



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Caracterización de la actividad antimicrobiana del veneno de *Crotalus aquilus* contra *Pseudomonas aeruginosa***

**Tesis Individual**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de**

**Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Presenta:**

**Edwin Esaú Hernández Arvizu**

**Dirigido por:**

**Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito**

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Presidente

\_\_\_\_\_ Firma

Dr. José Alejandro García Arredondo  
Secretario

\_\_\_\_\_ Firma

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú  
Vocal

\_\_\_\_\_ Firma

M. en C. Mario Hidalgo Ruíz  
Suplente

\_\_\_\_\_ Firma

Facultad de Ciencias Naturales  
Querétaro, Qro.  
Agosto, 2016  
México

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Índice

Resumen .....	iii
Summary .....	iii
Introducción .....	1
Revisión Bibliográfica .....	4
Descripción de la especie .....	4
Taxonomía .....	4
Descripción .....	4
Hábitat y Distribución .....	5
Enfermedades en serpientes causadas por bacterias .....	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
Descripción y composición del veneno de las serpientes y de su efecto antimicrobiano.	8
Péptidos antimicrobianos, estructura y mecanismo de acción .....	11
Mecanismos de acción .....	11
Interacciones de los péptidos antimicrobianos con la membrana plasmática .....	12
Funciones inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos .....	14
Estructura de $\beta$ -defensinas .....	15
Catelicidinas .....	16
Péptidos antimicrobianos encontrados en serpientes .....	16
Técnica de FPLC .....	18
Hipótesis .....	20
Objetivo General: .....	20
Objetivos específicos: .....	20
Justificación .....	20
Metodología .....	21
Obtención de muestras .....	21
Cuantificación de proteína .....	24
Fraccionamiento del veneno mediante FPLC .....	25
Análisis de la actividad antimicrobiana .....	26
Resultados .....	28
Discusión .....	34

Conclusiones.....	36
Referencias Bibliográficas:.....	37

### **Índice de Figuras**

Figura 1. Cromatografía de filtración en gel sobre Sephadex G-50 del veneno de <i>Crotalus aquilus</i> .....	29
Figura 2. Placa crecimiento control.....	31
Figura 3. Placa crecimiento c/Veneno 2 ug/ml.....	31
Figura 4. Placa crecimiento c/F1 2 ug/ml.....	31
Figura 5. Placa crecimiento c/F2 2 ug/ml.....	31
Figura 6. Placa crecimiento c/F3 2 ul/ml.....	31
Figura 7. Placa crecimiento c/Veneno 30 ug/ml.....	32
Figura 8. Placa crecimiento c/F1 30 ug/ml.....	32
Figura 9. Placa crecimiento c/F2 30 ug/ml.....	32
Figura 10. Placa crecimiento c/F3 30 ug/ml.....	32
Figura 11. Número de UFC promedio de los ensayos realizados a concentración de 2 $\mu$ g/ml.....	33
Figura 12. Número de UFC promedio de los ensayos realizados a concentración de 30 $\mu$ g/ml. ....	33

### **Índice de Tablas**

Tabla 1. Resultados de los conteos UFC a 2 $\mu$ g/ml .....	30
Tabla 2. Resultados de los conteos UFC a 30 $\mu$ g/ml. ....	30

## Resumen

Se determinó la actividad antimicrobiana del veneno de víbora de cascabel *Crotalus aquilus* mantenidas en cautiverio en dos UMAs en la ciudad de Querétaro. Se evaluó el veneno total, así como las fracciones obtenidas mediante FPLC en columna Sephadex G-50 y se determinó la concentración proteica mediante método de Bradford. Posteriormente se sembraron alícuotas de las fracciones y el veneno a concentraciones de 2 $\mu$ g/ml y 30  $\mu$ g/ml con colonias de *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvieron tres picos después del fraccionamiento cromatográfico (F1, F2 y F3), teniendo concentraciones de veneno completo, 3.21  $\mu$ g/ $\mu$ l; F1, 2.0642  $\mu$ g/ $\mu$ l; F2, 3.0566  $\mu$ g/ $\mu$ l; F3, 0.81  $\mu$ g/ $\mu$ l. En conteo de UFC, a concentración de 2 $\mu$ g/ml se obtuvieron resultados similares en todas las fracciones (Promedio de UFC: F1, 102; F2, 100.67; F3, 90.33) y el veneno completo (105.33 UFC), siendo estadísticamente distintas al grupo control (243 UFC), mientras que a concentración de 30  $\mu$ g/ml se ve una mayor actividad bactericida en el veneno completo (47.33 UFC) seguido de la fracción 3 (69 UFC) ( $P < 0.05$ ). Las F1 y F2 no variaron en su resultado al aumentar la concentración. Todas las fracciones del veneno tienen actividad bactericida a las dos concentraciones evaluadas, el veneno completo a mayor concentración muestra una mayor capacidad bactericida que las fracciones por sí solas. La fracción 3, conteniendo proteínas y péptidos de menor tamaño, mostró mayor actividad bactericida que las otras dos fracciones.

Palabras clave: antimicrobiana, veneno, *Crotalus*, *Pseudomonas*

## Summary

The antimicrobial activity of the venom of the rattlesnake *Crotalus aquilus* kept in captivity in two UMAs in Queretaro city was determined. The whole venom and the fractions obtained by FPLC column Sephadex G-50 were used. Protein concentration was determined by the Bradford method. Subsequently, aliquots of the fractions and whole venom at concentrations of 2  $\mu$ g/ml and 30  $\mu$ g/ml with *Pseudomonas aeruginosa* colonies were evaluated. Three peaks were obtained after the chromatographic fractioning (F1, F2 and F3) and the concentrations obtained were: whole venom, 3.21  $\mu$ g/ $\mu$ l; F1, 2.0642  $\mu$ g/ $\mu$ l; F2, 3.0566  $\mu$ g/ $\mu$ l and F3, 0.81  $\mu$ g/ $\mu$ l. The counts of UFC were similar in all fractions (average UFC: F1 102, F2, 100.67; F3, 90.33) and the whole venom (105.33 UFC) when concentration of 2  $\mu$ g/ml was used but were statistically different to control group (243 UFC); while at concentration of 30  $\mu$ g/ml, a higher bactericidal activity is seen in the whole venom (47.33 UFC) followed by fraction 3 (69 UFC) ( $P < 0.05$ ). The F1 and F2 did not vary in UFC counts with an increasing concentration. All fractions of the venom had bactericidal activity at both concentrations evaluated; the whole venom at a concentration of 30  $\mu$ g/ml showed higher bactericidal activity than the individual fractions. Fraction 3 containing smaller proteins and peptides, showed better bactericidal activity than the other two fractions.

Key words: antimicrobial, venom, *Crotalus*, *Pseudomonas*

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a Dios que siempre está conmigo y me permite avanzar en la vida bajo su protección y guía.

A mis padres y hermanos que son lo más valioso que tengo, y son mi inspiración, soporte y fortaleza.

A mi familia y amigos, que me han brindado apoyo siempre que los he necesitado.

A la memoria de mi abuelo José, mi abuela Chucha y mi tía Candelaria, que desde el Cielo siguen pendientes de nosotros, y que siempre creyeron en mí.

A todos los que, a lo largo de mi vida, han creído que puedo alcanzar las metas que me plantee.

## **Agradecimientos**

A Dios, por el regalo de la vida, por la oportunidad de vivir esta experiencia, por todas las bendiciones que me ha dado, entre ellas a mi familia, por estar conmigo en cada instante y por la fortaleza y guía para enfrentar cada proyecto.

A mis padres, por el apoyo y todas las oportunidades que me han dado para cumplir con los objetivos que me he trazado, por todo el esfuerzo que han hecho para que nada me haga falta en la vida, por el gran ejemplo que son para mí, por el regalo de la vida y por todas las enseñanzas sobre ella. Gracias por el inmenso amor. Los amo.

A mis hermanos Pedro y Pablo, por ser siempre un motivo de alegría y diversión, por todo lo que hemos compartido y por el sentimiento de hermandad tan fuerte. Par de hermanos amados.

A mi hermano Octavio, por ser el más grande ejemplo de lucha, fuerza y perseverancia, por ser la persona más noble e inquebrantable y por todas las lecciones sobre cómo enfrentar cada reto en la vida que me ha enseñado. Te amo hermano.

A toda mi familia, por el esfuerzo y los sacrificios en conjunto para que pudiera terminar mi carrera y realizar este trabajo, por todo el apoyo durante mi vida y tanto aprendizaje de parte de cada uno y por tantas muestras de cariño. Los amo.

A mis amigos, Camacho y Andrea, por todo el apoyo brindado en cada momento, por la convivencia, la confianza y el cariño, porque sin ustedes, el rumbo de la carrera hubiera sido muy distinto. Los quiero mucho.

A todos mis grandes amigos, que hicieron del curso de mi carrera una etapa que recordaré alegremente durante mi vida, Quique, Loops, Sofy, Chava, Iris, Andrés, Sharon, Samantha, Lupita, Jaime, Lore, y todos los que por algún descuido no he mencionado, gracias por tantos momentos y tantas muestras de afecto, los tendré siempre presentes, los quiero.

A mis amigos de toda la vida, Abel, José Daniel, Emmanuel, Carlos, Carlos Fernando, Fernando, Daniela, Viviana, Giovanni, Lupita, Jennifer, Libertad, Lorena, Jesús, Roberto, y todos con quienes he compartido tantos agradables y enriquecedores momentos. Los quiero.

Al Dr. Juan Mosqueda por aceptar dirigir mi trabajo, por todo el apoyo durante la realización de su trabajo y por su amistad.

Al Dr. Alejandro García, por aceptar revisar y asesorar mi trabajo y por apoyarme durante el trabajo en su laboratorio.

Al M. en C. Mario Hidalgo, por su apoyo, tiempo y paciencia para asesorarme en la realización de los experimentos; así como por su amistad, confianza y por la convivencia.

A la Biól. Sandra Cruz por su enseñanza en el mundo de la herpetofauna, por su amistad y por su apoyo durante los manejos de los ejemplares.

Al Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro por las muestras de veneno. Al personal de la unidad por el apoyo para la obtención de estas y la manipulación de los ejemplares.

Al Herpetario Mundo Reptilia y al Biól. Óscar Rayas por las muestras de veneno, por el apoyo para la obtención de estas y la manipulación de los ejemplares.

A la señorita Lilia García Medina, por el apoyo y el cariño.

A las personas que, por diversas circunstancias, decidieron llevar rumbos diferentes al mío, pero que durante mi tiempo en la Universidad y, específicamente, la realización de este trabajo fueron siempre un motivo de inspiración y un soporte importante para seguir avanzando.

A todos los que, de alguna forma, hicieron posible la realización este trabajo, así como mi formación profesional, ya sea con su apoyo, sus atenciones, apoyo moral y comprensión, sin ustedes, esto no habría sido igual.

A todas las personas que me han contribuido a lo largo de mi vida a mi crecimiento personal, de todos he aprendido, agradezco el apoyo y las atenciones brindadas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Introducción

En la práctica clínica veterinaria de Fauna Silvestre, como es el caso de los reptiles, se cuenta con poca información sobre tratamientos que resuelvan los problemas infecciosos que padecen los pacientes, resultando, en muchas ocasiones, en muerte del ejemplar que resulta infectado. Esto, aunado al uso desmedido de antibióticos y la consecuente resistencia adquirida por las bacterias, lo cual complica, en gran medida, la efectividad de los métodos farmacológicos en contra de agentes infecciosos.

Existen diversas causas relacionadas con los microorganismos involucrados en este problema. Una gran cantidad de los estudios encauzados a antibioterapia, serología o prevalencia están realizados en *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es responsable de muchos casos de patologías en reptiles (Schildger et al., 1989), se encuentra presente en casos de estomatitis infecciosa y neumonía (Page, 1961; Buchanan, 1974), también es un agente frecuentemente identificado en septicemias (Martínez Silvestre, 1994), está asociada a dermatitis bacterianas (Hoppmann et al., 2007; Jacobson, 2007) y a afecciones oculares (Milichamp, 1991).

Los trabajos con venenos de serpientes se han enfocado en el potencial uso terapéutico de estos y, se ha caracterizado un efecto antimicrobiano en algunos de ellos, ya sea evaluando el veneno completo o algunos de sus componentes aislados (Stábeli et al., 2006; Rodrigues et al., 2004; Paramo et al., 1998). Ciertas moléculas contenidas en veneno han demostrado tener actividad bactericida, entre ellas la fosfolipasa A2, la L-aminoácido oxidasa, lectinas y péptidos antimicrobianos (Rodrigues et al., 2004; Paramo et al., 1998; Stiles et al., 1991; Perumal et al., 2007; Dos Santos Nunes et al. 2011; Wang et al., 2008; Nair et al., 2007; Banigan et al., 2010).

La cascabel queretana, o cascabel oscura de Querétaro, es una serpiente endémica del centro de México. Ampliamente distribuida en el estado de

Querétaro, se tiene registro de su presencia en al menos siete municipios. (Dixon et Lemos, 2010).

En el presente trabajo se evaluó el potencial antibacteriano, contra una cepa de *P. aeruginosa*, del veneno completo de *C. aquilus*, así como de las fracciones obtenidas mediante la técnica de FPLC. A baja concentración, tanto el veneno completo como las fracciones demostraron un efecto similar, sin embargo, al aumentar la concentración evaluada, el veneno completo y la fracción de bajo peso molecular demostraron ser más efectivas al actuar contra el crecimiento de la bacteria.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Revisión Bibliográfica

### Descripción de la especie

Taxonomía

*Reino Animalia,*

*Filo: Chortada,*

*Subfilo: Vertebrata,*

*Clase: Reptilia,*

*Orden: Squamata,*

*Suborden: Serpentes,*

*Familia: Viperidae,*

*Subfamilia: Crotalinae,*

*Género: Crotalus,*

*Especie: C. aquilus.*

*(Klauber, 1952).*

Nombre común: Cascabel Oscura de Querétaro.

### Descripción

Son organismos que regularmente no superan el medio metro de longitud de la cabeza a la cola, con una serie de parches dorsales que forman un patrón cuadrangular. El color es café grisáceo y tiene de 21 a 41 parches dorsales de tonalidad pardo-oscuro a lo largo del cuerpo, entre 3 y 8 bandas caudales y, por lo regular, una serie de manchas laterales se separa de las dorsales (Campbell y Lamar, 2004). Presenta, en par, manchas color café oscuro en la zona nucal, lateralmente en las regiones preocular y supraocular se observan franjas de color café oscuro con bordes en blanco que se extienden hasta la zona de las escamas supralabiales. La región ventral es de color crema y la zona caudal se complementa con anillos café oscuro (Ramírez-Bautista et al., 2000). En la cola se encuentran entre dos y diez bandas caudales (Campbell y Lamar, 2004). La mayoría de los individuos tienen 12 escamas supralabiales y 2 o

3, internasales, presentando entre 4 y 7 escamas en la zona internasal y prefrontal, además, hay una curvatura de la escama prenasal ventralmente a la postnasal. En la base del crótalo, se aprecian 10 escamas (Valencia, 2006).

La escama subocular anterior tiene contacto con las escamas supralabiales. Hay, de manera general, dos escamas preoculares, de las cuales la superior se observa con una división vertical. Las escamas loreales se presentan una cada lado en la cabeza. Se aprecian entre 11-13 escamas supralabiales, mientras que, hay generalmente 11 infralabiales. Hay un número variable de escamas ventrales, que se encuentra entre 142 a 164, asimismo, el total de escamas subcaudales varía de 17 a 30 (Valencia, 2006).

*Crotalus aquilus* promedia valores de 16 mm de ancho por 23 mm de largo en la cabeza. La longitud total del cuerpo puede variar en un rango de 192-716 mm, con un promedio de 389 mm. La longitud caudal se registra entre los 15-50 mm, siendo 32 mm la medida promedio (Valencia, 2006).

#### Hábitat y Distribución

*Crotalus aquilus* es endémica del país y según la NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentra sujeta a protección especial. Se distribuye desde el Lago de Chapala, Jalisco, extendiéndose hacia el sur a través de Michoacán, Guanajuato, Querétaro, sur de San Luis Potosí, y de ahí hacia el sureste a través de Hidalgo y el noroeste de Veracruz; siendo una serpiente endémica del centro de México. En el estado Querétaro está ampliamente distribuida y ocupa principalmente los municipios de Landa de Matamoros, Pinal de Amoles, Peñamiller, Tolimán, Cadereyta de Montes, Colón y Santiago de Querétaro (Dixon y Lemos, 2010). De manera general, se localiza en hábitats rocosos y áreas kársticas abiertas, también en bosques de pino-encino, bosques mesófilos y mezquitales (Campbell y Lamar, 2004; Valencia, 2006). Su intervalo altitudinal está entre 1600 hasta 3100 msnm.

#### Enfermedades en serpientes causadas por bacterias

Se han reportado afecciones bacterianas en casos de infecciones oculares en reptiles, manifestándose clínicamente mediante lesiones

piogranulomatosas y abscesos palpebrales. Además, se observan con afectaciones la conjuntiva y las zonas subconjuntival, retrobulbar, periorbital e intraocular, incluyendo el espacio interespecular (Milichamp et al., 1983; Bayón et al., 1999).

Los signos de la conjuntivitis son una secreción serosa o mucopurulenta en conjunto con una hiperemia de la zona de la conjuntiva, también se asocia a blefaritis, regularmente acompaña a procesos sistémicos bacterianos causados por especies de *Pseudomonas*, entre ellas *P. aeruginosa*. Algunas infecciones, como la observada en el espacio cornoespecular, son secundarias a estomatitis necrótica, lesiones perforantes del espéculo o debido a una diseminación vía hematógena en individuos con bacteremia, en estos casos se han aislado principalmente *Pseudomonas* y *Proteus* (Milichamp, 1991; Bayón et al., 1999).

La uveítis tiene una etiología que incluye agentes bacterianos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bennet, 1996). Los ejemplares con esta afectación manifiestan una gran variedad de signos clínicos, entre los principales se encuentran: blefarospasmo, fotofobia, miosis, enrojecimiento vascular de manera periférica al iris afectado, apariencia nublada de la córnea e iris, hipopión e hipema (Frye, 1991; Bayón et al., 1999).

Una enfermedad infecciosa de suma importancia es la estomatitis, la cual se localiza al inicio en la cavidad bucal, luego puede extenderse hacia otras estructuras, lo que resulta finalmente en septicemia, neumonía o gastroenteritis por ingestión. Los principales agentes etiológicos son bacterias, integrantes de la familia *Pseudomonaceae*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas liquefasciens*, las cuales presentan flagelos, no tienen cápsula ni esporos (Buchanan, 1974). *Pseudomonas aeruginosa* se ha aislado en la mayoría de los casos (Page, 1961). En los primeros estadios se aprecia en la mucosa oral una marcada congestión, hemorragias petequiales y una profusa salivación en los individuos. Posteriormente, las hemorragias petequiales se hacen equimóticas, el exudado se hace caseoso y es muy adherido

a la mucosa. En los crotálidos, el exudado se encuentra acumulado tanto en la vaina de los dientes inoculadores de veneno como en la cripta lingual.

En serpientes que padecen infecciones de la cavidad oral y neumonía, las bacterias aisladas de manera más frecuente en la necropsia son *Aeromonas* spp, principalmente *A. hydrophila* y *A. liquefasciens*; *Pseudomonas* spp, específicamente *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*; *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp (Evans, 1983; Hilf *et al.*, 1990; Glazebrook, 1993), *Citrobacter* spp, *Enterococcus* spp, *Salmonella* spp y *Corynebacterium* spp (Hilf, *et al.*, 1990; Jacobson, 2007).

Bacterias aerobias del tipo Gramnegativa, son las aisladas frecuentemente de cultivos de sangre de reptiles con septicemia, principalmente se trata de *Salmonella* spp, *Pseudomonas* spp, *Citrobacter* spp, *Aeromonas* spp, y *Micrococcus* spp (McCoy y Seidler, 1973; Hoppmann y Wilson-Barron, 2007; Murray, *et al.*, 2009; Martínez y Botero, 2011). Existen agentes bacterianos relacionados a enfermedades septicémicas y ocasionalmente locales, entre ellos, se pueden nombrar principalmente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* (Martínez Silvestre, 1994). Se han encontrado *Pseudomonas* spp y *Aeromonas* spp asociadas a enteritis acompañada con procesos septicémicos en reptiles.

La mayor parte de las dermatitis bacterianas diagnosticadas en reptiles se asocian a factores de manejo inadecuado como son humedad relativa alta, bajas temperaturas ambientales, nutrición deficiente, quemaduras y lesiones en la piel (Harvey-Clark, 1995; Hoppmann *et al.*, 2007; Martínez y Botero, 2011). Entre las bacterias más comunes usualmente se encuentran *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Aeromonas* spp, *Serratia* spp, *Providencia* spp, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp y *E. coli* (Hoppmann *et al.*, 2007; Jacobson, 2007; Martínez y Botero, 2011).

La celomitis (inflamación de la serosa celómica) es causada por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Escherichia* o *Salmonella*

(Frye, 1991). Cursa con acúmulo de material purulento en la cavidad celómica con variación en el color y densidad del líquido celómico (Martínez-Silvestre,2001).

En casos de hepatitis los principales agentes causales aislados son *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas* o *Corinebacterium* spp (Berschauer, 1998), Esta enfermedad se presenta de manera multifocal, con un patrón difuso o mediante un absceso interno (Martínez-Silvestre,2001).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria Gramnegativa, distribuida de forma considerable en la naturaleza, pertenece a la rama gama de las proteobacterias, de la misma forma que las enterobacterias (Costerton, 1980; Pace, 1997; Woese, 1997). En un principio se aisló en un cultivo de heridas cutáneas 1882 (Wilson et Dowling, 1998), es un bacilo es oxidasa positiva y es capaz de crecer a temperaturas de hasta 42 °C (Luján, 2014).

Es un patógeno oportunista, causante de diversas infecciones (Berthelot et al., 2005). Se cataloga como resistente a diferentes antibióticos (Strateva, 2009), debido mecanismos como la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, expresión de bombas de expulsión y producción de enzimas inactivadoras de antibióticos (Mesaros et al., 2007), puede mutar y desarrollar resistencia por otros mecanismos (Livermore, 2002; Luján, 2014).

### **Descripción y composición del veneno de las serpientes y de su efecto antimicrobiano.**

Las serpientes producen el veneno en las glándulas salivales modificadas, localizadas a cada lado del maxilar en la parte dorsal de la cavidad bucal. Los venenos son sustancias que contienen diversos componentes de valor biológico. Es una mezcla variable entre especies en cuanto a sus características representativas, se conforma por componentes proteicos y no proteicos con actividades biológicas específicas (Pal et al., 2002; Porto et al., 2007, en Torres et al., 2010). En cuanto a la composición proteica del veneno, destaca la presencia de proteasas, desintegrinas, neurotoxinas, nucleotidasas, fosfodiesterasas, cardiotoxinas, péptidos natriuréticos, L-aminoácido oxidadas, fosfolipasas y

lectinas, así como colagenasas, nucleasas, fosfatasas y citotoxinas (Pal et al., 2002; Porto et al., 2007; Bellairs, 1969; en Torres et al., 2010). Las enzimas del veneno provocan diversos efectos (neurotóxicos, cardiotóxicos, miotóxicos, hemolíticos, hemorrágicos, procoagulantes y coagulantes) en los organismos (Kini, 1997; Baley y Wilce, 2001, en Torres et al., 2010). En el veneno de las víboras se encuentran mayor cantidad de antígenos que en el de otros tipos de serpientes venenosas (Detrait y Saint Girons, 1979, en Pastrana et al., 2003). La actividad del veneno de la familia *Crotalinae* es tanto hemotóxica como citotóxica, tiene efecto sobre el sistema hemostático, por lo que provoca lesiones y hemorragias, también ocasiona cambios en la coagulación sanguínea (Maruñak, et al, 2005).

Con miras a determinar su capacidad terapéutica y su probable uso, en varios estudios algunos venenos de serpiente han demostrado un efecto antimicrobiano ya sea evaluando el veneno completo de las serpientes o sus componentes aislados. Varias toxinas del veneno muestran actividad antimicrobiana como la miotoxina MjTX-II del veneno de *Bothrops moojeni* (yarará caiyaca) contra *E. coli* y *Candida albicans* (Stábeli et al., 2006 ); y la BnpTx-1 (fosfolipasa A2) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (yarará) posee actividad contra *E. coli* y *S. aureus* (Rodrigues et al., 2004); también se reportó que las miotoxinas Lys49 y Asp 49 (fosfolipasas A2, miotoxinas II y III) del veneno de *Bothrops asper* (nauyaca real) tienen efecto bactericida contra *S. aureus*, *V. cholerae* y *E. coli*, principalmente (Paramo et al., 1998). El veneno completo y las enzimas L-aminoácido oxidasa (LAAO1 y LAAO2) de *Pseudechis australis* (serpiente Mulga o Rey Brown) son también conocidos por tener efectos contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Stiles et al., 1991).

El veneno del crotálido *C. adamanteus* mostró una potente actividad al inhibir el crecimiento de *B. pseudomallei*, mayor que las presentadas por los venenos de *Daboia russelli russelli* (víbora de Russel) y del elárido australiano, *Pseudechis australis* (Perumal et al., 2006). Los efectos antibacterianos de estos venenos se podrían deber a las citotoxinas (por acción lítica directa) y a las enzimas (Fosfolipasas A2) contenidas en ellos (Baylock, 2000; Perumal et al.,

2006). Los venenos de *C. adamanteus*, *Daboia russelli*, *P. australis*, *P. guttata* y *A. halys* tuvieron mejor efectividad contra dos cepas de *B. pseudomallei* que la mostrada por la enzima L- aminoácido oxidasa de los venenos de *C. adamanteus* y *B. atrox*, lo que indicó que la LAAO no es la única molécula que confiere actividad antibacteriana de estos venenos (Perumal et al., 2006). También se demostró que la Crotoxina B (fosfolipasa A2 neurotóxica) de *C. durissus terrificus* tuvo una fuerte actividad antibacteriana, lo mismo que la daboia toxina (PLA2 neurotóxica y miotóxica) de *Daboia russelli siamensis*. Por otra parte, la mulgatoxina (PLA2 miotóxica de *P. australis*) también exhibió una potente actividad antibacteriana al probarse contra dos cepas de *B. pseudomallei* (Perumal et al., 2006).

Una lectina de unión a galactosa aislada del veneno de *Bothrops leucurus* (cabeza de lanza cola blanca) evidenció un buen efecto antibacteriano contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis*, inhibiendo su crecimiento a concentraciones de 31.25, 62.35 y 125 µg/ml, respectivamente (Dos Santos Nunes et al. 2011).

El veneno total de *Bothrops leucurus* y su LAAO tuvieron un efecto antimicrobiano en *S. aureus*, se notó también actividad contra los parásitos *L. amazonensis*, *L. chagasi* y *T. cruzi* (Torres et al., 2010). Se sabe que los venenos de *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus durissus cascavella* han presentado actividad antiparasitaria contra especies de *Xantomonas* y contra *L. amazonensis* (Passero et al., 2007; Oliveira et al., 2002), mientras que, el veneno de *Bothrops jararaca* actuó de manera eficiente contra *Leishmania major*, *T. cruzi* y *S. aureus* (Ciscotto et al., 2009; Goncalves et al., 2002).

Las L- aminoácido oxidadas de los venenos de serpientes regularmente tienen actividad antimicrobiana contra varios organismos. Se caracterizó que las de *Crotalus adamanteus* (cascabel diamantino del este) y *Bothrops asper* tienen efecto contra *S. aureus* y *Proteus mirabilis* (Perumal et al., 2007). Esta enzima del veneno de *B. pirajai* impide el crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli* (Izidoro et al., 2006). También se ha observado potencial bactericida de las LAAO de *B.*

*alternatus* (yarará picuda o víbora de la cruz) (Stábeli et al., 2004, en Torres et al., 2010).

La LAAO de *B. jararacussu* presenta actividad contra *Leishmania sp.* (Franca et al., 2007) Tanto el veneno completo de *B. moojeni* como su LAAO son efectivos contra los promastigotes de *L. amazonensis*, *L. chagasi* y *L. panamensis*; ya que el peróxido de hidrógeno generado provoca la muerte celular por apoptosis, al producir estrés oxidativo lo que lleva a la alteración de membrana y el citoplasma (Stiles et al., 1991, en Torres et al., 2010).

### **Péptidos antimicrobianos, estructura y mecanismo de acción**

El sistema inmunitario innato utiliza una gran diversidad de moléculas efectoras contra los patógenos invasores, incluyendo péptidos antimicrobianos. Estas moléculas, como defensinas y catelicidinas, tienen tamaños comprendidos entre seis y 59 aminoácidos, y la mayoría son catiónicos (Kindt et al., 2007). Son la primera línea de defensa de la inmunidad innata contra microorganismos nocivos (Zasloff, 2002; Borgden, 2005). Estos péptidos se expresan principalmente en los sitios donde los microbios son encontrados con mayor frecuencia, por lo que células epiteliales de la piel y de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario sintetizan péptidos antimicrobianos (Tizard, 2009).

Diversos péptidos antimicrobianos se han encontrado en distintas clases de seres vivos, como son plantas y animales, e incluso, microorganismos. En los mamíferos, se han identificado varias familias de péptidos antimicrobianos, entre las que se incluyen catelicidinas, defensinas, histatinas y péptidos antimicrobianos expresados en hígado (LEAP) (Ganz, 2003; Zanetti, 2004; Lehrer, 2004; Kavanagh, 2004; Ganz, 2006, en Wang et al., 2008). Estas moléculas tienen actividad contra virus, bacterias, hongos y células tumorales (Hancock et Diamond, 2000).

#### **Mecanismos de acción**

Son varios los mecanismos de acción, que van desde las alteraciones de la membrana celular, actividad en blancos intracelulares, como ácidos nucleicos y

proteínas, hasta funciones de regulación de la respuesta inmune (Yang et al., 2004).

En primera instancia, estos péptidos de carácter catiónico interactúan con las membranas, con cargas negativas, de los microorganismos, esto causado por una atracción electrostática, este primer contacto se ve afectado en soluciones salinas concentradas. Posterior a esto, los péptidos forman poros que permeabilizan la membrana, culminando con la destrucción de las células (Boman, 1995; Ogata et al., 1992; Miakawa et al., 1996; en Rivas-Santiago et al., 2006).

Los péptidos antimicrobianos muestran especificidad hacia las membranas celulares bacterianas, debido a la gran cantidad de fosfolípidos aniónicos que conforman estas estructuras. Situación contraria en cuanto a los lípidos que se encuentran formando la superficie externa de las células animales y vegetales ya que no presentan una carga significativa, siendo los que revisten la cara citoplasmática de la membrana los que tienen cargas abundantes. Aunado a esto, las membranas eucariotas se estabilizan debido a la existencia de moléculas, como el colesterol, lo que las hace menos propensas a los efectos de los péptidos (Zasloff, 2002, en Rivas-Santiago et al., 2006).

Sus cargas positivas y su carácter anfipático permiten su inserción en las membranas plasmáticas de los microorganismos, y los mecanismos de acción que se proponen son diversos. Se sabe que tienen efecto sobre la permeabilidad de la membrana, aunque se describen otros blancos celulares (Jenssen et al., 2006, en Téllez y Castaño., 2010).

#### Interacciones de los péptidos antimicrobianos con la membrana plasmática

El primer contacto de los péptidos antimicrobianos con los microorganismos, como las bacterias, es debido a la afinidad electrostática hacia los componentes de carga negativa de sus paredes celulares. Ejemplos de estos compuestos aniónicos son el ácido teicoico y el lipopolisacárido, en Gram positivas y negativas respectivamente. Posterior a esta atracción, los péptidos

antimicrobianos desestabilizan la membrana externa, alteran su forma y provocan daños en su estructura (Téllez y Castaño, 2010).

Modelo de barril. Consiste en la formación de un poro mediante las regiones polares de los péptidos, los cuales se acoplan de manera perpendicular a la membrana, con la que tiene contacto por medio de sus regiones hidrofóbicas. Como resultado de esto, se afecta la función de osmorregulación de la membrana (Téllez y Castaño, 2010).

Modelo formación anular. Los péptidos, en contacto con la membrana, inducen la formación de un canal conformado también por fosfolípidos, esto debido a un doblez causado por la interacción entre el péptido y la cabeza de los fosfolípidos (Yang et al., 2001; Téllez y Castaño, 2010).

Modelo de alfombra. Los péptidos forman una capa sobre la superficie membranal, la cual colapsa posteriormente sin que los péptidos se hayan incrustado a través de ella. Este mecanismo, caracterizado por formación micelar, es llevado a cabo por el latarcin Ltc2a, un péptido que se deriva del veneno de *Lachesana tarabaevi* (LinksDubovskii et al., 2008, en Téllez y Castaño; 2010).

Modelo de agregado. Este mecanismo se asemeja a la acción de los detergentes, consiste en la unión del péptido a la membrana con la posterior formación de agregados micelares compuestos de fosfolípidos y péptidos. La célula muere por pérdida de iones y contenido citoplasmático, además, los péptidos pueden internalizarse y actuar sobre otras moléculas blanco (Téllez y Castaño, 2010).

El buforin II, encontrado en *Bufo gargarizans*, no actúa desestabilizando la membrana, sino que se une al ADN mediante las histonas (Park et al., 1998). Tanto la indolicina como el microcín J25, permeabilizan la membrana y pueden interactuar con el ADN o con enzimas como la topoisomerasa y polimerasa (Marchand et al., 2006, en Téllez y Castaño, 2010).

Algunos péptidos, PR-39 de cerdos y la  $\beta$ -defensina humana, interrumpen la síntesis de proteínas alterando a las enzimas involucradas en este proceso (Téllez y Castaño, 2010).

Otros péptidos inhiben la función de las proteínas chaperonas, las cuales son importantes en el plegamiento de otras proteínas. Tal efecto se conoce en los péptidos pirrocoricin y el drosocin (Kragol et al., 2001; Otvos et al., 2000, en Téllez y Castaño, 2010).

Una bacteriocina, llamada nisín, se une al precursor de peptidoglucano, inhibiendo su formación (Téllez y Castaño, 2010). El microcin j25, provoca la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), al ejercer su acción en la cadena respiratoria (Bellomio et al., 2007, en Téllez y Castaño, 2010).

#### Funciones inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos

Se conoce que los péptidos antimicrobianos pueden actuar como moduladores del sistema inmune, llevando a cabo funciones como la estimulación para producción de citocinas, acción como factores quimiotácticos, también favorecen la diferenciación celular y la angiogénesis (Oppenheim et Yang, 2005; Bowdish et al., 2005, en Téllez y Castaño, 2010).

La LL-37, catelicidina encontrada en humanos, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y óxido nítrico (NO) al unirse al LPS. También tiene efecto quimiotáctico sobre células blancas, como linfocitos T, monocitos y neutrófilos (Steinbässer et al., 2008, en Téllez y Castaño, 2010).

Existen fragmentos de péptidos capaces de regular el proceso de cicatrización promoviendo la producción de citocinas que estimulan a los queratinocitos y propician llegada de leucocitos a las zonas lesionadas (Lee et al., 2004). Otros favorecen la producción de moléculas que colaboran en el proceso de cicatrización, como los proteoglicanos, además pueden afectar la actividad de enzimas oxidativas en los neutrófilos (Shi et al., 1996; Gallo et al., 1994, en Téllez y Castaño, 2010).

Aunque son evidentes las funciones proinflamatorias de los péptidos, se conoce que algunos impiden la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , anulan las respuestas a estímulos en receptores tipo Toll y evitan la presentación de choque séptico (Bowdish et al., 2005, en Téllez y Castaño, 2010).

### Estructura de $\beta$ -defensinas

El grupo de las defensinas está compuesto por péptidos catiónicos, contienen un gran número de argininas, y su peso molecular ronda los 4.5 kDa debido a que se conforman por entre 20 y 45 aminoácidos. Una de sus principales características es la presencia de tres puentes disulfuro, resultado de la unión de seis cisteínas (Boman, 1995, en Rivas-Santiago et al., 2006). Se componen tanto por láminas  $\beta$ , de manera principal, como por hélices  $\alpha$ , en menor medida. Hay tres tipos principales, denominados por las letras griegas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ ; cada una se determina por la posición de los puentes disulfuro formado por sus respectivas cisteínas (Ganz et al., 1985; Ethan et al., 1997, en Rivas-Santiago et al., 2006).

Las  $\beta$ -defensinas, tienen sus enlaces disulfuro en las posiciones 1-5, 2-4 y 3-6, se componen de entre 36 a 42 aminoácidos. Se conoce una gran cantidad de miembros de este grupo, de los cuales la mayoría se encuentran en mamíferos, mientras que un poco más de una decena se han encontrado en marsupiales y reptiles (Zasloff, 2002). Ejercen su efecto antimicrobiano a dosis bajas ( $<10 \mu\text{g/ml}$ ), aunque también tienen un fuerte potencial citotóxico (Ganz et al., 1985, en Rivas-Santiago et al., 2006).

El espectro de las defensinas es muy amplio, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica (Starner et al., 2005). Aunque la presentación de resistencia a estos componentes es bastante rara, se conocen ciertos mecanismos en bacterias que les permiten evitar ser blanco de la acción de los péptidos, esto incluye ciertos cambios en las estructuras encontradas en su superficie externa, como el lipopolisacárido y el ácido teicoico (Rivas-Santiago et al., 2006).

Además del efecto directo sobre las bacterias, las defensinas tienen diversas funciones que influyen sobre la respuesta inflamatoria y el proceso de

cicatrización, también actúan regulando la respuesta inmune (Zasloff, 2002, en Rivas-Santiago et al., 2006).

Este tipo de péptidos presentan actividad quimiotáctica para diversas células del sistema inmune, como son los mastocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos B y células dendríticas. Asimismo, se sabe que activan macrófagos y células epiteliales (Zasloff, 2002; Durr y Peschel, 2002, en Rivas-Santiago et al., 2006).

### Catelicidinas

Son péptidos que presentan diferentes funciones con una gran importancia para la respuesta inmune. Tienen un elevado potencial antimicrobiano actuando directamente sobre la membrana de los microorganismos para formar poros que culminen con la lisis celular, además pueden interactuar con el DNA, uniéndose a los grupos fosfato mediante atracciones electrostáticas, insertándose en la cadena de polinucleótidos, lo que impide la actividad de la maquinaria de replicación (Chun-Hua et al., 2005, en Rivas-Santiago et al., 2006).

### **Péptidos antimicrobianos encontrados en serpientes**

Una gran cantidad de péptidos antimicrobianos han sido identificados en plantas, animales y microorganismos (Kindt et al., 2007).

Un péptido antimicrobiano tipo catelicidina, denominado catelicidina BF, fue purificado a partir de veneno de la serpiente asiática, *Bungarus fasciatus*, y se probó su acción contra *E. coli*, *Bacillus* sp., *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus terreus* y *Chaetomium globosum* (Wang et al., 2008).

La catelicidina BF (3.63kDa), aislada por fraccionamiento cromatográfico, está conformada por 30 residuos de aminoácidos, entre los que destacan 2 argininas y 9 lisinas, 5 fenilalaninas y un residuo ácido (glutamato). Este péptido se expresa en estómago, tráquea, piel, músculo, corazón, riñón, pulmón, cerebro, intestino, bazo, hígado, ovario y glándula de veneno.

El precursor de la catelicidina BF se conforma por 191 aminoácidos y consta de un dominio catelino conservado, el péptido señal y la catelicidina

madura. El procesamiento hacia el péptido maduro tiene lugar sobre un sitio de escisión por elastasa en las catelicidinas de cerdos, bovinos y aves; este sitio también fue encontrado en el precursor de catelicidina BF (valina 157), lo que sugiere que es procesado por proteasas tipo elastasas (Wang et al., 2008).

La catelicidina de *Ophiophagus hannah* (Cobra real) demostró una enorme actividad inhibidora sobre el crecimiento bacteriano, inclusive contra cepas catalogadas como farmacorresistentes (Zhao et al., 2008; Li et al., 2012; Zhang et al., 2010, en van Hoek, 2014).

Los péptidos derivados de una catelicidina aislada de *Naja atra* (Cobra China) mostraron tener actividad en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, entre las que se encontraban *E. coli* K12, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (De Latour et al., 2010), *P. aeruginosa* (Dean et al., 2011) y *Francisella novicida* (Amer et al., 2010); y *S. aureus* (Dean et al., 2011, en van Hoek, 2014).

Péptidos similares a  $\beta$ - defensinas han sido identificados en venenos de distintos organismos, tales como ornitorrincos, serpientes, anemonas y lagartijas (Torres et Kuchel, 2004; Fry et al., 2005, en Correa y Oguiura, 2013).

Una familia de péptidos similares a las defensinas es la de las toxinas tipo crotamina, que se han caracterizado a partir del veneno de víbora de cascabel. Se considera que tiene la propiedad de internalizarse en las células (Radis-Baptista y Kerkis, 2011), además, es uno de los cuatro principales componentes del veneno de *C. durissus* (Fadel et al., 2005). Ha mostrado un plegamiento que asemeja a la estructura de la  $\beta$ -defensina, así como 3 puentes disulfuro, que se encuentran también en las defensinas, sin embargo, llevan a cabo distintas funciones y presentan notorias diferencias en su secuencia de aminoácidos (Fadel et al., 2005, en Correa y Oguiura, 2013). La crotamina ha mostrado tener actividad antifúngica (*Candida* spp., *Trichosporon* spp. y *Cryptococcus neoformans*) y antibacteriana (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) (Oguiura et al., 2011; Yamane et al., 2012, en Correa y Oguiura, 2013), y se ha demostrado que permeabiliza *Staphylococcus*

*aureus* (Yount et al., 2009). Este péptido está formado por nueve lisinas, lo que le confiere un carácter catiónico (van Hoek, 2014).

Otro péptido antimicrobiano encontrado en serpientes es la omwaprina, perteneciente a una familia de proteínas denominadas waprinas. Este péptido fue identificado en *Oxyuranus microlepidotus* (taipán australiana) y tuvo actividad contra bacterias gram positivas (Nair et al., 2007; Banigan et al., 2010). Debido a sus características, se considera un fuerte candidato para terapias antimicrobianas (van Hoek, 2014).

Un péptido, con actividad antifúngica, con un peso de 1.37 kDa fue aislado a partir del veneno de *Bothrops jararaca*, sin embargo, la secuencia de esta molécula no fue determinada (Gomes et al., 2005, en van Hoek, 2014).

El péptido vgf-1, derivado del veneno de *N. atra* (cobra china), mostró un buen efecto antimicrobiano contra cepas resistentes de *M. tuberculosis* (Xie et al., 2003).

### Técnica de FPLC

La cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés) consiste en una bomba que se controla mediante computadora y está acoplada con una columna de separación (Guttman, 2009). Esta técnica cromatográfica maneja una presión media (de aproximadamente 3,500 psi o 24 MPa) utilizando una bomba que determina la velocidad a la cual una fase móvil (solvente y muestra a fraccionar) atraviesa una columna que contiene una resina (fase estacionaria) (BioRad, s.f.), esto tiene una buena resolución debido al diámetro reducido de las fases estacionarias. Características como su alta capacidad de carga, su compatibilidad con sistemas buffer acuosos, uso de tasas de flujo rápidas y la diversidad de las fases estacionarias (afinidad, intercambio iónico, fase reversa y filtración en gel). El sistema se conforma por inyectores automáticos, el gradiente es controlado mediante programas computacionales y permite la identificación y recolección de picos (Madadlou et al., 2011). Con el uso de esta técnica, se pueden separar mezclas de proteínas y caracterizar proteínas puras (Guttman, 2009).

Un equipo de FPLC se compone también de un detector UV, un sistema medidor de conductividad, además de un colector de fracciones. Las muestras se inyectan en un “loop” o usando una bomba. Los detectores de longitud de onda (280 nm) se utilizan para monitorizar la elución de las fracciones. Las fracciones se muestran en forma de picos, y se colectan en tubos de un volumen establecido antes del fraccionamiento y los cuales contendrán proteínas de tamaño similar en cada una de las fracciones (BioRad, s.f.).

Dirección General de Bibliotecas UAG

## **Hipótesis**

El veneno de la serpiente *C. aquilus* tiene actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Objetivo General:**

Caracterizar la actividad antimicrobiana del veneno de la serpiente *Crotalus aquilus* contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Objetivos específicos:**

- 1.- Obtener veneno de *Crotalus aquilus*.
- 2.- Fraccionar el veneno de *C. aquilus*.
- 3.- Cuantificar el crecimiento de unidades formadoras de colonias expuestas al veneno y sus fracciones.

## **Justificación**

El aumento de cepas de bacterias patógenas resistentes a antibióticos requiere de nuevos tratamientos en reptiles. Los venenos de las serpientes tienen actividad antimicrobiana. En Querétaro existe la serpiente *C. aquilus* que es una especie endémica de México poco estudiada. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno que causa enfermedades en serpientes en cautiverio. Es necesario investigar si el veneno de *C. aquilus* tiene actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*.

## Metodología

### Obtención de muestras

Todos los protocolos de este trabajo fueron evaluados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, aprobados con el número 12FCN2105 el día 19 de marzo de 2015. Las muestras se obtuvieron del veneno de víbora de cascabel queretana (*C. aquilus*). Los ejemplares son mantenidos en cautiverio en: la UMA Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro (clave INE/CITES/DGVS-CR-IN-0619-QRO/00), en el Campus Juriquilla de la UAQ. También se utilizó un ejemplar de la UMA Herpetario Mundo Reptilia con registro SEMARNAT-UMA-IN-00048-QRO, en la delegación Santa Rosa Jaúregui, Querétaro. Todos los protocolos de manejo indicados en este apartado se hicieron siguiendo lo indicado por Higuera en 2005. Para la extracción del veneno se tuvieron las siguientes consideraciones en cuanto a equipo de manejo y protección:

El equipo de manejo y protección fue seleccionado basándose en las necesidades de los manejadores (Fanti, 1990, en Higuera, 2005). Se enlista el equipo mínimo indispensable para la contención física y manejo básico de serpientes (Higuera, 2005):

- Juego de ganchos herpetológicos de diferentes tamaños.
- Botes de plástico grandes con tapa de seguridad, estos deben contar con orificios para permitir entrada y salida de aire para la respiración del ejemplar, se pueden adaptar un par de cordones a la tapa para facilitar su manipulación.
- Mesa de trabajo con superficie lisa.
- Equipo de primeros auxilios.
- Faboterapéutico específico.
- Manual de primeros auxilios.

Es indispensable contar con ambulancia y paramédicos en las instalaciones al momento de llevar a cabo las extracciones.

Los ejemplares son mantenidos a una temperatura entre 28-32°C, son hidratados y asoleados una vez por semana, cuentan con agua en su terrario, y son alimentados 1 vez cada 15-21 días con ratones equivalentes al 20% de su peso corporal.

Las tomas de veneno se realizaron los días 7, 14 o 15 después de haber recibido alimento o de haber extraído veneno (día 1), con el fin de tener una buena cantidad de veneno y que éste tenga una buena concentración de sólidos.

Todas las serpientes fueron manejadas exclusivamente por manejadores experimentados.

El protocolo al momento de la manipulación de los ejemplares y la extracción de muestras de veneno se realizó de la siguiente manera, basándose en lo expuesto por Higuera en 2005:

Para realizar la manipulación se utilizaron tanto ganchos medianos como chicos, procurando a que el gancho no fuera demasiado corto para que el organismo pudiera acercarse a la mano con la que se sujetaba el gancho. Para facilitar la permanencia del ejemplar sobre el gancho, tiene que sostenerse entre sus primer y segundo tercios corporales (Higuera, 2005).

El manejo con gancho herpetológico se realizó al extraer al ejemplar de su terrario y colocarlo dentro del contenedor de plástico, así como para sacarlo del contenedor de plástico y situarlo en el suelo o en mesa de trabajo (para la sujeción por la cabeza).

Para sacar del terrario se requirió de la participación de al menos tres manipuladores, dos en la parte trasera del terrario para sacar y contener al ejemplar, y uno en la parte frontal del terrario que daba aviso de la posición de los ejemplares dentro del mismo y mantuvo al tanto de los movimientos de estos a los manipuladores que se encontraban sacando a los ejemplares. Una vez afuera el

ejemplar se colocó en el contenedor y se puso la tapa de manera que este no pudiera morder al manipulador. El terrario se aseguró con candado después de cada manipulación.

El manejo de sujeción de cabeza se realizó en una mesa de trabajo, despejada, plana y sin superficies que pudieran entorpecer el manejo o dañar al ejemplar.

El manejador más experimentado fue quien sujetó la cabeza, para esto se utilizó el mango o la base del gancho herpetológico, sobre la nuca de la serpiente, ejerciendo una ligera presión para no dañar al animal, pero suficiente para contenerlo.

Rápidamente, los dedos medio y pulgar se introdujeron en la parte caudal de la cabeza (en la unión entre los huesos cuadrado, articular y pterigodes) y las primeras vértebras cervicales (Higuera, 2005). El dedo índice se colocó en la parte dorsal del cráneo de la serpiente (Higuera, 2005), posteriormente, se apartó el gancho colocado inicialmente.

Una vez que el manejador encargado de asegurar la cabeza indicó que se podía proseguir con el protocolo, un manejador más intervino para apoyar sujetando el cuello, cuerpo y cola del ejemplar. La articulación atlanto-occipital en las serpientes es una región anatómica muy delicada, por lo que el cuerpo debió a la misma altura de la cabeza, esto para evitar la presentación de lesiones, así como la falta de irrigación o aumento de la presión sanguínea de la cabeza (Higuera, 2005).

Para la colección del veneno, e cubrió un vaso de precipitado con plástico film. Al momento de la extracción se tomó el vaso de la base, siendo la parte más distal a la boca del ejemplar. Se hizo a la serpiente morder el plástico film mientras se estimulaba la glándula de veneno mediante palpación digital.

Una vez que la serpiente inyectó el veneno en el vaso, se procedió a su liberación, se colocó a la serpiente sobre una superficie plana, despejada y segura

para los manejadores. El primero en soltar y alejarse fue el manejador que sostenía el cuerpo, manteniendo constante comunicación con quien sostuvo la cabeza, posteriormente soltó quien sostuvo la cabeza.

El ejemplar fue asegurado nuevamente en contenedores de plástico y regresado a su terrario una vez que finalizó el manejo.

El veneno obtenido de cada ejemplar se colocó en tubos de 1.5 ml y se transportó en hielera al lugar de su almacenamiento manteniéndose a -78°C hasta su uso.

Fechas de toma de muestras

Herpetario de la UAQ

27 de abril y 15 de junio de 2015.

Herpetario Mundo Reptilia

19 de marzo, 7, 14 y 21 de mayo de 2015.

Las muestras extraídas en ambos lugares se almacenaron a -78°C para su conservación.

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína y el fraccionamiento por FPLC se realizaron en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UAQ. Una vez que se completó el calendario de extracciones se juntó el total de veneno y se liofilizó. El liofilizado se reconstituyó en un volumen de 4 ml de agua destilada, que fue suficiente para disolver la cantidad de liofilizado, esto para poder manejar un volumen de solvente que facilitara la realización del experimento.

Después de redisolver las proteínas, estas se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo de la siguiente manera:

- Se preparó la curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) usando las concentraciones de 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12 y 16 mg/ml.

- Todas las concentraciones se ajustaron a un volumen de 800  $\mu$ l con agua destilada; en otros tubos se colocaron 5  $\mu$ l de muestra de veneno y 795  $\mu$ l de agua, todo esto se hizo por triplicado.

- A cada muestra se agregaron 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford y se dejó reposar 15 minutos.

- En una microplaca se colocaron 200  $\mu$ l de cada muestra y se leyó a 590 nm en un lector espectrofotométrico de placas (Benchmark Plus, BioRad). Se interpolaron los valores de las muestras mediante un ajuste lineal del estándar recta utilizando el programa GraphPadPrism 5.

Se separó una alícuota de 1ml de veneno para utilizarse en las pruebas de actividad antimicrobiana.

#### Fraccionamiento del veneno mediante FPLC

El veneno se fraccionó utilizando un equipo cromatográfico de FPLC (AKTApurifier, GE), siguiendo el protocolo como se indica a continuación:

-Se preparó una solución de ácido acético 1.6mM para usarse como fase móvil en el fraccionamiento. Así mismo, se utilizó en la preparación del gel Sephadex G-50, ese gel se dejó reposar toda la noche a 4°C.

-Se colocó el gel en una columna (1 x 48 cm), utilizándose como fase estacionaria.

-Se purgaron las mangueras del equipo con solución de ácido acético 1.6mM para retirar exceso de etanol.

-Se inyectó ácido acético (fase móvil) por 30 minutos.

-Se cargó la muestra en el loop de carga (1605  $\mu$ g/500  $\mu$ l), se inyectó y se eluyó a una tasa de flujo de 1 ml/min.

-Las lecturas se realizaron a 280 nm; se colocaron los tubos en la rueda colectora y se recolectó en cada uno un volumen de 5 ml.

Una vez fraccionadas las muestras, se liofilizaron y se guardaron a -78°C, hasta su uso.

Las fracciones liofilizadas fueron reconstituidas en volúmenes variables de agua destilada, de acuerdo con la cantidad de polvo que se observaba, y se determinó su concentración de proteína por el método de Bradford.

Con agua destilada, se prepararon el veneno completo y las fracciones individuales para obtener concentraciones de 2 µg/ml y 30 µg/ml (modificado de Wang et al., 2008). Una vez hecho esto, cada muestra se esterilizó pasándola por un filtro Millipore de 0.22 µm. Todas las muestras se mantuvieron en congelación a -78°C hasta su uso.

#### Análisis de la actividad antimicrobiana

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del veneno completo y las fracciones se utilizó una cepa patógena de *Pseudomonas aeruginosa* obtenida del Laboratorio de Diagnóstico Clínico Animal de Calamanda, Querétaro. La evaluación de actividad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas localizado en el Campus Aeropuerto de la UAQ.

Se tomó la mitad de una UFC, se diluyó en 100 µl de medio SOC, y se dejó incubar a 37°C en agitación por 30 minutos. Se evaluó el crecimiento en UFC a diferentes diluciones en agua destilada: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160. Posteriormente 100 µl de bacterias en suspensión de cada dilución se sembraron en placas de agar MacConkey y se dejaron incubando 13hrs a 37°C. De acuerdo a los resultados del análisis de crecimiento bacteriano en cada dilución se determinó que la dilución 1/160 fue la adecuada para facilitar el conteo de UFC.

Se prepararon alícuotas de 225 µl tanto del veneno como de cada de las fracciones a las concentraciones anteriormente descritas y otras con 225 µl de agua destilada. Se seleccionó la otra mitad de la UFC con la que se hicieron los experimentos anteriores, se repitió el protocolo para incubación en agitación y se tomaron 50 µl para hacer una dilución 1/150, de esta dilución 1/150 se tomaron 25 µl que se agregaron a las alícuotas de las fracciones (dilución final 1/160), una vez

mezcladas por pipeteo se sembraron 100  $\mu$ l en las placas de agar MacConkey. Las placas se sembraron por triplicado, con las siguientes denominaciones: Control (placas en las que se omitió el uso de veneno o de sus fracciones), VC (veneno completo) 2  $\mu$ g/ml, F1 (fracción 1) 2  $\mu$ g/ml, F2 (fracción 2) 2  $\mu$ g/ml, F3 (fracción 3) 2  $\mu$ g/ml, VC 30  $\mu$ g/ml F1 30  $\mu$ g/ml, F2 30  $\mu$ g/ml y F3 30  $\mu$ g/ml. Se incubaron 13hrs a 37°C y se contaron las UFC en un contador de colonias.

Los resultados se analizaron estadísticamente por el programa Minitab 16 (Minitab Inc), se obtuvieron valores de media aritmética y desviación estándar; se realizó una prueba ANOVA con método Tukey con 95% de intervalo de confianza.

## Resultados

Se extrajo veneno de 3 ejemplares de *C. aquilus* del Herpetario de la UAQ, siendo todos ejemplares machos, adultos con las siguientes características: ejemplar 1, 72 cm longitud total, peso de 520 g; ejemplar 2, 83 cm de longitud total, peso de 660 g; ejemplar 3, 83 cm longitud total, peso de 595 g, obteniendo un volumen total (al juntar las extracciones de los tres ejemplares) en la primer extracción de 0.8 ml y de 0.6 ml en la segunda extracción. El ejemplar del Herpetario Mundo Reptilia era un ejemplar cría de 30 cm de longitud total, se obtuvieron en las extracciones 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l y 30  $\mu$ l, respectivamente.

Tras los ensayos en las pruebas de crecimiento bacteriano, los resultados en las diluciones 1/10, 1/20 y 1/40 fueron incontables, habiendo una gran masa de bacterias en la mayor parte de la placa, mientras que a 1/80 hubo crecimientos bacterianos en UFC, sin embargo, en algunas zonas de la placa se presentaba una masa que dificultaba el conteo. La dilución 1/160 presentó un crecimiento de 218 UFC.

Mediante el fraccionamiento del veneno por FPLC se obtuvieron tres picos conteniendo cada una de las fracciones y que fueron denominados F1, F2 y F3, mismos que se colectaron de acuerdo con cómo se observa en la Figura 1.

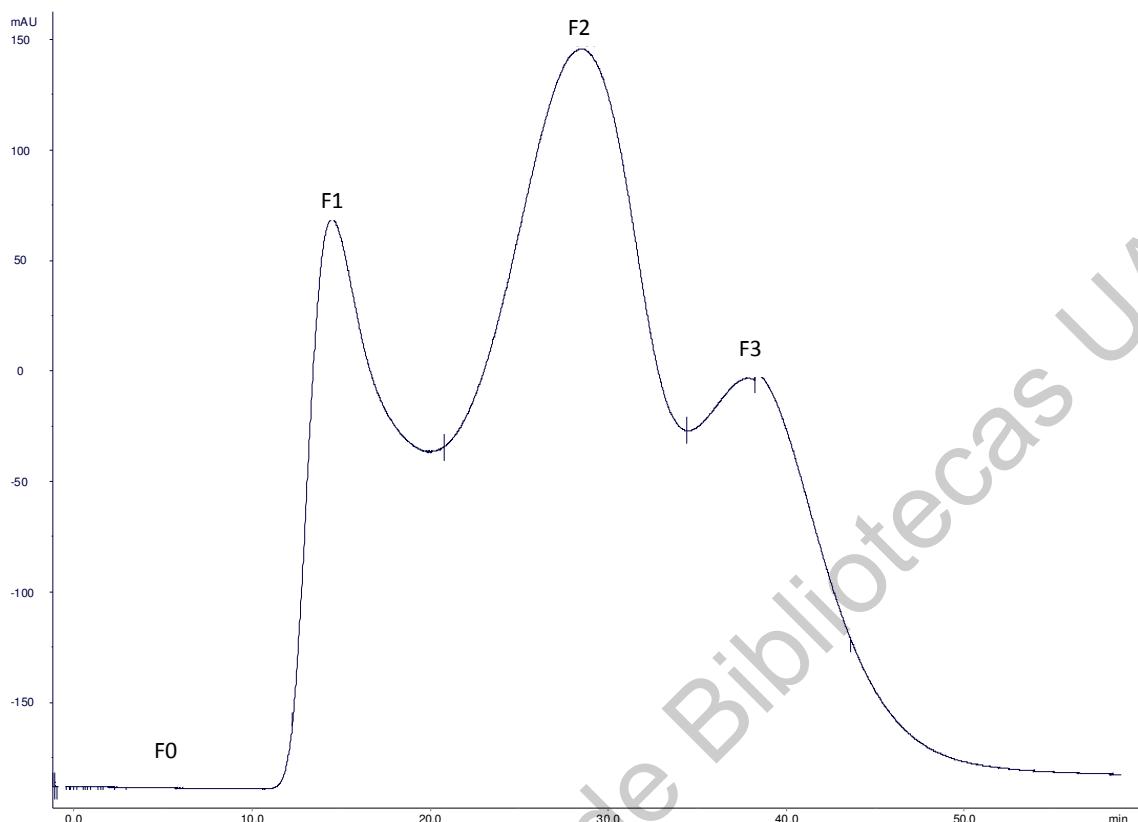


Figura 1. Cromatografía de filtración en gel sobre Sephadex G-50 del veneno de *Crotalus aquilus*, se observan los tres picos de fracciones recolectados.

Las fracciones obtenidas y el veneno completo se secaron por liofilización y se determinaron las concentraciones de proteína, las cuales fueron la siguientes: veneno completo, 3.21  $\mu$ g/ $\mu$ l; F1, 2.0642  $\mu$ g/ $\mu$ l; F2, 3.0566  $\mu$ g/ $\mu$ l; F3, 0.81  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Tanto las fracciones como el veneno completo mostraron tener propiedades antimicrobianas al registrar un número de crecimientos estadísticamente distintos que los que mostró el grupo control. A concentración de 2  $\mu$ g/ml (Figuras 2-6) se obtienen cantidades de UFC similares en las placas con veneno y cada una de las fracciones (Tabla 1), mientras que a concentración de 30  $\mu$ g/ml (Figuras 7-10) el veneno presenta una mayor actividad bactericida, aproximadamente el doble que presentó a la concentración anteriormente evaluada; así mismo, la F3 presentó un aumento en su actividad bactericida en comparación con la prueba a menor concentración, mientras que las F1 y F2

tuvieron resultados similares en ambas concentraciones ( $P < 0.05$ ) (Tabla 2). Los resultados del análisis ANOVA se muestran en las figuras 11 y 12.

**Tabla 1.** Resultados de los conteos UFC a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	VC	F1	F2	F3
1	244	109	105	96	90
2	238	101	99	102	84
3	247	106	102	104	97
Media	243	105.33	102	100.67	90.33
DE	4.58	4.04	3	4.16	6.51
% Crecimiento	100	43.34	41.97	41.42	37.17

**Tabla 2.** Resultados de los conteos UFC a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	VC	F1	F2	F3
1	244	50	96	114	70
2	238	48	109	110	74
3	247	44	104	113	63
Media	243	47.33	103	112.33	69
DE	4.58	3.06	6.56	2.08	5.57
% Crecimiento	100	19.47	42.38	46.22	28.39

Se muestran las cantidades en cada una de las placas, así como la media, la desviación estándar y el porcentaje de crecimiento promedio. VC= Veneno Completo, F1= Fracción 1, F2= Fracción 2, F3= Fracción 3, DE= Desviación Estándar.

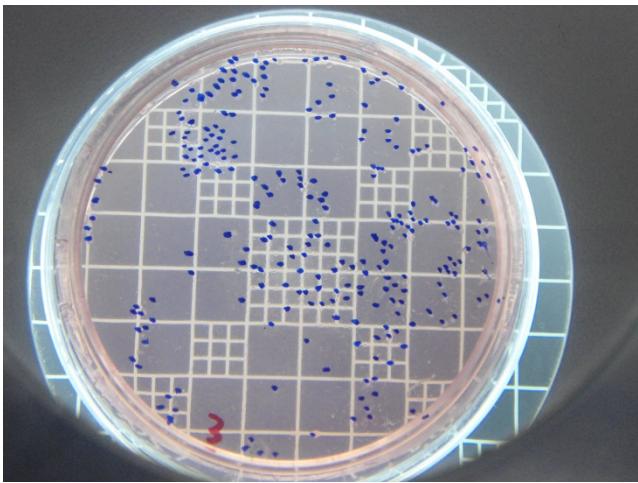


Figura 2. Placa crecimiento control.

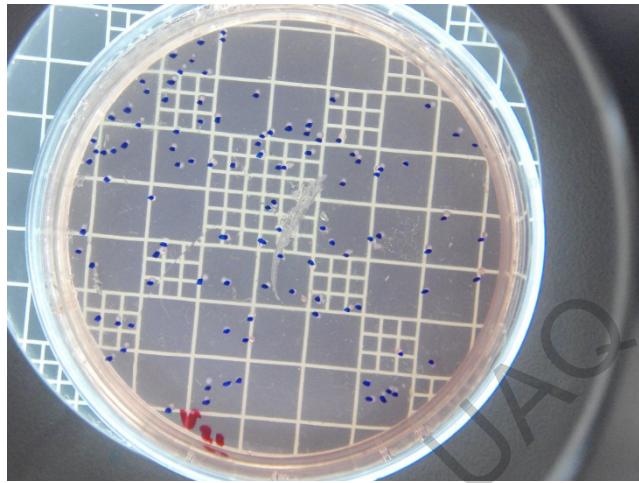


Figura 3. Placa crecimiento c/Veneno 2 ug/ml.

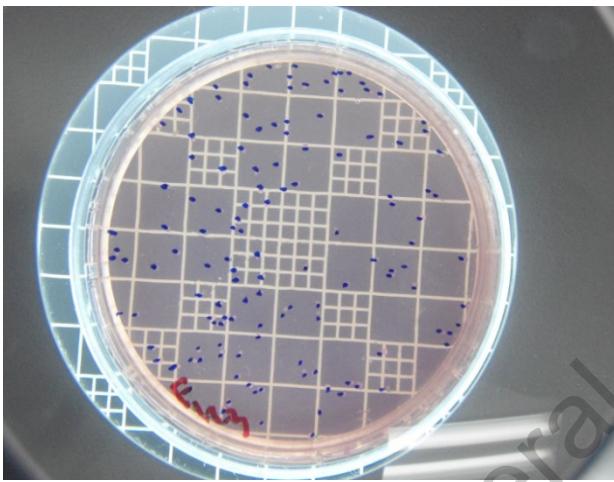


Figura 4. Placa crecimiento c/F1 2 ug/ml.

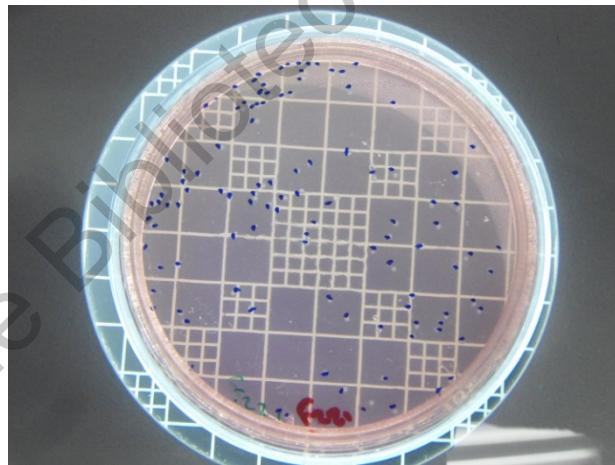


Figura 5. Placa crecimiento c/F2 2 ul/ml.

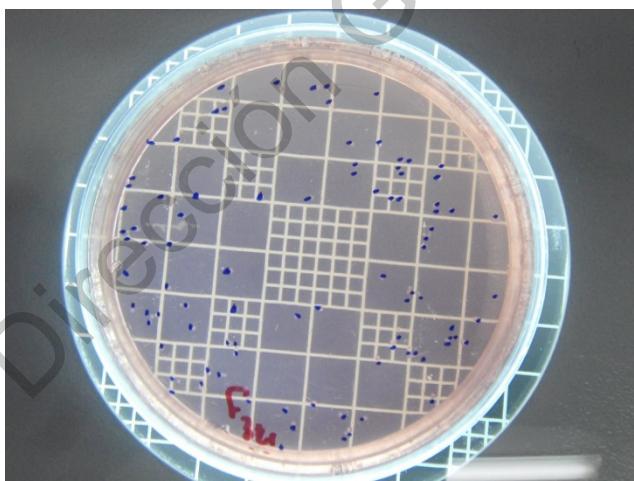


Figura 6. Placa crecimiento c/F3 2 ug/ml.

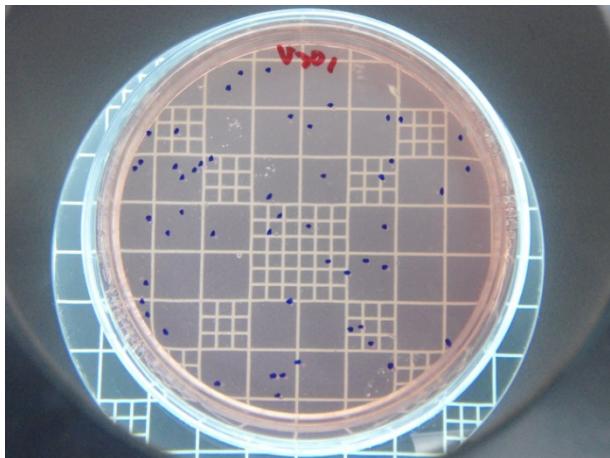


Figura 7. Placa crecimiento c/Veneno 30 µg/ml.

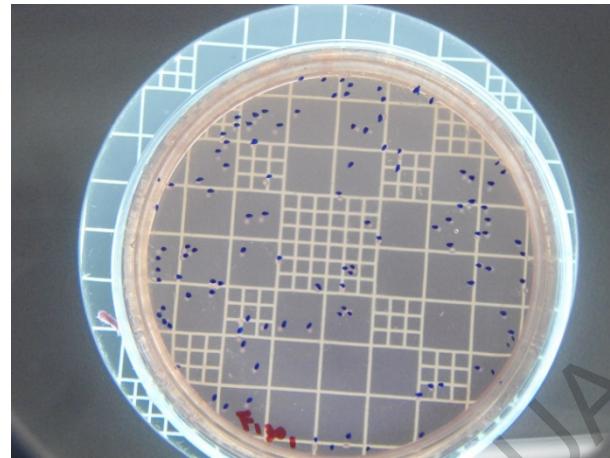


Figura 8. Placa crecimiento c/F1 30 µg/ml.

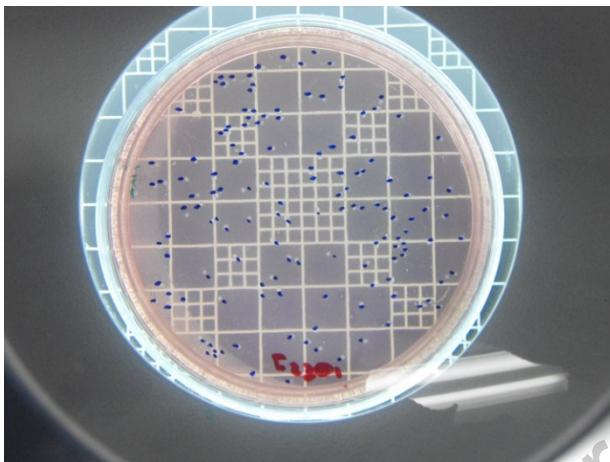


Figura 9. Placa crecimiento c/F2 30 µg/ml.

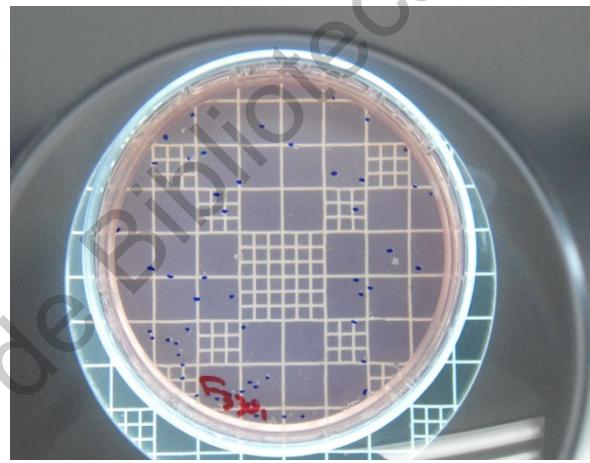


Figura 10. Placa crecimiento c/F3 30 µg/ml.

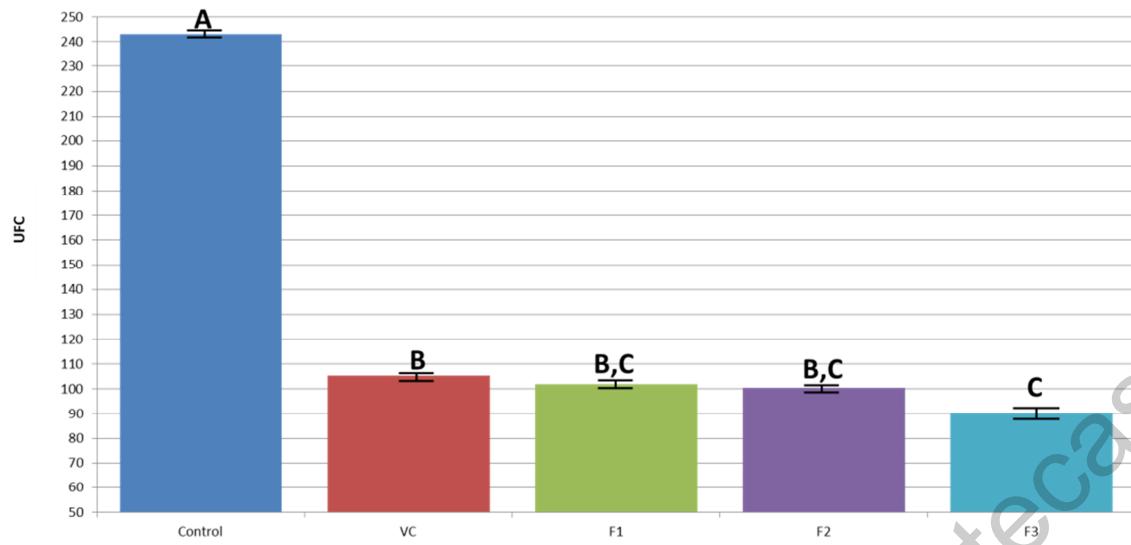


Figura 11. Número de UFC promedio de los ensayos realizados a concentración de  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se muestran desviaciones estándar. Se realizó ANOVA con prueba de Tukey con 95% de intervalo de confianza. VC= Veneno completo, F1= Fracción 1, F2= Fracción 2, F3= Fracción 3.

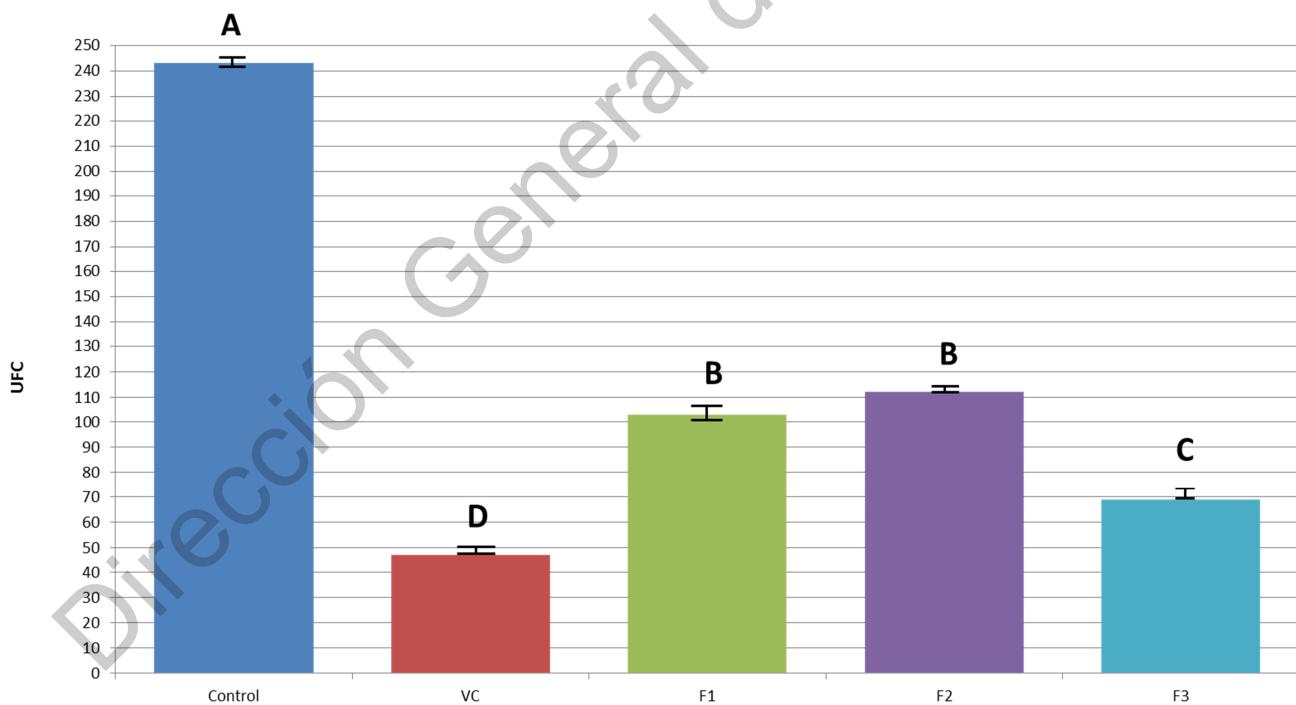


Figura 12. Número de UFC promedio de los ensayos realizados a concentración de  $30\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se muestran desviaciones estándar. Se realizó ANOVA con prueba de Tukey con 95% de intervalo de confianza. VC= Veneno completo, F1= Fracción 1, F2= Fracción 2, F3= Fracción 3.

## Discusión

Defensinas y catelicidinas, dos de los grupos más representativos de péptidos antimicrobianos, han sido encontrados en distintas especies animales (Wang et al., 2008). Sólo algunas moléculas aisladas de venenos de reptiles se conoce que tienen actividades antimicrobianas, entre ellas fosfolipasas A2 y L-amino oxidadas, así como derivados de estas (Stiles, 1991, en Wang et al., 2008; Torres et al., 2010). Se ha probado el efecto antimicrobiano de diversas proteínas y péptidos parecidos a defensinas y catelicidinas purificadas a partir del veneno de distintas especies de serpientes (Páramo et al., 1998, Wang et al., 2008).

El fraccionamiento cromatográfico del veneno completo en la columna de Sephadex G-50 tuvo como resultado tres fracciones o picos proteicos, lo cual es similar al fraccionamiento hecho por Remuzgo et al., en el año 2000, al fraccionar veneno de víbora de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*) en un Gel Sephadex G-100, en el cual, tras el análisis electroforético mostró que en el primer pico hay presencia de proteínas con un peso molecular entre 54.2 y 103.3 kDa, el segundo pico registró pesos moleculares comprendidos en dos bandas cercanas a los 22.5 y 14.8 kDa, mientras que en el tercer pico reportó una banda por debajo de los 15 kDa, es decir, los péptidos o proteínas más pequeñas se encontraban en la tercera fracción.

En el experimento realizado por Wang et al., en 2008, con el veneno de la serpiente krait bandeada (*Bungarus fasciatus*), después del proceso de cromatografía (HPLC en Sephadex G-50) encontraron cuatro fracciones (picos), dentro de las cuales la tercera fracción fue la que presentó la actividad antimicrobiana. En el trabajo presentado ahora, a pesar de solamente obtener tres fracciones (picos), también se observó un mayor efecto bactericida ejercido por la tercera fracción resultante del proceso cromatográfico, siendo en este caso, los péptidos de menor tamaño los que presentaron una mayor actividad de este tipo.

En el estudio hecho por Remuzgo et al., se describe actividad de L-aminoácido oxidasa en el veneno de *Crotalus durissus terrificus*, se menciona que el segundo pico presentó actividad fosfolipasa A2 (enzimas con actividad

bactericida), mientras que los picos 1 y 3, presentaron actividad proteolítica. Como se menciona anteriormente, el segundo pico registró pesos moleculares entre 22.5 y 14.8 kDa, por lo que la enzima fosfolipasa A2 tiene un peso comprendido entre esos rangos. Solís et al., 2014, aislaron la enzima L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*, encontrando un peso molecular de 125.7 kDa, así mismo, Lazo et al., 2007, aislaron esta enzima en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, resultando con un peso molecular de 127. 879 kDa; esto se puede interpretar en que, aunque se trate incluso de un género distinto al de la especie en estudio, la enzima LAAO es de un mayor tamaño, por lo que pudiera considerarse dentro de la Fracción 1. Considerando que se observó efecto bactericida en todas las fracciones, podemos suponer que es por la presencia de las enzimas (Fosfolipasas A2 y LAAO) que ejercen esta acción, siendo lo más adecuado caracterizar la actividad biológica específica de todas las fracciones del veneno de *Crotalus aquilus* para conocer las enzimas presentes en cada una.

A concentraciones de 2  $\mu$ g/ml, el efecto presentado por cada fracción y veneno completo fue similar. El hecho de que la F3 haya presentado una mayor actividad bactericida a concentración de 30  $\mu$ g/ml, en comparación con las otras fracciones, sugiere que en esta fracción hay una o varias moléculas que tienen un mayor efecto bactericida y que, este efecto, se hace más evidente a mayor concentración, lo que no ocurre al aumentar la concentración de proteínas presentes en las demás fracciones; esto también explicaría el aumento del efecto bactericida en el veneno completo pues, a más concentración, existe una mayor cantidad de estas moléculas y eso provocaría la mayor actividad presentada para disminuir el número de UFC. Se estima que los péptidos contenidos en la F3 tendrían un peso molecular menor a los 15 kDa (basado en la electroforesis de Remuzgo et al., 2000, para *C.d. terrificus*), lo cual coincide con los pesos registrados para los péptidos antimicrobianos descritos hasta la fecha en reptiles, los cuales no sobrepasan los 4.5 kDa (Wang et al., 2008, Gomes et al., 2005).

La media de crecimiento de UFC que se obtuvo con el veneno completo a la concentración de 30  $\mu$ g/ml, es estadísticamente menor y esto se atribuye a la

presencia del conjunto de proteínas que lo conforman en su totalidad. Es importante notar que cada fracción mostró efectos antibacterianos por separado, lo que demostraría que su acción combinada es altamente eficiente al inhibir el crecimiento de UFC puesto que existe una mayor actividad que cuando actúan separadas en fracciones. Se debe investigar más sobre el componente del veneno, encontrado en la fracción 3, que tiene esta propiedad, con el fin de aislarlo y probar su efecto en contra de una cantidad mayor de microorganismos patógenos, así como conocer mayormente las características de su estructura con el fin de describir el tipo de molécula es, y poder determinar si se trata de un péptido antimicrobiano.

### **Conclusiones**

La hipótesis planteada se acepta ya que todas las fracciones del veneno tienen actividad antibacteriana a ambas concentraciones.

Al utilizar la concentración de 2 $\mu$ g/ml se obtuvieron resultados similares en dos de las fracciones y el veneno completo siendo estadísticamente distintas al grupo control, la fracción 3 es estadísticamente distinta al resto.

La fracción 3, donde se encuentran las proteínas y péptidos de menor tamaño, mostró mejor actividad inhibitoria que las otras dos fracciones.

A mayor concentración existe una mayor actividad antibacteriana en el veneno completo seguido de la fracción 3.

### **Consideraciones**

Determinar actividad biológica de fracciones y pesos moleculares, con el fin de explicar la actividad antimicrobiana.

Caracterizar moléculas contenidas en F3, siendo la que mostró mejor actividad antimicrobiana, con el fin de encontrar moléculas para proponer alternativas a tratamientos contra especies de microorganismos patógenos.

### Referencias Bibliográficas:

Amer, L.S.; Bishop, B.M.; van Hoek, M.L. 2010. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 246–251.

Bailey P, Wilce J. 2001. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg Med (Fremantle)*. 13(1):28-36.

Banigan, J.R.; Mandal, K.; Sawaya, M.R.; Thammavongsa, V.; Hendrickx, A.P.; Schneewind, O.; Yeates, T.O.; Kent, S.B. 2010. Determination of the X-ray structure of the snake venom protein omwaprin by total chemical synthesis and racemic protein crystallography. *Protein Sci.* 19, 1840–1849.

Bayón, A., Brotóns, N. J., Albert, A., & Talavera, J. (n.d.). Patología Ocular En Reptiles . *Patología*, 32, 227–242.

Bellairs, A. 1969. The life of reptiles. Vol. 1. London: Weidenfeld and Nicolson. The venom apparatus and venom; pp. 184-217.

Bellomio A, Vincent PA, de Arcuri BF, Farías RN, Morero RD. 2007. Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J Bacteriol*;189:4180-6.

Bennet RA, En: Mader DR. 1996. Reptile Medicine and Surgery. WB Saunders Company. Philadelphia: 241-247.

Berschauer RL, Mader DR. 1998. Hepatic abcess due to *Corynebacterium* spp. in Desert tortoise, *Gopherus agassizii*. Proceedings of the ARAV.

Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. 2005. Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol (Paris)*; 53 (6): 341-8.

BioRad. Fast Protein Liquid Chromatography. Consultado en: <http://www.biорад.com/es-mx/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography#1>

Blaylock RSM. 2000. Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. *Toxicon*. 38:1529-1534. PubMed Abstract | Publisher Full Text OpenURL

Boman HG. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*; 13:61-92.

Borgden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250.

Bowdish DME, Davidson DJ, Hancock REW. 2005. A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*; 6:35-51.

Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Scott MG, Hancock REW. 2005. Impact of LL-37 on antiinfective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*; 77:451-9.

Buchanan- Gibbons. 1974. “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” – 8th Edition- Wiliams and Wilkins Co. Baltimore- Maryland.

Campbell, J. A. y W. W. Lamar. 2004. “The venomous reptiles of the Western Hemisphere”. Ithaca, London. Comstock Publishing Associates, Cornell Univ. Vol. II pp.: 527-594.

Chun-Hua Hsu, Chinpan Chen, Maou-Lin Jou, Alan Yueh-Luen Lee, Yu-Ching Lin, Yi-Ping Yu et al. 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res*;33:4053-4064.

Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EAF, Oliveira J, Diniz CG, Farias LM, et al. 2009. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 53(3):330-41.

Correa, P. G., & Oguiura, N. (2013). Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. *Toxicon*, 69, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.013>

Costerton, J. W. 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.

De Latour, F.A.; Amer, L.S.; Papanstasiou, E.A.; Bishop, B.M.; van Hoek, M.L. 2010,. Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 825–830.

Dean, S.N.; Bishop, B.M.; van Hoek, M.L. 2011. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11, 114.

Dean, S.N.; Bishop, B.M.; van Hoek, M.L. 2011. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front. Microbiol.* 2, 128.

Detrait J, Saint Girons H. 1979. Communautés antigeniques des venins et systematique des *viperidae*. *Bijdragen tot de Dierkunde*. 49: 71-80

Dixon, J.; Lemos, J. 2010. Anfibios y Reptiles del Estado de Querétaro, México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. 149-150, 418.

Dos Santos Nunes E, Aranda de Souza MA, De Melo VF et al. 2011. Purification of a lectin with antibacterial activit form *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. ElSevier.* 57-62

Durr M. and Peschel A. 2002. Chemokine Meet Defensin: the Merging Concepts of Chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun*;4:615-617.

Ethan D, Stolzenberg G,Anderson M. 1997. Ephitelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 16:8686-8690.

Evans RH. 1983.Chronic bacterial pneumonia in free ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *J. Wildl. Dis.* 19:349-352.

Fadel, P. Bettendorff, T. Herrmann, W.F. deAzevedo Jr., E.B. Oliveira, T. Yamane, K. Wüthrich. 2005. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus* Toxicon, 46, pp. 759-767

Fanti Echegoyen Eduardo. 1990. Seguridad y Riesgo en un Herpetario. Editado por: Herpetario del Zoológico de Guadalajara y Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

França SC, Kashima S, Roberto PG, Marins M, Ticli FK, Pereira JO, et al. 2007. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. Biochem Biophys Res Com. 355(2):302-6.

Frye F. 1991. Reptile care, an atlas of diseases and treatments. TFH Publications, New Jersey, Ed. 2. PP. 1-635.

Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F.R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Kochva, E., 2005. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature 439, 584–588.

Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, et al. 1994. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. Proc Natl Acad Sci USA; 91:11035-9.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwing SS, Daher K, Bainton DF et al. Defensins. 1985. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest;76:1427-1435.

Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Rev Immunol 3: 710–720.

Ganz T (2006) Hepcidin—a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol* 306: 183. 7. Kavanagh K, Dowd S (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 56: 285–289.

Glazebrook JS, Campbell RSF, and Thomas AT. 1993. Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Dis Aquat Org* 16:133- 147.

Gomes, V.M.; Carvalho, A.O.; Da Cunha, M.; Keller, M.N.; Bloch, C., Jr.; Deolindo, P.; Alves, E.W. 2005. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 45, 817–827.

Gonçalves AR, Soares MJ, de Souza W, DaMatta RA, Alves EW. 2002. Ultra structural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol Res.* 88(7):598-602.

Guttman Chen. 2009. FPLC standard operating procedure- AKTA system (GE).

Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000;8:402-10.

Harvey-Clark. 1995. Common dermatologic problems in pet reptilia. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* Vol 4, No 4:205-219.

Higuera Avendaño, J. 2005. Manual Práctico de contención y manejo de herpetofauna (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Hilf M, Wagner RA, and Yu VL. 1990. A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. *J Zoo Wildl Med* 21:318-325.

Hoppmann E, Wilson-Barron H. 2007. Dermatology in Reptiles. *Topics in medicine and surgery.*

Izidoro LFM, Ribeiro MC, Souza GRL, Sant'Anna CD, Hamaguchi A, Homsi-Brandeburgo MI, et al. 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorg Medic Chem.* 14(20):7034-43.

Jacobson ER. 2007. Infectious diseases and pathology of reptiles. Color Atlas and Text. Bacterial diseases of reptiles. 461-526. Parasites and parasitic diseases of reptiles. 571-665. 1ed. Taylor and Francis group; Gainesville, Florida.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:491-511.

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2007. Inmunología de Kuby. McGrawHill. Sexta Edición. Traducción: Palacios Martínez. México, 59-61

Kini RM. 1997. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p. 1-511.

Klauber, L. M. 1952. "Taxonomic studies of rattlesnakes of mainland Mexico". *Bulletin of the Zoological Society of San Diego. California.* 26: 1-143 (24).

Lazo, Fanny; Malaga, Orestes; Yarleque, Armando Y Severino, Ruperto. Algunas propiedades bioquímicas de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev. Soc. Quím. Perú* [online]. 2007, vol.73, n.3 [citado 2016-07-27], pp. 131-141 . Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2007000300002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2007000300002&lng=es&nrm=iso)>.

Lee PH, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, et al. 2004. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen*; 12:351-8.

Li, S.A.; Lee, W.H.; Zhang, Y. 2012. Efficacy of OH-CATH30 and its analogs against drug-resistant bacteria in vitro and in mouse models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3309–3317.

LinksDubovskii PV, Volynsky PE, Polyansky AA, Karpunin DV, Chupin VV, Efremov RG, et al. 2008. Three-dimensional structure/hydrophobicity of latarcins specifies their mode of membrane activity. *Biochemistry*. 47:3525-33.

Livermore DM. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis*; 34 (5): 634-40.

Luján Roca, D. Á. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4),465-474. ISSN: 0325-2957. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=535/53535594009>

Madadlou A, O'Sullivan S, Sheenhan D. 2011. Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* (Abstr.)

Marchand C, Krajewski K, Lee HF, Antony S, Johnson AA, Amin R, Roller P, Kvaratskhelia M, Pommier Y. 2006. Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicin to DNA abasic sites. *Nucl Acids Res*;34:5157-65.

Martínez, L. S., & Botero, L. (2011). Estudio retrospectivo de la casuística de reptiles en el laboratorio de patología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia entre los años 1971 y 2008. *Memorias de La Conferencia Interna En Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre Exótica Conv.*, 7(2), 11–44.

Martínez Silvestre A. 1994: Manual clínico de Reptiles. Grass-latros Ediciones, Barcelona.

Maruñak, S.L.; Ruíz De Torrent, R.M.; Teibler, G.P.; Gay, C.C.;Leiva, L. ; Acosta De Pérez, O. 2005. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. Departamento Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias Veterinarias- UNNE. 120-12.

McCoy RH, Seidler RJ. 1973. Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration and identification of seven genera of Intestinal bacteria associated with small green pet turtles. *Applied Microbiology*; Vol. 25: No. 4:534-538.

Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques*; 9 (3): 189-98

Millichamp NJ. 1991. Exotic animal ophthalmology. En: Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology*. Lea & Febiger. Philadelphia, 680-705.

Millichamp NJ, Jacobson ER, Dan Wolf E. 1983. Diseases of the eye and ocular adnexae in reptiles. *Jn/ Am Vet Med Assoc* 11: 1205-1212.

Miyakawa Y, Ratnakar P, Costello M, Catanzaro A. 1996. In vitro activity of the antimicrobial peptide human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*;64:926-932.

Murray M, Waliszewski NT, Garner MM, Tseng FS. 2009. Sepsis and disseminated intravascular coagulation in an eastern spiny softshell turtle (*Apalone spinifera spinifera*) with acute mycobacteriosis. *J Zoo Wildl Med*. 40(3):572-575.

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.

Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Catanzaro S. 1992. Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect immune*;60:4720-4725.

Oliveira DG, Toyama MH, Novello JC, Beriam LO, Marangoni S. 2002. Structural and functional characterization of basic PLA<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Protein Chem*. 21(3):161-8.

Oppenheim JJ, Yang D. 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*; 17:359-65.

Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 139-144.

Page, L.A. 1961. "Experimental Ulcerative Stomatitis in a King snake". Cornell Veterinary Vol. 51. 258-266.

Pal SK, Gomes A, Dasgupta SC, Gomes A. 2002. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. Indian J Exp Biol. 40(12):1353-8

Paramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerda J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E. 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotiox phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venoms-synthetic Lys49 myotoxin II- (115–129)-peptide identifies its bactericidal region. *Europ J Biochem*. 253:452-461.

Park CB, Kim HS, Kim SC. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide Buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*;244:253-7.

Passero LF, Tomokane TY, Corbett CE, Laurenti MD, Toyama MH. 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* spp. venoms. *Parasitol Res*. 101(5):1365-71.

Pastrana, J., Blasco, R., Erce, R., & Pinillos, M.A.. (2003). Picaduras y mordeduras de animales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(Supl. 1), 225-241. Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000200014&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200014&lng=es&tlng=es).

Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TK, Bow H, Yap EH, et al. 2007. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *J Appl Microbiol*. 102(3):650-9.

Perumal SR, Pachiappan A, Gopalakrishnakone P, Thwin M, Hian Y, Chow VTK, Bow H, Weng JT. 2006. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infectious Diseases*. 6:100

Porto BN, Telli CA, Dutra TP, Alves LS, Bozza MT, Fin CA, et al. 2007. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*. 50(2):270-7.

Radis-Baptista, G.; Kerkis, I (2011). Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr. Pharm. Design* 17, 4351–4361.

Rádis-Baptista, G., Kubo, T., Oguiura, N., da Silva, A.R.B.P., Hayashi, M.A.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 2004. Identification of crotasin, a crotaminerelated gene of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 43, 751–759.

Ramírez Bautista, A. y Hernández Ibarra, X. 2004. Ficha técnica de *Crotalus aquilus*. En: Arizmendi, M. C. (compilador). Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. . México, D.F.

Raphael BL. 1999. Chelonians (Turtles, Tortoises). En: Zoo and wild animal medicine, Part. III: Reptile groups. Fowler M. pp: 48-58. 5ta ed. Saunders, Philadelphia.

Remuzgo et al. 2000. Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev. peru. biol.* 7 (1): 67-73

Rivas-Santiago, Bruno, Sada, Eduardo, Hernández-Pando, Rogelio, & Tsutsumi, Víctor. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1), 62-71. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003636342006000100010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342006000100010&lng=es&tlng=es).

Rodrigues VM, Marcussi S, Cambraia RS, de Araújo AL, Malta-Neto NR, Hamaguchi A, et al. 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic

phospholipase A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 44(3):305-14.

Schildger BJ, Zschock M, Gobel Th. 1989. O-serovars and antibiotic sensibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from birds and reptiles. *J Vet Med*,36(4): 292-296 .

Shi J, Ross CR, Leto TL, Blecha F. 1996. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:6014-8.

Solís, Christian et al. Purificación y caracterización de la L-amino ácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Revista Peruana de Biología*, [S.I.], v. 6, n. 1, p. 075 - 084, jun. 2014. ISSN 1727-9933. Disponible en: <<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/8302>>.

Stábeli RG, Amui SF, Sant'ana CD, Pires MG, Nomizo A, Monteiro MC, et al. 2006. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 142(3-4):371-81.

Stábeli RS, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, et al. 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem*.12(11):2881-6.

Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB Jr. 2005. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol*;3:1608-1615.

Steinstaesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Ole G, Langer S, et al. .2008. Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*;14:528-37.

Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or Mulga snake) venom. *Toxicon*. 29:1129-1141.

Strateva T, Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*; 58 (9): 1133-48.

Téllez, G. A. et Castaño, J. C. 2010. Péptidos antimicrobianos. *Revista Infectio. Asociación Colombiana de Infectología*. 14(1): 55-67.

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

Torres, AFC, Dantas, RT, Menezes, RRPPB, Toyama, MH, Filho, ED, Oliveira, MF, Nogueira, NAP, Oliveira, MR, Monteiro, HSA, & Martins, AMC. (2010). Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(4), 614-622. <https://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010000400012>

Valencia, AA. 2006. Taxonomía y Distribución del género *Crotalus* (Lineo, 1758) en el Estado de Hidalgo. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.

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.

Wilson R, Dowling RB. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*; 53 (3): 213-9.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Xie, J.P.; Yue, J.; Xiong, Y.L.; Wang, W.Y.; Yu, S.Q.; Wang, H.H. 2003. In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 172–174.

Yamane, E.S.; Bizerra, F.C.; Oliveira, E.B.; Moreira, J.T.; Rajabi, M.; Nunes, G.L.; de Souza, A.O.; da Silva, I.D.; Yamane, T.; Karpel, R.L.; et al. 2011. Unraveling the antifungal activity of a So Radis-Baptista, G.; Kerkis, I. Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr. Pharm. Design* 17, 4351–4361.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*; 22:181-215.

Yang L, Harrou TA, Weiss TM, Ding L, Huang Hw. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*; 81:1475-85.

Yount, N.Y.; Kupferwasser, D.; Spisni, A.; Dutz, S.M.; Ramjan, Z.H.; Sharma, S.; Waring, A.J.; Yeaman, M.R. 2009. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14972–14977

Zanetti M (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 75: 39–48.

Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature*;415:389-395.

Zhang, Y.; Zhao, H.; Yu, G.Y.; Liu, X.D.; Shen, J.H.; Lee, W.H.; Zhang, Y. 2010. Structure-function relationship of king cobra cathelicidin. *Peptides*, 31, 1488–1493.

Zhao, H.; Gan, T.X.; Liu, X.D.; Jin, Y.; Lee, W.H.; Shen, J.H.; Zhang, Y. 2008. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides*, 29, 1685–1691.