reptiles de Aguascalientes*. 2da Ed. CONABIO. CIEMA. Internacional de Relojes S.A. de C.V. México. 318 p.

Wang Y., Hong, J., Xiuhong, L., Hailong, Y., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., Lai, R. 2008. Snake Cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a Potent Peptide Antibiotics. PLOS ONE 3 (9). China, 1-9.

Zanetti M, Gennaro R., Skerlavaj B., Tomasinsig L., Circo R. 2002. Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials. Journal Current Pharmaceutical Design Pharm. Vol.8(9):779-93.

Dirección General de Bibliotecas UAQ