



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

**“Identificación y caracterización del efecto antimicrobiano de la catelicidina
de *Crotalus aquilus*”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

MVZ. Edwin Esaú Hernández Arvizu

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dr. José Alejandro García Arredondo

Secretario

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Junio 2019

México

RESUMEN

Las catelicidinas son una familia de péptidos antimicrobianos, moléculas de la respuesta inmune innata, que se han encontrado en diversas especies animales. Recientemente, tras la problemática que ha representado el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, se ha considerado su estudio y análisis como candidatos para diseño de fármacos eficientes ante microorganismos multirresistentes. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar la catelicidina de la víbora de cascabel oscura de Querétaro, *Crotalus aquilus*. Esto se logró a partir de transcritos de mucosa oral y piel. El ARN fue aislado de estos tejidos y, subsecuentemente, procesado; el ADNc se sometió a Touchdown-PCR, las bandas amplificadas fueron purificadas y clonadas, posteriormente, se obtuvo una secuencia de 566 pares de bases y se predijo que el precursor de catelicidina está formado por un péptido señal, un dominio cathelin, una región aniónica, característica de catelicidinas de reptiles y anfibios, y el péptido maduro en la región C-terminal. Dos péptidos se mandaron sintetizar: el péptido maduro, que está conformado por 34 aminoácidos, y tiene alta homología estructural con los reportados para vipéridos sudamericanos; y un péptido derivado, de 23 aminoácidos, correspondiente a una región conservada en dos secuencias previamente reportadas y en la obtenida en este trabajo. La actividad antimicrobiana de ambos péptidos fue evaluada, contra cepas de laboratorio y provenientes de aislados clínicos humanos de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*; por el método de microdilución en placa a diferentes concentraciones, según las especificaciones del CLSI. Los dos péptidos mostraron tener una buena actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento a concentraciones comprendidas entre 2-8 µg/ml, es decir, 0.47-1.91 µM, presentando, en la mayoría de los casos, ser más eficientes que la ampicilina. Los resultados obtenidos indican la identificación de un péptido antimicrobiano, de la familia de las catelicidinas, por primera vez en esta especie y en un vipérido endémico del centro de México, con buen potencial antimicrobiano; cuyas propiedades deben seguir siendo estudiadas para analizar su viabilidad como alternativa a futuro.

Palabras clave: catelicidina, antimicrobiano, *Crotalus*, antibacteriano

SUMMARY

Cathelicidins are a family of antimicrobial peptides, molecules of the innate immune response, which have been found in various animal species. Recently, after the problem that has represented the increase of resistance to antimicrobials, their study and analysis have been considered as candidates for designing efficient drugs against multi-resistant microorganisms. The objectives of this work were to identify and characterize the cathelicidin of the Querétaro dark rattlesnake, *Crotalus aquilus*. This was achieved from transcripts of oral mucosa and skin. The RNA was isolated from these tissues and, subsequently, processed; the cDNA was subjected to Touchdown-PCR, the amplified bands were purified and cloned, subsequently, a sequence of 566 base pairs was obtained and it was predicted that the cathelicidin precursor is formed by a signal peptide, a cathelin domain, an anionic region, characteristic of cathelicidins of reptiles and amphibians, and the mature peptide in the C-terminal region. Two peptides were synthesized: the mature peptide, formed by 34 amino acids, which has high structural homology with those reported for South American viperids; and a derivative peptide, conformed by 23 amino acids, corresponding to a conserved region in two previously reported sequences and in the one obtained in this work. The antimicrobial activity of both peptides was evaluated against laboratory strains and from human clinical isolates of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*; by the microdilution method at different concentrations, according to the specifications of the CLSI. The two peptides showed to have a good antibacterial activity inhibiting the growth at concentrations comprised between 2-8 µg/ml, that is, 0.47-1.91 µM, being, in the most of the cases, more efficient than ampicillin. The results obtained indicate the identification of an antimicrobial peptide, of the cathelicidin family, for the first time in this species and in an endemic viperid from central Mexico, with good antimicrobial potential; whose properties must continue to be studied to analyze their viability as an alternative to the future.

Key words: cathelicidin, antimicrobial, *Crotalus*, antibacterial

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios que sabiamente me guía y acompaña en cada paso que doy hacia el cumplimiento de mis objetivos en la vida.

A mis padres y hermanos que son el mayor regalo que tengo en la vida, y que siempre me brindan inspiración, fortaleza y apoyo.

A mi familia y amigos, que están siempre presentes en mis pensamientos.

A la memoria de mi abuelo José, mi abuela Chucha y mi tía Candelaria, un abrazo enorme y lleno de cariño hasta el Cielo, gracias por cuidarme y acompañarme todo el tiempo, adorada familia.

A la memoria de mi amigo Fernando, gracias por el apoyo y la confianza. Te quiero amigo, un abrazo, no te hagas Gato.

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme estar vivo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por poner en mi camino a tantas fantásticas personas que me han aportado tanto, por la familia tan hermosa y especial que tengo, por permitirme adquirir aprendizajes y experiencias, por esta etapa tan maravillosa que representó este posgrado, por nunca dejarme solo y por la fuerza y perseverancia que puso en mi persona para afrontar los retos que aparezcan.

A mis padres, por mostrarme el amor más puro y sincero que puede existir en este mundo, por tanto apoyo y todas las oportunidades que me han dado durante la vida, por todo el esfuerzo y los sacrificios hacen para que pueda cumplir mis sueños y metas, por el gran ejemplo de pasión y entrega que son para mí, por el regalo de la vida y continuar guiándome con sabiduría en ella. Gracias por todo, estaré en deuda eterna con ustedes. Los amo con toda el alma.

A mis hermanos Pedro y Pablo, los seres humanos más locos de la existencia, por tantas risas y momentos de diversión, por esa unión tan sincera y fuerte, por la confianza y por todo lo que hemos vivido juntos. Los amo cuates.

A mi hermano Octavio, el guerrero más fuerte que este mundo ha podido ver, por toda la inspiración y motivación para jamás darse por vencido a pesar de todo lo que venga, por siempre luchar con esa fuerza y perseverancia, por la nobleza inquebrantable, porque sé que mi vida puedo depositarla en tus manos, sin lugar a dudas; por seguirme enseñando tantas lecciones sobre cómo enfrentar la vida. Te amo hermano, eres grandioso.

A mi prima Leslie, mi hermanita, por siempre estar pendiente de mí, sé que puedes conquistar el mundo. Te quiero mucho.

A toda mi familia, por estar siempre apoyando a pesar del tiempo y la distancia, por todo lo que he podido aprender y compartir con ustedes y por tanto cariño. Los quiero mucho.

A mi amigo Emmanuel, por ser el mejor amigo de la vida, por siempre darme un motivo para reír, por la enorme confianza y el apoyo, por siempre estar ahí y por cada locura que hemos vivido juntos, que vengan más años de sincera amistad, te quiero un chingo, tienes un amigo fiel en mí. Eres bien chido.

A América por iluminar mi camino, por toda la entrega y la atención, por nunca dejar de estar a pesar de tantas cosas, por todo el aprendizaje y las muchas experiencias juntos, por ser tan simple y tierna, por toda la ayuda y el apoyo incondicional, por todo lo compartido, por esa personalidad tan encantadora, por ser tú, tan grandiosa y hermosa, te quiero muchísimo, con todo mi corazón, con todo mi espíritu y todo mi ser, te adoro tanto. Sueña, cree en ti y cumple tu extraordinario destino.

A Mariel, por esa magia y ese enorme cariño, por todo lo maravilloso que compartimos, por ser una persona muy especial para mí y por todo el apoyo y la confianza, por ser simplemente magnífica. Te quiero mucho, al infinito y más allá.

A mis amigos Roberto y Libertad, por esa amistad tan bonita, por los momentos de risa y alegría, por la confianza, por la sinceridad, por la atención y por ser personas a quienes siempre les tendré un descomunal cariño, los quiero un montón, les agradezco tanto.

A mis amigos, Camacho, Quique, Loops, Sofy, Chava, Iris, Andrés y Andrea, por mantener esta grandísima amistad, por la convivencia, la confianza y el cariño, por todo lo que hemos compartido, los quiero mucho y así será siempre.

A mis amigos de toda la vida, Abel, Juan Carlos, Carlos Fernando, Lupita, Jennifer , Lorena, Jesús, y todos con quienes he compartido tantos agradables y enriquecedores momentos. Los quiero.

A las amistades tan bellas que hice en el laboratorio, Roxana, Brenda y Carina, por toda la convivencia y la confianza tan grande, por todo su apoyo, por el cariño y la admiración mutua y por tantos divertidos momentos que pasamos, las quiero muchísimo y espero conservar su amistad con el pasar de los años.

A mis amigos del laboratorio, Diego, Martina, Gaby y Lore, gracias por su amistad, por su apoyo y confianza, por todo lo que aprendí de ustedes, son muy especiales para mí, los quiero mucho.

A mis amigos Mario y Cristian, por tantos momentos divertidos, están bien locos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por el apoyo y los momentos compartidos, por el aprendizaje y la paciencia, los aprecio mucho.

A mis amigas Aransa, Raquel y Mariana, por el apoyo en el laboratorio de Química y por la amistad y la convivencia, las quiero.

A mi amigo Luis Díaz por su apoyo en el fraccionamiento de las muestras de veneno en el HPLC.

A Moni, Memo, las hermanas, Areli y todos mis amigos de la Facultad, con quienes he compartido tantas cosas, por la confianza y las risas, por todo el cariño, los quiero mucho.

Al MVZ y amigo Ricardo Valencia, por su ayuda para obtener las muestras de piel y mucosa oral de víbora de cascabel, te agradezco camarada.

Al MVZ Rodrigo Barrón y al personal del Hospital Veterinario de Especialidades en Pequeñas Especies, por su apoyo para realizar los procesos quirúrgicos de toma de biopsias.

Al Dr. Juan Mosqueda por aceptar dirigir mi trabajo, por todo el apoyo, en todos los aspectos, durante la realización de este proyecto, por la confianza y la libertad para desarrollarme y, sobre todo, por su valiosísima amistad. Lo estimo y admiro mucho.

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

A la Dra. Angelina Rodríguez y la Dra. Bertha Carvajal, por aceptar asesorarme en este trabajo, así como revisar mi tesis y apoyarme en la labor experimental.

Al Herpetario Mundo Reptilia y a mi amigo y compañero Óscar Rayas por las muestras de veneno, por el apoyo para la obtención de las mismas y la manipulación de los ejemplares, por permitirnos trabajar con los animales de su colección para sacar adelante este proyecto, por su amistad y compañerismo, gracias amigo, lo mejor para ti siempre.

A las personas que, por diversas circunstancias, decidieron llevar rumbos diferentes al mío, pero que durante mucho tiempo en mi vida y, específicamente, el tiempo en que llevé a

cabo mi maestría y que han estado apoyando siendo 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, por algún descuido, omití en hacer mención en esta sección, los quiero mucho y aprecio tanto su amistad, mi vida sería muy distinta si faltara alguno de ustedes.

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.

ÍNDICE

RESUMEN	II
SUMMARY	III
ÍNDICE.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	2
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	4
CATELICIDINAS.....	5
CATELICIDINAS ENCONTRADAS EN SERPIENTES.....	6
<i>Mecanismos de acción.....</i>	<i>9</i>
<i>Funciones inmunomoduladoras.....</i>	<i>12</i>
DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	13
<i>Hábitat y Distribución</i>	<i>14</i>
<i>Actividad antimicrobiana del veneno de C. aquilus</i>	<i>15</i>
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	17
II. METODOLOGÍA	18
DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS DE MANEJO REQUERIDAS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS	18
<i>Equipo de manejo y protección:.....</i>	<i>18</i>
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	18
<i>Toma de biopsias de piel y mucosa oral</i>	<i>19</i>
EXTRACCIÓN ARN.....	20
TRATAMIENTO CON DNASA I.....	21
REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	21
INICIADORES UTILIZADOS	23
PURIFICACIÓN DE BANDAS.....	25
SECUENCIACIÓN DE PRODUCTO DE PCR.....	26
CLONACIÓN	27
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.....	28
SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDO	29
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	29
RP-HPLC DE VENENO DE <i>C. AQUILUS</i>	31
ENSAYOS ANTIMICROBIANOS	31
<i>Preparación de los péptidos y antibióticos</i>	<i>31</i>

<i>Preparación de los inóculos</i>	32
<i>Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias</i>	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
V. CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de reacción para primer paso de RT-PCR.	22
Tabla 2. Segundo paso de preparación de reacción de RT-PCR.	22
Tabla 3. Preparación de reacción de clonación.	27
Tabla 4. Diseño experimental de ensayos antimicrobianos.	33
Tabla 5. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de <i>E. coli</i> . TOP10.....	51
Tabla 6. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC6538.	51
Tabla 7. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabla 8. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de <i>E. coli</i>	52
Tabla 9. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de <i>S. aureus</i>	53
Tabla 10. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (en µg/ml) de péptidos y antibióticos contra los microorganismos evaluados.	56
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (en µM) de péptidos y antibióticos contra los microorganismos evaluados.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo de TD-PCR utilizado.	24
Figura 2. Gel de electroforesis tras protocolo de TD-PCR.....	36
Figura 3. Bandas obtenidas a partir del protocolo de PCR semianidado..	37
Figura 4. Evaluación de las colonias tras el proceso de clonación.....	37
Figura 5. Evaluación de las colonias tras el proceso de clonación del fragmento más grande. Se esperaban bandas entre los 427 y los 443 pares de bases.	38
Figura 6. Resultados de la búsqueda BLAST.....	39
Figura 7. Predicción del marco de lectura abierto mediante el servidor de Translate tool.	40
Figura 8. Predicción de marco de lectura abierto con el servidor EMBOSS-Transeq.	40
Figura 9. Predicción del péptido señal mediante el servidor SignalP.	40
Figura 10. Resultado de la predicción de dominio por el servidor SMART	41
Figura 11. Predicción de la región con actividad antimicrobiana mediante el servidor AMPA.....	42
Figura 12. Organización en α -hélice predicha para la catelicidina de <i>C. aquilus</i> en el servidor HeliQuest.....	44
Figura 13. Organización en α -hélice predicha para el péptido de 23 aminoácidos	46
Figura 14. . Alineamiento múltiple de secuencias de los precursores de catelicidinas de serpientes realizado en el servidor Clustal Omega.	47
Figura 15. Posible estructura tridimensional del péptido maduro, basándonos en la homología con el péptido de <i>C. durissus</i>	48
Figura 16. Cromatograma de veneno completo, gradiente 0-100% de solución B.	48
Figura 17. Cromatograma de la fracción 3 obtenida por FPLC (Hernández-Arvizu, 2016), gradiente 0-100% de solución B.....	49
Figura 18. Comparación entre los cromatogramas del veneno completo (en rojo) y la fracción 3 obtenida por FPLC (negro).	49
Figura 19. Cromatograma del veneno completo, tras ajustar el gradiente de 0.65-59% de solución B.	50

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos, dada por su uso indiscriminado, es un problema a nivel mundial en cuestión de salud humana y animal, representando un aumento en los tiempos y costo de tratamiento, además, aumentando la tasa de mortalidad, siendo una de las prioridades de la Organización Mundial de la Salud, la cual, ha implementado varias estrategias para actuar en contra de esta situación. En el año 2017, se publicó un artículo de divulgación donde se enlistaban los microorganismos prioritarios para los cuales es necesario encontrar nuevos componentes antimicrobianos, esto para fomentar a los gobiernos de los países a invertir en el desarrollo y la investigación en este campo.

Se han estudiado diversas moléculas alrededor del mundo por su efecto ante los microorganismos resistentes, entre ellas los péptidos antimicrobianos, muchos de los cuales han sido identificados a partir de venenos de serpientes o expresados en algunos tejidos de estas especies. Una de las familias más trabajadas recientemente es la de las catelicidinas, pues han demostrado un gran potencial como moléculas base para desarrollar nuevas alternativas de tratamiento.

En el presente trabajo, se identificó un péptido expresado en mucosa oral y piel de la víbora de cascabel oscura de Querétaro (*Crotalus aquilus*), serpiente endémica del centro de México, de la cual no se tenían registros sobre este tipo de moléculas. Las características del péptido coinciden con las reportadas para catelicidinas caracterizadas en otras especies de serpientes, indicando la presencia de esta familia de péptidos en esta especie. La catelicidina de *C. aquilus* y un péptido derivado, de menor tamaño, fueron evaluados ante distintas cepas de microorganismos para determinar su actividad antimicrobiana, la cual se observó a bajas concentraciones ($< 2 \mu\text{M}$).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Resistencia a los antimicrobianos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la resistencia a los antimicrobianos como “la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los agentes antimicrobianos actúen contra ellos”. Las bacterias desarrollan resistencia de manera innata, además, al transmitir su material genético, permiten que otras bacterias puedan adquirir esta capacidad. A nivel global, este asunto representa una emergencia para la medicina moderna, conllevando un aumento en los costos de los tratamientos para las enfermedades causadas por los microorganismos resistentes, además, se sabe que trae consigo un incremento en el tiempo de recuperación de los pacientes afectados y provoca una tasa de mortalidad más elevada, siendo un tema de suma importancia en el ámbito de la salud humana y animal. Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural, el uso indiscriminado de los mismos ha acelerado este proceso, complicando aún más la situación.

En un informe publicado por la OMS en septiembre de 2017, se enfatiza en la falta de nuevos antibióticos para hacer frente a esta problemática creciente, mencionando que la mayoría de los fármacos que se desarrollan son modificaciones realizadas a los existentes actualmente y, por consecuencia, no representan una solución a largo plazo. En este mismo documento, se detallaba la presencia de 51 moléculas con potencial antibiótico en desarrollo clínico, los cuales podrían ser usados para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos resistentes, sin embargo, se mencionaba que solamente 8 de estos nuevos fármacos se habían clasificado por la misma OMS como alternativas válidas para enfrentar la presente situación.

Para el caso de las cepas resistentes y ultrarresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y de algunas bacterias gram negativas, como *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter*, se reporta una grave falta de antibióticos efectivos. En cuanto al desarrollo de fármacos contra la tuberculosis, se tiene el dato de que en los últimos 70 años solamente se han obtenido dos antibióticos contra estas cepas multirresistentes.

En febrero de 2017 la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, incluyendo 12 familias de bacterias que son de importancia para la salud humana, esto con la finalidad de fomentar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, siendo parte de su estrategia mundial para buscar cambiar esta preocupante realidad, no dependiendo exclusivamente de las empresas que producen agentes de manera comercial debido a la urgente necesidad de encontrar nuevas moléculas con este efecto terapéutico, buscando que los gobiernos establezcan políticas que motiven la investigación básica y avanzada en este tema, mediante la inversión pública o privada en apoyo a esta actividad científica. El listado fue elaborado con la colaboración de la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen, Alemania, teniendo en consideración criterios como: frecuencia al presentar resistencia, potencial de transmisión zoonótica y antropozoonótica, posibilidad de prevención de la enfermedad, nivel de peligrosidad de las infecciones provocadas, requerimiento de una hospitalización prolongada y disponibilidad de opciones terapéuticas para su tratamiento.

Esta lista maneja tres categorías donde se agrupan las bacterias dependiendo de la prioridad que representan, considerando las clasificaciones siguientes: importancia crítica, alta y media. El primer grupo (importancia crítica), incluye a las bacterias gram negativas mencionadas anteriormente, además, menciona géneros como *Pseudomonas*, *Serratia* y *Proteus*; se considera que este conjunto tiende a provocar graves enfermedades que suelen ser letales, además de presentar resistencia a antibióticos como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación.

A continuación se muestra la lista publicada por la OMS:

Prioridad 1: CRÍTICA (resistentes a carbapenémicos)

- *Acinetobacter baumannii*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- Enterobacteriaceae.

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

Además de esta lista, se tiene en cuenta al bacilo de la tuberculosis, hacia el cual se llevan a cabo programas específicos para contener en contra de su resistencia, a sabiendas de que es causante de más de 250 000 fallecimientos anuales.

En otros rubros de la estrategia a seguir de la OMS, se ha establecido la Alianza Mundial e Investigación y Desarrollo de Antibióticos, aunado a esto, se realizan trabajos con la finalidad de mejorar la prevención y el uso adecuado de los antibióticos, actuales y de aquellos que se planea tener a futuro, en materia de salud humana y animal.

Péptidos antimicrobianos

Las células epiteliales, y algunos leucocitos, producen una diversidad de componentes, que les brindan protección ante microorganismos patógenos (Owen *et al*, 2015), y que han evolucionado como mecanismos de defensa para complementar las barreras mecánicas formadas por dichas células (Abbas *et al.*, 2018). Entre estas moléculas de la inmunidad innata se incluyen los péptidos antimicrobianos, los cuales se conforman

generalmente por menos de 100 aminoácidos, y se encuentran en organismos vertebrados e invertebrados, incluso se han descrito en hongos y plantas (Owen *et al*, 2015). Son catiónicos y de carácter anfipático, algunos son ricos en cisteína, e interactúan con los fosfolípidos ácidos de la membrana, alterando su estructura (Owen *et al*, 2015). Estas moléculas se encuentran principalmente en donde hay más probabilidad de tener contacto con microorganismos, como la piel y los tractos digestivo, genitourinario y respiratorio (Tizard, 2009). En el interior de los microorganismos tienen otros efectos, tales como, la inhibición de síntesis de proteínas, ADN o ARN y la activación de enzimas con efecto antimicrobiano, el resultado final es la muerte celular. En general, tienen efecto ante bacterias, hongos, parásitos, virus e, inclusive, células tumorales ((Hancock y Diamond, 2000; Owen *et al*, 2015).

Para septiembre de 2017 se había reportado la existencia de 2818 péptidos antimicrobianos, identificados en distintas clases de seres vivos, de los cuales, 2159 fueron caracterizados en diferentes especies animales (Kumar *et al.*, 2018). En organismos que carecen de respuesta inmune adaptativa, tales como plantas o invertebrados, la respuesta innata tiene un rol esencial en su defensa ante infecciones (Hancock *et al*, 2006; Tamp *et al.*, 2015). Los péptidos antimicrobianos han sido aislados de distintos tipos celulares en vertebrados, como leucocitos y células epiteliales de la piel, pulmones y mucosa oral (Yang *et al.*, 2004); también se sabe que tienen funciones pro inflamatorias, quimiotácticas e inmunomoduladoras (Xhindoli *et al.*, 2015), la actividad de los péptidos depende de la secuencia y de sus características estructurales (Kumar *et al.*, 2018).

Catelicidinas

Las catelicidinas están conformadas por entre 12 y 80 residuos de aminoácidos y tienen estructuras diversas. La familia de las catelicidinas se caracteriza por la presencia de un dominio N-terminal llamado dominio Cathelin (cathepsin L inhibitor). El precursor se encuentra en gránulos de neutrófilos y células NK (Bals, 2000), también se expresan en epitelios y queratinocitos. Presentan un péptido señal de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, el dominio cathelin es altamente conservado y está compuesto de 98-114 aminoácidos. La región C-terminal del propéptido corresponde a la catelicidina madura, la cual se libera del dominio cathelin por la acción de una elastasa extracelular. El péptido

maduro consiste en una α -hélice anfipática de entre 23-37 aminoácidos (Zanetti 2004; Zelezetsky et al., 2006). Existen catelicidinas que presentan estructuras que contienen cisteínas pareadas y que pueden presentar plegamientos β (Dürr et al., 2006), tal como las protegrinas y batenecinas, de cerdos y bovinos respectivamente (Kumar et al., 2017). Son péptidos multifuncionales, de gran importancia en la respuesta inmune, con un buen efecto antimicrobiano, actuando sobre la membrana de los patógenos formando poros y, además, teniendo blancos intracelulares, provocando la muerte de los microorganismos (Chun-Hua et al., 2005).

Catelicidinas encontradas en serpientes

Un péptido tipo catelicidina, denominado catelicidina BF, caracterizado en el elárido *Bungarus fasciatus*, fue aislado, mediante diversos protocolos de fraccionamiento cromatográfico, a partir de veneno. Se demostró que se expresa en diferentes tejidos, como fueron: estómago, tráquea, piel, corazón, músculo, pulmón, cerebro, riñón, bazo, intestino, hígado, ovario y glándula de veneno. Para este péptido se predijo que el precursor está formado por 191 aminoácidos, teniendo un péptido señal, un dominio cathelin y un sitio de escisión por elastasa, ubicado en la valina 157, existente en péptidos homólogos de bovinos, porcinos y aves, para dar lugar a la liberación del péptido maduro, indicando que el procesamiento se lleva a cabo por proteasas de este tipo. Considerando lo anterior, se predijo que catelicidina BF madura estaría conformada por 34 aminoácidos, sin embargo, tras la caracterización, se notó que está compuesta únicamente por 30, entre ellos 12 residuos básicos, principalmente lisinas, conteniendo un solo residuo ácido (glutamato), siendo rico en fenilalaninas; teniendo un peso de 3.63 kDa. Su actividad antimicrobiana se probó contra *E. coli*, *Bacillus* sp., *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus terreus* y *Chaetomium globosum*, siendo altamente eficiente a bajas concentraciones (Wang et al., 2008), siendo, en algunos casos, más eficiente que tres antibióticos (ampicilina, benzylpenicilina e imipenem con cilastatina sódica) y que el HDW, un péptido antimicrobiano de la *Rana nigrovittata*. Este péptido mostró tener muy baja actividad hemolítica contra eritrocitos humanos, a concentraciones de hasta 400 μ g/ml. A esa misma concentración, tampoco tuvo actividad citotóxica contra macrófagos de ratón (RAW264.7), esto es indicativo de la selectividad hacia los microorganismos. Catelicidina

BF y un derivado sintético Catelucidina BF15 (conformado por 15 aminoácidos), tuvieron actividad ante *E. coli*, tras 3 y 10 horas, respectivamente, de haber sido incubados con 90% de suero humano fresco (Wang *et al.*, 2008).

El precursor de la catelucidina llamada Hc-CATH, cuya secuencia fue obtenida a partir de ADNc de glándula de veneno de la serpiente marina *Hydrophis cyanocinctus*, está formado por 187 aminoácidos, teniendo alto grado de similitud con otras catelucidinas en cuanto a regiones del péptido señal y el dominio catelino. Al realizar un alineamiento de las secuencias de aminoácidos, comparando con la catelucidina BF reportada previamente por Wang *et al.*, se determinó que el sitio de escisión para el péptido maduro estaba presente en ambos precursores, por lo que, al predecirse, el resultado fue un péptido compuesto por 30 aminoácidos. Mediante Western blot, se confirmó la presencia de este péptido en la glándula de veneno, bazo, pulmón y piel, siendo la última la que presentó más baja expresión. Una vez analizada su actividad antimicrobiana ante microorganismos patógenos para humanos, se notó su potente actividad al ser efectivo en rangos de 0.16-20.67 μM , además se evaluó también contra 11 bacterias patógenas causantes de enfermedades en animales marinos, teniendo actividad en un rango de 0.64-5.17 μM . Asimismo, tras la incubación del péptido 1 hora a diferentes temperaturas (4°, 20°, 37°, 50°, 70° y 90°C), las concentraciones mínimas inhibitorias contra *E. coli* permanecieron en un rango entre 1.95 a 4.68 $\mu\text{g/ml}$. Después de la incubación con suero humano a 37°C, pudo detectarse actividad antimicrobiana, sin embargo, la concentración mínima inhibitoria se vio aumentada hasta 37.5 $\mu\text{g/ml}$ contra *E. coli*, demostrando buena estabilidad en suero. Este péptido tuvo poca actividad hemolítica y citotóxica a concentraciones de hasta 200 $\mu\text{g/ml}$ (Wei *et al.*, 2015).

Se caracterizaron 6 catelucidinas a partir de ARNm obtenido de glándula de veneno de cuatro especies de vipéridos sudamericanos (*Bothrops atrox* (batroxicidina), *Bothrops lutzi* (lutzidina), *Crotalus durissus terrificus* (crotalucidina) y *Lachesis muta rhombeata*) (lachesidina) y del elápidio *Pseudonaja textilis* (Pt_CRAMP1 y Pt_CRAMP2), tras la secuenciación y los análisis bioinformáticos, se predijo que la secuencia completa en nucleótidos era de 570 para las especies del género *Bothrops*, 585 para *Lachesis* y *Crotalus*, y 555 para *Pseudonaja*, generando propéptidos de 189, 194 y 184 aminoácidos, respectivamente. Estos péptidos mostraron alta homología estructural en comparación con

los reportados para especies como *B. fasciatus*, *O. hannah* y *N. atra*. Las secuencias de aminoácidos mostraron tener un sitio de escisión para el péptido señal, conformado, en promedio, por 20 residuos (Falcao *et al.*, 2014). Se predijo también, un sitio de corte común en todos los precursores, que libera un péptido maduro de 34 aminoácidos en todas las secuencias evaluadas, y que es similar al sitio de escisión determinado para otras especies (Wei *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014). La actividad antimicrobiana de la crotalicidina, batroxidina y Pt_CRAMP1 fue evaluada, en comparación con la de la catelicidina de cobra real (OH_CRAMP), demostrando tener concentraciones mínimas inhibitorias entre 0.25 y 64 µg/ml (entre 0.06-15.1 µM) para microorganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, y *S. pyogenes*; requiriendo concentraciones entre 64 y 128 µg/ml para presentar efecto ante *E. faecalis*. (15.1-30.8 µM). En cuanto a su actividad hemolítica, los péptidos de víperidos (crotalicidina y batroxidina), mostraron solamente 10% de hemólisis a concentraciones de 25 y 12.5 µM, respectivamente, y 25-30% de efecto hemolítico con 100 µM (aproximadamente 400 µg/ml), exhibiendo un amplio margen de selectividad para futuras consideraciones (Falcao *et al.*, 2014).

Las secuencias para los precursores de catelicidinas de *Ophiophagus hannah* (Cobra real) (OH-CATH) y de *Naja atra* (Cobra China) (NA-CATH), fueron obtenidas a partir de bibliotecas de ADNc desde ARN aislado de glándulas de veneno. Se predijo la secuencia de aminoácidos que, para el propéptido, estaba conformada por 191 residuos, para ambas especies, teniendo una secuencia de péptido señal (correspondiente a 22 residuos), un dominio cathelin altamente conservado y una secuencia de la catelicidina madura en la región C-terminal. Se predijo un sitio de escisión por elastasas entre la valina 157 y la lisina 158, liberando un péptido maduro de 34 aminoácidos. La actividad antimicrobiana de la OH-CATH fue determinada en presencia de 1% de NaCl, siendo esta catelicidina altamente efectiva contra *E. cloacae* (concentración mínima inhibitoria de 1 µg/ml), ante aislados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* y *E. aerogenes*, el péptido fue eficiente a una dosis de 2 µg/ml, mientras que para un aislado clínico de *E. coli*, fue de 20 µg/ml. Las dosis utilizadas para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en presencia de NaCl y en solución libre de este compuesto fueron 8 y 2 µg/ml, respectivamente, mostrando que el efecto se vio influenciado cuando se tiene ciertas concentraciones de sal en la solución

donde llevó a cabo su acción antimicrobiana. OH-CATH no mostró actividad hemolítica en eritrocitos humanos incluso a concentraciones de hasta 200 µg/ml . Derivados de este péptido OH-CATH 30 y OH- CM6 (conformados por 30 y 20 residuos respectivamente), mostraron tener buena actividad ante cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* y *E. faecalis*, con concentraciones mínimas inhibitorias entre 1.56 y 25 µg/ml, sin embargo, no hubo inhibición de crecimiento contra *C. albicans*. Enantiómeros formados por D-aminoácidos, tuvieron concentraciones entre 3.125 y 50 µg/ml, para inhibir el crecimiento de las mismas cepas. Tanto D-péptidos como L-péptidos, tuvieron poca actividad hemolítica cuando se evaluaron a concentraciones de 400 µg/ml, mientras que la LL-37 tuvo 58% de hemólisis a esta concentración, D-OH-CATH y L-OH-CATH, exhibieron poca actividad citotóxica a concentraciones por encima de 200 µg/ml. Tras 3 horas de incubación con 100% de suero humano, los L-péptidos perdieron su actividad hasta en 80%, sin embargo, los D-péptidos no sufrieron cambios en su capacidad antibacteriana tras la incubación hasta por 12 horas, demostrando mayor resistencia a degradación por proteasas (Zhao et al., 2008; Li et al., 2012; Zhang et al., 2010).

La catelicidina NA-CATH (34 aminoácidos) y sus derivados de 11 aminoácidos, mostraron tener actividad *in vitro* e *in vivo* contra bacterias gram negativas, como *E. coli* K12, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 con concentraciones efectivas medias entre 0.19- 22 µg/ml y 0.93-160 µg/ml , respectivamente. Asimismo, a concentraciones de 100 µg/ml, tuvieron efecto hemolítico entre 0.2-1.9% en eritrocitos de caballo(De Latour et al., 2010). En otros estudios se demostró la actividad de la catelicidina de la cobra china contra *P. aureginosa* (Dean et al., 2011), *Francisella novicida* (Amer et al., 2010); y para la bacteria gram positiva de *S. aureus* (Dean et al., 2011).

Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos son diversos, incluyendo, interacciones directas con la membrana celular, acción sobre blancos intracelulares que causarían interrupción de procesos vitales, como son, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Además, se conoce su capacidad inmunomoduladora y quimiotáctica (Yang et al., 2004).

En el caso de la catelicidina humana, LL-37, esta presenta una estructura desordenada en solución acuosa, tras la interacción con membranas, se estabiliza su conformación y adquiere su configuración de α -hélice. Esta característica es común entre péptidos antimicrobianos con estructuras helicoidales.

. La mayoría de los péptidos antimicrobianos de vertebrados e invertebrados se unen a la membrana sin necesidad de interactuar con algún receptor específico (Shai, 2002). El primer paso para llevar a cabo el mecanismo sobre la superficie membranal de los microorganismos, se da por la atracción electrostática entre los elementos aniónicos que la conforman y los péptidos catiónicos, esta interacción puede verse inhibida por altas concentraciones de sal (Boman, 1995; Ogata et al., 1992; Miakawa et al., 1996). La selectividad hacia la membrana de los microorganismos se da debido a la presencia de fosfolípidos con carga negativa en la parte exterior de la misma, mientras que en células animales, este tipo de moléculas se encuentran principalmente de manera interna (Zasloff, 2002). La membrana externa de las células animales contiene fosfolípidos zwitteriónicos, como es la fosfatidilcolina, esfingomielina y colesterol, mientras que la membrana externa de las bacterias presenta, en su mayoría, lípidos como el fosfatidilglicerol, molécula que presenta una cabeza cargada negativamente (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Algunas otras propiedades de los lípidos son importantes al momento de llevarse a cabo la interacción con los péptidos antimicrobianos, por ejemplo, la curvatura membranal, dada por la forma de los fosfolípidos, dependiente del tamaño del grupo funcional que forme la cabeza polar (Jouhet, 2013). Las bacterias Gram positivas presentan moléculas como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en su pared celular, que también les confiere esta carga negativa; asimismo, esta característica es concedida en las bacterias Gram negativas mediante el componente lipopolisacárido. Estas moléculas en la superficie externa de las bacterias otorgan la carga negativa necesaria para la atracción electrostática con los distintos péptidos antimicrobianos.

Una vez que ocurren las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con los elementos presentes en la superficie externa bacteriana, la formación de poros transmembranales se clasifican de dos maneras, dependiendo de cómo se llevan a cabo

estos mecanismos. El primero de ellos es el mecanismo de barril, los péptidos se colocan primeramente de manera paralela a la membrana, al alcanzar un nivel crítico, se insertan de manera perpendicular en la bicapa lipídica, la cara hidrofóbica del péptido interactúa directamente con los lípidos membranales, mientras que la cara hidrofílica queda expuesta de manera central, formando el canal del poro. Esto tiene como consecuencia final una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial membranar (Brogden, 2005).

En el modelo de poro toroidal, los péptidos se insertan en la membrana y provocan una curvatura de la bicapa lipídica, formando poros transitorios consistentes en los grupos que conforman las cabezas de los fosfolípidos y los péptidos. Péptidos como magainina y melitina tienen este mecanismo de acción (Yang et al., 2001). Aquí, tras generar zonas de inestabilidad, algunos péptidos pueden translocar hacia el citoplasma, donde tienen blancos intracelulares. Ambos mecanismos de formación de poros llevan a la despolarización de la membrana y muerte por lisis celular (Uematsu y Matsuzaki, 2000).

En el modelo de alfombra, los péptidos se orientan de manera paralela sobre la superficie de la membrana plasmática, formando una capa extensa hasta alcanzar un umbral que provoca desestabilización en esta estructura celular y causando la desintegración membranar por formación de micelios, este mecanismo no requiere de interacciones péptido-péptido ni de la formación de canales a través de la membrana (Duplantier y Van Hoek, 2013, Kumar et al., 2018).

Péptidos como el buforin II, caracterizado en el sapo *Bufo gargarizans* y la indolicina, de neutrófilos bovinos, pueden acumularse de manera interna y unirse al ADN o a enzimas relacionadas, inhibiendo el crecimiento por medio de esta interacción (Park et al., 1998; Marchand et al., 2006).

Otros péptidos, como el PR-39, el dermaseptin y la β -defensina humana, tienen efecto sobre la síntesis proteica; drosocin (péptido encontrado en *Drosophila melanogaster*) también tiene la facultad de unirse a los ribosomas e impedir la traducción (Florin et al., 2017).

Funciones inmunomoduladoras

Los péptidos antimicrobianos desempeñan una gran cantidad de funciones inmunomoduladoras, regulando la expresión génica en diversos grupos celulares, actuando como factores quimiotácticos, promoviendo diferenciación celular y liberación de quimiocinas (Oppenheim et Yang, 2005; Bowdish et al., 2005). Fragmentos de algunos péptidos inducen la expresión de IL-8, estimulan infiltración de leucocitos y provocan proliferación de células de la piel, teniendo efecto directo sobre el proceso de cicatrización (Lee et al., 2004). Los neutrófilos estimulados con IL-8, liberan LL-37 (catelicidina humana) (Chertov et al., 1996). En ratones tratados con LL-37, se notó un aumento en la producción de proteína quimiotáctica de monocitos I (MCP-1) (Scott et al, 2002).

Las células cebadas liberan mediadores proinflamatorios (histamina y prostaglandinas), lo que provoca un aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de leucocitos, tras la estimulación con LL-37 (Niyonsaba et al., 2001), además, también son capaces de producir este péptido (Di Nardo et al, 2003). LL-37 y su análogo quiral D-LL-37 activan el receptor para factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Bowdish et al., 2004). Este péptido provoca activación de señales reguladas por cinasas extracelulares en queratinocitos y monocitos (Niyonsaba et al., 2004; Lau et al., 2005).

Los niveles en piel de esta catelicidina se ven incrementados en presencia de heridas, y se ha encontrado que el epitelio que se vuelve a formar es en el lugar donde se expresó principalmente este péptido (Dorschner et al, 2001; Heilborn et al., 2003). A ciertas concentraciones, la LL-37, ha mostrado aumentar la migración y proliferación de fibroblastos (Oudhoffetal.,2010), también provoca migración de queratinocitos (Tokumaru et al., 2005).

La catelicidina humana puede mediar neovascularización a través de su acción sobre el receptor FPRL-1 en las células endoteliales (Koczulla et al., 2003). PR39, catelicidina encontrada en cerdos, también ha mostrado tener capacidad angiogénica (Li et al., 2000).

La LL-37 ha mostrado tener, además de su actividad antimicrobiana, funciones de regulación de inflamación y modulación de la respuesta inmune (Hanckock *et al.*, 2016). Este péptido utiliza receptores FPRL-1 (formyl protein receptor like 1), un receptor proteico acoplado a proteína G, para atraer neutrófilos, monocitos y células T (Yang *et al.*, 2000). La secreción de IL-1 β por monocitos, es estimulada por la interacción de esta catelicidina con el receptor P2X7 (Elessner *et al.*, 2004). La catelicidina de *Hydrophis cyanocinctus* (serpiente marina) tuvo efecto antiinflamatorio al inhibir acción de MAPK's (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y la translocación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B en células cuando fueron incubadas con el péptido antimicrobiano y lipopolisacárido (LPS) al mismo tiempo, asimismo, se inhibió la producción de óxido nítrico y citocinas inflamatorias inducidas por LPS. También se describió como la catelicidina, llamada Hc-Cath, bloquea la unión de LPS con el complejo TLR4/MD2 evitando la activación de vías de señalización inducidas por este componente bacteriano (Wei *et al.*, 2015). La LL-37, también reduce la unión de lipopolisacárido con la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), el MD2, así como de otros elementos de TLR4, evitando la translocación de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B, modulando la transcripción de genes, reduciendo, por ejemplo, la expresión de TNF- α (Scott *et al.*, 2000; Bowdish *et al.*, 2004; Steinstaesser *et al.*, 2008).

Descripción de la especie

Crotalus aquilus es una serpiente de cascabel de tamaño pequeño, la mayoría de los ejemplares adultos no exceden los 50 cm, sin embargo, se han tenido registros de individuos de hasta 68.1 cm. (Campbell y Lamar, 2004; Mociño-Deloya y Setser, 2007). La mayor parte de los ejemplares presentan doce escamas supralabiales, la escama rostral es más ancha que larga; la escama prenasal está curvada por debajo de la postnasal, mientras que la subocular anterior tiene contacto con la cuarta y quinta escamas supralabiales, pudiendo ser la quinta y la sexta o estar separadas por una escama interoculabial, usualmente presenta 1 escama cantal de cada lado (pudiendo ser dos) y un par de escamas intercantales, de dos a tres escamas internasales, dando un total de cinco a diez escamas en el área internasal-prefrontal, normalmente tienen tres intersupraoculares; regularmente una escama loreal en cada lado que se separa de las supralabiales por la presencia de escamas

foveales, teniendo también, usualmente, tres prefoveales, entre diez y doce supralabiales; generalmente, once infralabiales. Estos animales tienen frecuentemente 23 hileras de escamas dorsales, entre 138–158 ventrales, entre 29–31 subcaudales, variando entre machos y hembras; asimismo, normalmente diez escamas en la base del cascabel (Campbell y Lamar, 2004).

El color de la especie varía desde un café pálido o café oscuro, a un gris o gris verdusco, verde amarillento, incluso café rojizo. Es notoria la presencia de un par de manchas cafés sobre la nuca y un patrón de entre 21 a 41 manchas cuadrangulares en el dorso, ocupando de cinco a siete escamas cada una en su anchura; posteriormente, tiene de tres a ocho bandas en la cola, además presentan una serie de manchas laterales. También se observa una línea postocular bien definida. La región ventral varía entre color amarillento, rosado o grisáceo con manchas cafés que se hacen más intensas en sentido antero-posterior (Campbell y Lamar, 2004).

Hábitat y Distribución

Crotalus aquilus es endémica del país y según la NOM-059-SEMARNAT-2010 su estatus es sujeta protección especial. Se puede encontrar en hábitats rocosos y áreas kársticas abiertas, en bosques de pino-encino, bosques mesófilos de montaña y mezquitales (Campbell y Lamar, 2004).

Esta especie se distribuye en la zona norte del Eje Neovolcánico Transversal desde el noroeste de Veracruz, hasta el sur de San Luis Potosí; extendiéndose hacia los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Jalisco y Zacatecas (McCranie y Wilson, 2001; Campbell y Lamar, 2004; Dixon y Lemos-Espinal, 2010; Lemos-Espinal y Dixon, 2013; Carbajal-Márquez *et al.*, 2015). En el estado Querétaro se encuentra principalmente en los municipios de Landa de Matamoros, Pinal de Amoles, Peñamiller, Tolimán, Cadereyta de Montes, Colón y Santiago de Querétaro (Dixon y Lemos, 2010).

Se localiza en hábitats rocosos dentro de bosques de pino-encino, praderas abiertas, matorrales tropicales, mezquitales de montaña y en lugares donde la vegetación ha

sido modificada por acción humana (Campbell y Lamar, 2004; Meik *et al.*, 2007; Bryson *et al.*, 2014).

Actividad antimicrobiana del veneno de *C. aquilus*

Tras un fraccionamiento cromatográfico en FPLC, en una columna Sephadex G-50, de 1x48 cm, a una tasa de flujo de 1 ml/min, se obtuvieron tres fracciones del veneno de *C. aquilus* (F1, F2 y F3). La actividad antimicrobiana de las fracciones y el veneno completo fueron evaluadas contra un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* a dosis de 2 µg/ml y 30 µg/ml. En el conteo de UFC, se notó que a la primer concentración se inhibía el crecimiento entre un 56.3-61.9%, resultados similares para las fracciones y el veneno completo, sin embargo, a la concentración más alta, el veneno completo tuvo mayor efectividad, inhibiendo el crecimiento en un 80.6%, seguido de la fracción 3 (aquella donde se encontrarían las moléculas de menor tamaño) que inhibió el crecimiento en un 71.7% , siendo estadísticamente diferente al efecto presentado por las otras dos fracciones, tras analizarse los resultados mediante un ANOVA con método de Tukey con 95% de intervalo de confianza (Hernández-Arvizu, 2016).

Hipótesis

Crotalus aquilus tiene un péptido catelicidina con actividad antimicrobiana.

Objetivo general

Identificar la catelicidina de *Crotalus aquilus* y caracterizar su actividad antimicrobiana.

Objetivos específicos

- Identificar la catelicidina de *Crotalus aquilus*.
- Obtener la catelicidina en forma pura.
- Caracterizar la actividad antimicrobiana de la catelicidina.

Justificación

El aumento de cepas de microorganismos patógenos resistentes a agentes antimicrobianos requiere búsqueda de nuevos tratamientos.

Los péptidos antimicrobianos de reptiles han demostrado ser más eficientes que algunos antibióticos.

En Querétaro existe la serpiente *C. aquilus* que es una especie endémica de México, cuyo veneno presenta actividad antimicrobiana.

Utilizando herramientas de genómica y proteómica, se pueden caracterizar estos péptidos.

II. METODOLOGÍA

Los protocolos de este proyecto fueron evaluados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, aprobados con el número 38FCN2017 el 17 de diciembre de 2017. Se trabajó con dos ejemplares adultos de *Crotalus aquilus* pertenecientes a la colección de la UMA Herpetario Mundo Reptilia con registro SEMARNAT-UMA-IN-00048-QRO, en la delegación Santa Rosa Jaúregui, Querétaro.

Descripción de técnicas de manejo requeridas para la obtención de muestras

Equipo de manejo y protección:

Se contó con el equipo de manejo y protección mínimo necesario para las manipulaciones que se llevaron a cabo (Fanti, 1990), conformándose, entre otras cosas, de:

- Ganchos herpetológicos de distintos tamaños.
- Cajas de plástico medianas con tapa de seguridad, con orificios en su superficie para permitir entrada y salida de aire.
- Lugar despejado para permitir movimientos de los manejadores.
- Juegos de tubos de acrílico transparente con diámetros diferentes.
- Equipo de primeros auxilios.
- Faboterápicos específicos.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de veneno de víbora de cascabel queretana (*C. aquilus*) por el método convencional de extracción del veneno, el cual consistió en hacer morder a la serpiente un vaso de precipitado cubierto por una membrana de plástico film mientras se estimulaba la glándula de veneno. Inmediatamente se depositó en tubos de 1.5 ml y se transportó manteniendo la cadena fría para finalmente guardarse a una temperatura de -78 °C hasta su utilización (Macías et al., 2013).

Toma de biopsias de piel y mucosa oral

Este procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Veterinario de Especialidades en Pequeñas Especies, perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad, contando con apoyo del personal que ahí labora, así como de médicos invitados que cuentan con amplia experiencia en el manejo clínico de especies no convencionales. Para la premedicación, se utilizó el sulfato de atropina a 0.01-0.04 mg/kg IM o IC 10-15 minutos antes de la inducción como apoyo para la prevención de la derivación intracardíaca, típica de los reptiles (Jepson, 2011).

Para la inducción se usó isoflurano al 2-4%, para esto, se adaptó un contenedor de plástico al cual se le conectó la manguera del equipo de anestesia inhalada, posteriormente, se colocó al ejemplar dentro de un tubo de acrílico al que se conectó la misma manguera para terminar con este paso, (Birchard *et* Sherding, 2002). Posterior a esto, se retiró al ejemplar del tubo y se hizo el manejo manipulando al ejemplar directamente de la cabeza, se procedió a intubarlo utilizando una sonda de alimentación para bebés previamente lubricada, para evitar causar daños en las estructuras anatómicas del ejemplar, la cual se adaptó para conectarse con la manguera del equipo de anestesia inhalada.

Para el mantenimiento de la anestesia se utilizó isoflurano al 1.5% y 1 litro de oxígeno por cada 0.3-1 kg de peso del animal (Birchard *et* Sherding, 2002). Una vez que el ejemplar estuvo en el plano anestésico deseado, se procedió a tomar las biopsias de piel y mucosa oral. Se cortó un segmento de aproximadamente 1-2 cm², se buscará retiró la piel con todos los estratos que la conforman, se tomó de la parte dorso-lateral entre el segundo y tercer tercio del cuerpo del ejemplar, para evitar complicaciones en cuanto a cicatrización, irritación e infecciones que pudieran presentarse al tener contacto con alguna superficie abrasiva o sucia cuando el animal reptara. Se realizó una limpieza profunda de la zona, confirmándose que no hubiera sangrado, también se infiltró la zona con un anestésico local, teniendo así una anestesia óptima (Jepson, 2011). Una vez realizado esto, se suturó la piel con un material absorbible, ácido poliglicólico, haciéndose con un patrón de eversión, para permitir el contacto dermis-dermis, y propiciar una buena cicatrización (Birchard *et* Sherding, 2002). La muestra de tejido obtenida fue cortada en varios fragmentos más

pequeños que, después, fueron colocados en reactivo TRIzol (50-100 mg de tejido/ ml de TRIzol) y almacenados con hielo seco hasta que terminó el proceso quirúrgico. Para la biopsia de mucosa oral, se realizó con el apoyo de un dispositivo de acero inoxidable para abrir la boca de la serpiente sin causarle daño alguno, se llevó a cabo un ligero raspado de la mucosa oral con una navaja de bisturí estéril, obteniendo pequeños cortes y controlando los sangrados que aparecían aplicando presión suavemente, el tejido seccionado fue también puesto en TRIzol a la misma proporción que los descritos anteriormente y almacenado con hielo seco, para su transporte hasta el laboratorio donde fueron guardados a -78°C.

Para la recuperación se efectuó ventilación con presión positiva intermitente hasta que se reasumió la respiración espontánea, previamente, se colocó al animal en un ambiente con temperatura óptima, apoyándonos con una placa térmica comercial (Birchard *et* Sherding, 2002; Jepson, 2011). Se suministró tratamiento antibiótico (amikacina 2-4 mg/kg c/72 hrs IM, 3 aplicaciones) y analgésico (ketoprofeno 2-4 mg/kg c/ 48 hrs IM) (Jepson, 2011).

Extracción ARN

Se realizó la extracción del ARN con el EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante:

- 1) Se cortó el tejido en trozos y se trituroó en nitrógeno líquido hasta tener un polvo fino.
- 2) Se añadieron 0,45 ml de buffer RLT para 25-50 mg de tejido, se homogeneizó durante 30 segundos
- 3) Se agregó 1/2 volumen de etanol, y se mezcló por inversión del tubo.
- 4) Se transfirió la solución a la columna colocada en un tubo de colección de 2 ml. Fue centrifugado a $12,000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente, y se desechó el sobrenadante.

- 5) Se agregaron 0,5 ml de solución RW a la columna, se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.
- 6) Se agregaron 0.5 ml de solución Universal RPE a la columna, se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.
- 7) Se centrifugó la columna a $12,000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- 8) Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregaron 50 μ l de agua libre de RNasas. Se mantuvo a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- 9) Se guardó el ARN eluido a -80°C .

Tratamiento con DNasa I

Se utilizó la DNasa I, de Invitrogen, con número de catálogo 18068-015. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se colocaron en un tubo los siguientes elementos:

- 1 μ g de muestra de RNA.
- 1 μ l de Buffer de Reacción de DNasa I 10X
- 1 μ l de Dnasa I
- Cpb 10 μ l de agua tratada con DEPC

Se incubó la reacción 15 minutos a temperatura ambiente y se inactivó la DNasa adicionando 1 μ l de EDTA 25 mM (pH 8), proporcionado en el kit y se calentó la muestra por 10 minutos a 65°C .

Reacción de retrotranscripción

Este procedimiento se llevó a cabo mediante el uso del kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, de Invitrogen, con número de catálogo 18080-051. Se elaboró la reacción como indica el protocolo del kit, usando las siguientes cantidades de

reactivos para cada tubo (se usaron 4 tubos en total, 2 para muestras de ARN extraído de piel y 2 para el obtenido a partir de mucosa oral):

Tabla 1. Preparación de reacción para primer paso de RT-PCR.

Componente	Cantidad
Hasta 5 µg de RNA total	n µl
Primer (específicos del gen o 50 µM de oligo dT)* * Se usó 1 tubo con primer oligo dT y 1 tubo con primer específico del gen para cada muestra (4 en total).	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
Agua tratada con DEPC	cpb 10 µl

Se incubó a 65 °C por 5 minutos, posteriormente, se dejó en hielo al menos 1 minuto. Se preparó la siguiente mezcla para síntesis, añadiendo cada componente en el orden indicado a continuación, esto para cada reacción:

Tabla 2. Segundo paso de preparación de reacción de RT-PCR.

Componente	Cantidad	Control -
10X buffer RT	2 µl	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl	4 µl
0.1 M DTT	2 µl	2 µl
RNasa out	1 µl	1 µl

SuperScript III RT	1 µl	-
Agua tratada con DEPC	-	1 µl

Se añadieron 10 µl de esta mezcla de síntesis a los tubos del paso anterior (ARN, primers, etc.), se mezcló gentilmente y se colectó por centrifugación posteriormente. Una vez hecho esto, se incubaron los tubos a 50°C durante 50 minutos, la reacción culminó con una temperatura de 85°C por 5 minutos, se recuperaron los tubos y se dejaron enfriar en hielo. Tras una breve centrifugación, se añadió 1 µl de RNasa H a cada tubo y se dejaron incubarse a 37°C por 20 minutos. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su uso.

Iniciadores utilizados

Mediante un alineamiento múltiple realizado en el servidor MUSCLE de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), disponible en internet, se buscaron regiones conservadas en las secuencias reportadas previamente de catelicidinas para 7 especies de serpientes, cuatro vipéridos: *Crotalus durissus terrificus* (cascabel tropical asutral), *Lachesis muta rhombeata* (cascabel muda, pucarara, shushupe), *Bothrops lutzi* (jararaca pintada) y *Bothrops atrox* (jergón, mapanare); y tres elápidos: *Bungarus fasciatus* (krait bandeada), *Naja atra* (cobra china) y *Ophiophagus hannah* (cobra real) (Falcao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008), disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). La identidad y especificidad de las secuencias conservadas encontradas se confirmó mediante una búsqueda Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Se determinó utilizar varios juegos de iniciadores para lograr amplificar los fragmentos de interés. El primer par que se utilizó consistió en modificar los utilizados por Falcao *et al.*, en 2014, quedando de la siguiente manera:

- FW: AAG GGT TCT TCT GGA AGA CCT KGC TGG
- K=G/T
- RV: TTA GAA GGG GAW GGW GAC CCC GAT GAC

- $W = A/T$

Con este juego se esperaba la obtención de una banda de entre 566-581 pares de bases, tomado en cuenta el sitio donde comienza el iniciador FW. Se diseñó un segundo iniciador reverse que, al llevar a cabo la reacción en conjunto con el iniciador FW mostrado anteriormente, amplificaría un fragmento 88 pares de bases más corto, es decir, entre 478-493 pares de bases, esto se hizo con la finalidad de corroborar la identidad del fragmento amplificado, la secuencia del iniciador fue la siguiente:

- RV2: AAY TTC TTG AAC CGC TTG ACC C

- $Y = C/T$

Las características de los iniciadores diseñados fueron evaluadas con el servidor Oligo Analyzer (Integral DNA Technologies, IDT®) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) disponible en la web.

Amplificación por PCR

Se realizó el protocolo de touch down PCR (modificado de Falcao *et al.*, 2014), como se muestra en la figura 1.

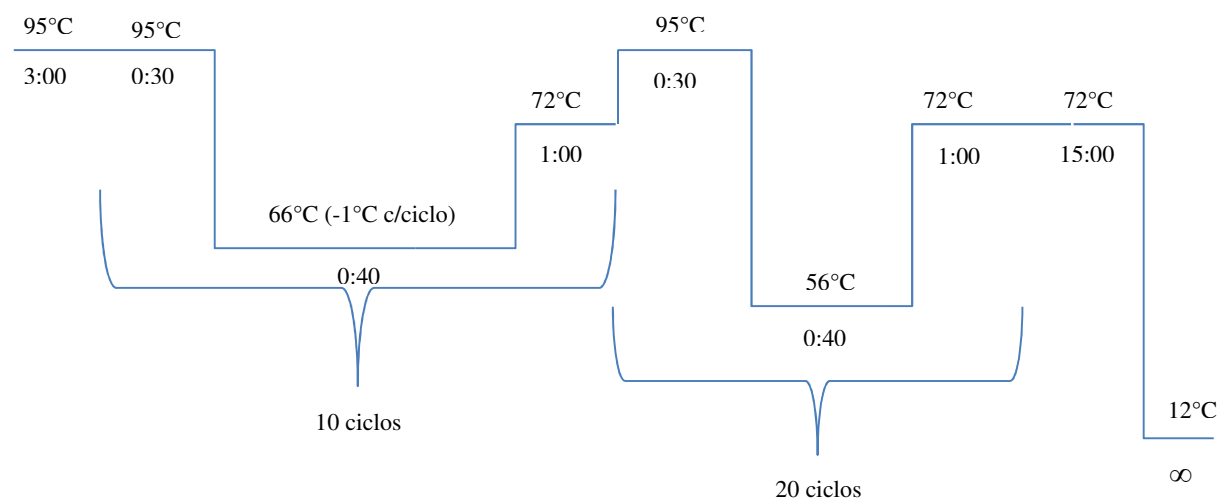


Figura 1. Protocolo de TD-PCR utilizado.

Se usaron iniciadores para actina, utilizados por Wang *et al.*, en el 2008, bajo las mismas condiciones de PCR, como control de la reacción. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Purificación de bandas

Se realizó utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante:

- 1.- Se cortó el gel de agarosa usando una navaja de bisturí.
- 2.- Se pesó la rebanada de gel en un tubo y se añadieron tres volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel (300 µl de buffer por cada 100 mg de gel).
- 3.- Se incubó a 50°C por 10 minutos, con vortexeo cada 2-3 minutos, hasta que el gel se disolviera por completo.
- 4.- Se añadió 1 volumen de isopropanol por volumen de gel, y se mezcló.
- 5.- Se colocó la muestra en una columna QIAquick y en un tubo de colecta provistos en el kit y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm (todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo con la misma aceleración).
- 6.- Se descartó el sobrenadante, la columna fue puesta nuevamente en el tubo colector y se añadieron 500 µl de Buffer QG, se centrifugó 1.
- 7.- Para realizar el lavado, se descartó el sobrenadante y se añadieron 750 µl de Buffer PE a la columna, se dejó reposar 5 minutos y se centrifugó por 1 minuto.
- 8.- Se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar la columna sobre el tubo de colecta por 1 minuto.
- 9.- Se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml.
- 10.- Se eluyó el ADN de la columna utilizando 40 µl del Buffer EB, se dejó reposar 3 minutos y se centrifugó por 1 minuto.

11.- Se cuantificó el ADN en Nanodrop 2000 y se almacenó el ADN a -20°C hasta su utilización.

Secuenciación de producto de PCR

Se enviaron 120 ng de producto de PCR mezclados con 10 pmolas de oligo en un volumen final de 16 µl, como se especifica en los requerimientos de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM a donde fueron enviadas las muestras.

Una vez recibidos los archivos, se analizaron y se editaron en el programa BioEdit, a las secuencias resultantes se les realizó una búsqueda BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmar identidad. Tomando estas secuencias se diseñaron un par de iniciadores más seleccionando regiones que no estuvieran presentes en las isoformas de catelicidinas más pequeñas reportadas en el NCBI para la crotalicidina (catelicidina de *Crotalus durissus*), con la finalidad de lograr la amplificación de fragmentos específicos que pudiéramos clonar, usando las herramientas bioinformáticas como se describió anteriormente. Las secuencias de los iniciadores fueron las mostradas a continuación:

- FW2: GAC GAG GAG GTG GAG AAG GAG AAG G (se obtendría un amplicón de 161 pares de bases en conjunto con el iniciador RV).
- RV3: CCT TCT CCT TCT CCA CCT CCT CGT C (amplificaría un fragmento de aproximadamente 427-443 pares de bases al realizarse la reacción con el iniciador FW).

Tras llevar a cabo el mismo protocolo de amplificación por touch down PCR, se procedió a la purificación de banda siguiendo los procedimientos del kit mencionado anteriormente, y se continuó con la clonación.

Clonación

Para desarrollar este apartado se utilizó el TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing de Invitrogen. Para hacer la reacción de clonación se buscó una relación molar 1:3(inserto:vector) y se colocaron los reactivos como se describe a continuación:

Tabla 3. Preparación de reacción de clonación.

Reactivo	Volumen
Producto de PCR fresco	0.5-4 µl
Solución Salina	1 µl
Agua	el volumen necesario para 5 µl
Vector TOPO®	1 µl
Volumen Final	6 µl

Se mezcló gentilmente la reacción y se incubó a 23°C durante 30 minutos. Se colocó en hielo y se procedió con la transformación de células One Shot ® TOP 10 competentes.

1.- Se añadieron 2 µl de la reacción de clonación a un vial de células *E. coli* químicamente competentes y se mezcló levemente.

2.- Se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos.

3.- Se calentó el tubo con las células a 42°C durante 30 s, sin agitación.

4.- Se añadieron 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente.

5.- Se dejó incubando horizontalmente 1 h en agitación (200 rpm) a 37°C.

6.- Se colocaron 125 µl en placas de agar LB con ampicilina (50 µg/ml) y se esparcieron con asa de cristal. Se dejaron las placas incubando toda la noche a 37°C.

7.- Se revisaron las placas y se sembró la mitad de cada UFC seleccionada en otra placa de agar LB con ampicilina, la otra mitad fue colocada en tubos con agua libre de nucleasas y se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos, posteriormente, fueron evaluadas

con el mismo protocolo de PCR mencionado antes, utilizando los juegos de iniciadores (FW-RV3 y FW2-RV) usados para obtener las bandas que fueron clonadas posteriormente. Se corrieron las reacciones en un gel de agarosa y se visualizó que estuvieran presentes los insertos del tamaño deseado.

8.- Las colonias que resultaron positivas se colocaron en un tubo Falcon con 5 ml de medio LB con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron en agitación (200 rpm) toda la noche a 37°C.

Extracción de plásmido

Se realizó con el uso del Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System, siguiendo el protocolo indicado a continuación:

1.- Se centrifugó el cultivo bacteriano durante 5 minutos 10,000 g. Se desechó el sobrenadante y se puso el tubo invertido sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de medio.

2.- Se añadieron 250 µl de solución de resuspensión de células y se resuspendió el pellet de células en por vortexeo.

3.- Se añadieron 250 µl de solución de lisis celular y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. Se incubó hasta que la suspensión se aclarara (4 minutos).

4.- Se agregaron 10 µl de solución de proteasa alcalina y se mezcló por inversión del tubo en 4 ocasiones, se incubó por 5 minutos.

5.- Se agregaron 350 µl de solución de neutralización e inmediatamente se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces.

6.- Se centrifugó el lisado de bacterias a 14,000 g durante 10 minutos.

7.- Se transfirió el lisado a una de las columnas del kit, evitando llevar el pellet con el sobrenadante.

8.- Se centrifugó por 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.

9.- Se añadieron 750 µl de solución de lavado, previamente disuelta con etanol al 95%, se centrifugó a máxima velocidad a temperatura ambiente por un 1 minuto y se descartó el sobrenadante.

10.- Se repitió el proceso usando 250 µl de la solución de lavado.

11.- Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos a temperatura ambiente.

12.- Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml y se eluyó el ADN plasmídico adicionando 100 µl de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto.

13.- Se cuantificó la concentración de ADN mediante el uso de Nanodrop 2000 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Secuenciación de plásmido

Se enviaron 500 ng de ADN plasmídico en un volumen final de 16 µl y se solicitó que se usaran los iniciadores T7 como forward y el M13 reverse. Se recibieron los archivos y fueron evaluados y editados mediante el uso del programa BioEdit, una vez que se obtuvieron las secuencias consenso de ambos insertos, se juntaron en un documento para tener la secuencia completa del transcrito amplificado desde un inicio.

Análisis bioinformáticos

Se realizó una búsqueda BLAST para confirmar la identidad de la secuencia completa y observar el porcentaje de homología con las secuencias previamente reportadas para otras especies de serpientes. Mediante el uso de los servidores Translate tool de ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) y EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) (Rice *et al.*, 2000), se llevó a cabo la predicción de marcos de lectura abiertos.

Posteriormente, se procedió a hacer un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en el servidor Clustal Omega de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011), utilizando las previamente reportadas de catelicidinas de las especies mencionadas anteriormente,

además, se añadió la correspondiente a la serpiente marina *Hydrophis cyanocinctus* (Wei *et al.*, 2015).

Usando los servidores Pfam de EMBL-EBI (<https://pfam.xfam.org/>) (El-Gebali *et al.*, 2019) y SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic y Bork, 2017) se predijo el dominio que se tendría en la secuencia peptídica, también se mostró una predicción del péptido señal. Por medio del servidor SignalP 4.1 (DTU Bioinformatics) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen, 2017) se realizó la predicción del péptido señal, reconociendo la longitud y el sitio de escisión.

Mediante el uso de las herramientas Peptide Cutter de ExPASy (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) (Gasteiger *et al.*, 2005) y AMPA (Antimicrobial Sequence Scanning System) (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) (Torrent *et al.*, 2009; Torrent *et al.*, 2012) se predijeron los sitios de escisión usando la configuración de elastasa de neutrófilos y la región con mayor probabilidad de presentar actividad antimicrobiana, respectivamente, también se hicieron análisis usando la herramienta de Prediction of Antimicrobial Peptides del servidor CAMP_{R3} (Collection of Anti-Microbial Peptides) (http://www.camp3.bicnirrh.res.in/predict_c/) (Waghu *et al.*, 2015) para predecir regiones con actividad antimicrobiana dentro de péptidos. Utilizando el servidor ProP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>) (Duckert *et al.*, 2004), también se predijeron dos posibles sitios de escisión más, además se obtuvo nuevamente la información sobre la ubicación del péptido señal. Tras seleccionar un posible péptido maduro, se evaluaron posibles secuencias más cortas que pudieran presentar una buena actividad antimicrobiana, basándonos en los resultados de los análisis descritos.

Se obtuvieron datos sobre las posibles características de los péptidos empleando las herramientas de ProtParam Tool de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) y Peptide Property Calculator de INNOVAGEN (<https://pepcalc.com/>) y su estructura secundaria utilizando el servidor HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) (Gautier *et al.*, 2008), donde también se obtuvieron datos sobre su hidrofobicidad, momento hidrofóbico, carga neta y el acomodo de los aminoácidos en la estructura de α -hélice.

Se mandaron sintetizar dos péptidos, el péptido maduro predicho y el seleccionado, más corto, a partir de los análisis puntualizados en párrafos previos. Ambos péptidos se solicitaron con el extremo C-terminal amidado.

RP-HPLC de veneno de *C. aquilus*

Este proceso se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química. Se trabajó con veneno de la especie de *C. aquilus*, para cada inyección se usaron 100 µg de proteína, utilizando como solución A: agua/TFA al 0.1 %, y como solución B: acetonitrilo/ TFA 0.09% , con un flujo de 1 ml/minuto, en una columna C18, 4.6x250 mm, aplicando un gradiente lineal 1.6%, de 0-100% de solución B. Posteriormente, para ajustar la pendiente y realizar una mejor separación, se trabajó con un gradiente lineal 0.65%, de 0-59% de solución B. La absorbancia fue monitoreada a 210 nm.

Ensayos antimicrobianos

Se trabajó con tres cepas de laboratorio *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; además se evaluaron cepas de los mismos géneros y especies de bacterias obtenidas de aislados clínicos humanos. Este procedimiento se realizó siguiendo los estándares aprobados por el CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio, por sus siglas en inglés), contenidos en los manuales M07 (Métodos para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen aeróbicamente) y M100 (Estándares de rendimiento para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana), para el método de microdilución en caldo.

Preparación de los péptidos y antibióticos

Los péptidos fueron sintetizados, posteriormente, fueron analizados y purificados por HPLC y espectrometría de masas, teniendo una pureza del 98%, determinando su identidad por la respuesta de los iones de la secuencia primaria de aminoácidos. Esto según las especificaciones de la empresa fabricante Peptide 2.0. Los péptidos llegaron liofilizados y fueron reconstituidos en agua estéril y alicuotados en tubos con una concentración de 1 mg/ml.

Inmediatamente, se preparó un stock con la concentración de 512 µg/ml, y se realizaron dobles diluciones seriadas para tener las concentraciones de 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 µg/ml, siguiendo las recomendaciones de los manuales mencionados anteriormente sobre el rango a evaluar. Se colocaron 50 µl de cada una de las diluciones preparadas en los pozos de una microplaca, teniendo el doble de la concentración deseada a evaluar, que sería diluida 1:2 con el inóculo bacteriano, por lo que las dosis a evaluar estarían en el rango de 0.125-256 µg/ml, para cada uno de los péptidos. La misma acción se llevó a cabo para preparar las concentraciones de antibióticos a evaluar, siendo, en este caso, ampicilina y gentamicina. Cada dilución fue colocada para hacer la evaluación por triplicado. Las microplacas se guardaron en refrigeración hasta ser utilizadas una vez preparados los inóculos bacterianos.

Preparación de los inóculos

Se prepararon los inóculos mediante el método de suspensión directa de colonia, esto se logró seleccionando colonias aisladas de placas de agar no selectivo, que se dejaron incubando entre 18-24 hrs, haciendo las suspensiones en solución salina estéril al 0.85%. Se ajustó la turbidez a la equivalente al estándar 0.5 de McFarland (valores de absorbancia entre 0.08-0.12 a 625 nm en el espectrofotómetro), lo que daría un aproximado de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Tras tener las suspensiones ajustadas en ese punto, se realizaron las diluciones en caldo Mueller-Hinton necesarias para obtener una cantidad aproximada de 1×10^6 UFC/ml, de este último paso se tomaron 50 µl que se añadieron a cada pozo de la placa (haciendo una dilución 1:2) con las diferentes concentraciones de los péptidos y los antibióticos, teniendo un total de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/ml como concentración final para el ensayo en cada pozo, esto según las indicaciones del manual M07 del CLSI, el inóculo fue agregado en un margen de 15 minutos posterior a haberse estandarizado.

Se utilizaron también controles con caldo estéril y 50 µl de agua estéril (a la que se le añadirían 50 µl de inóculo bacteriano), esto también se realizó por triplicado. Las microplacas fueron selladas con plástico film y se incubaron a 37°C por 20 horas, se colocaron en la incubadora dentro de los 15 minutos subsiguientes a la adición del inóculo a los pozos de la placa.

En la tabla 4 se muestra el diseño experimental general, indicando la distribución de los componentes en la microplaca: en azul, péptido 1 (completo) o, en su caso, ampicilina; en verde, péptido dos (fragmento) o, si correspondía, gentamicina.

Tabla 4. Diseño experimental de ensayos antimicrobianos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Caldo estéril	Agua + Inóculo	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
B	Caldo estéril	Agua + Inóculo	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
C	Caldo estéril	Agua + Inóculo	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
D	0.25 μg/ml	0.125 μg/ml	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
E	0.25 μg/ml	0.125 μg/ml	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
F	0.25 μg/ml	0.125 μg/ml	256 μg/ml	128 μg/ml	64 μg/ml	32 μg/ml	16 μg/ml	8 μg/ml	4 μg/ml	2 μg/ml	1 μg/ml	0.5 μg/ml
G	0.25 μg/ml	0.25 μg/ml	0.25 μg/ml	0.125 μg/ml	0.125 μg/ml	0.125 μg/ml						
H												

Se completaron dos placas por cepa bacteriana, una para evaluación de ambos péptidos y una más, para los ensayos con los antibióticos.

Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada ensayo se determinó comparando la turbidez de los pozos control con aquellos que tenían las moléculas con posible efecto antimicrobiano (antibióticos o péptidos) de cada placa utilizada para cada microorganismo evaluado. Este procedimiento se hizo primero a simple vista y,

posteriormente, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 655 nm en un lector de placas. La CMI se reportó como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento de microorganismos, tal como lo define el CLSI. Se calcularon la media aritmética y la desviación estándar para los valores de absorbancia dados tras la lectura de la placa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras las extracciones de ARN se obtuvieron los siguientes resultados:

- Extracción a partir de muestra de piel:
 - Concentración: 157.8 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.64
- Extracción a partir de mucosa oral:
 - Concentración: 25.3 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.92

Una vez realizado el protocolo de retrotranscripción y la cuantificación correspondiente, se obtuvo esta información:

- A partir de ARN de piel con OligodT:
 - Concentración: 1242.5 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.80
- A partir de ARN de piel con primer específico del gen:
 - Concentración: 1187.7 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.83
- A partir de ARN de mucosa con OligodT:
 - Concentración: 1177.1 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.83
- A partir de ARN de mucosa con primer específico del gen:
 - Concentración: 1119.7 ng/μl
 - Relación 260/280: 1.83

Tras el touch down PCR con los juegos de iniciadores FW-RV se obtuvieron bandas ligeramente por encima de los 500 pares de bases, tanto en las muestras de piel (OligodT y

primer específico de gen) como de mucosa (OligodT y primer específico de gen) (Figura 2). Una vez realizado el protocolo reacción semianidada de los amplicones obtenidos previamente, usando el juego de iniciadores FW-RV2, se observó una banda de entre 400 y 500 pares de bases (Figura 3), coincidiendo con los resultados esperados tras el diseño y elección de iniciadores para amplificar los transcritos específicos.

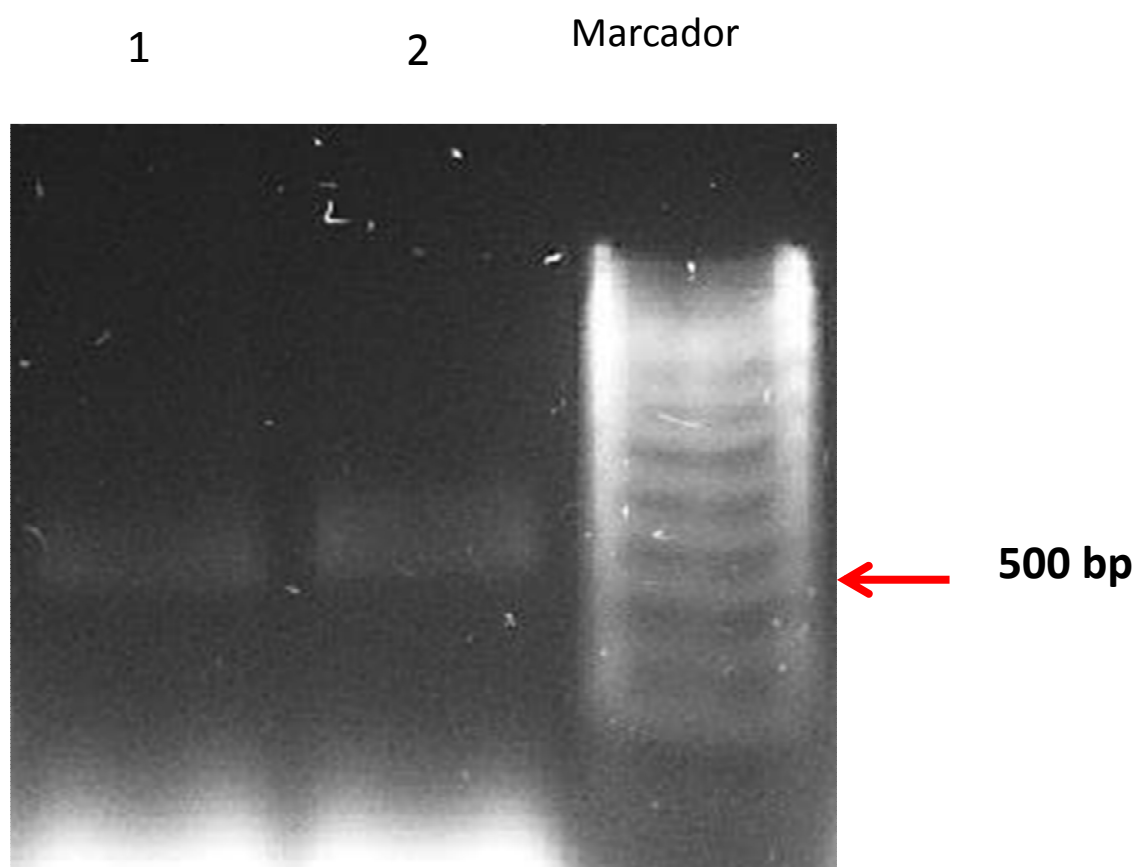


Figura 2. Gel de electroforesis tras protocolo de TD-PCR. Se observa la amplificación de bandas por encima de los 500 pares de bases, se muestra el resultado de la PCR a partir de ADNc obtenido de las muestras de mucosa oral. 1) Banda obtenida tras reacción con ADNc obtenido con Oligo dT de ARN extraído de mucosa oral 2) Banda obtenida tras reacción con ADNc obtenido con primer específico de gen del ARN extraído de mucosa oral.

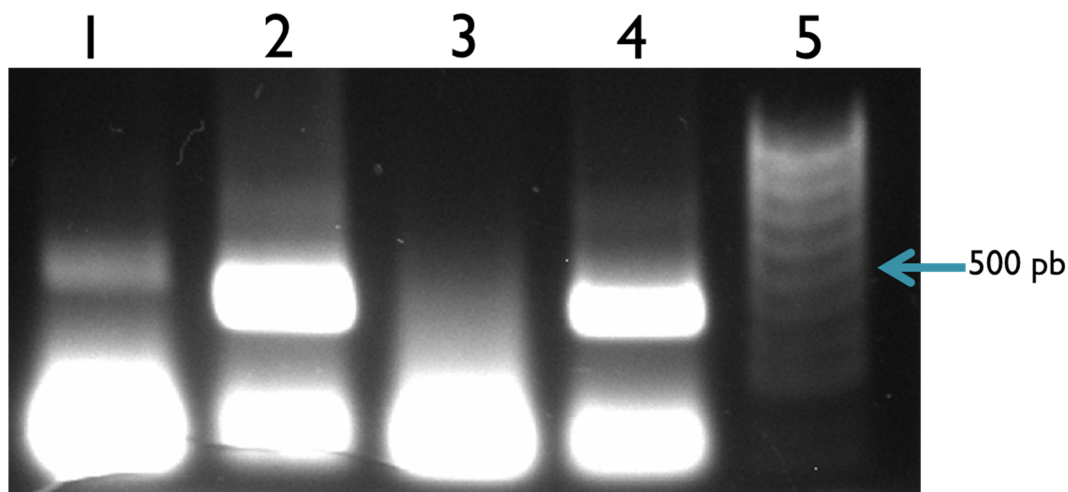


Figura 3. Bandas obtenidas a partir del protocolo de PCR semianidado. 1) Amplificación con el primer juego de iniciadores a partir de la muestra de mucosa oral, 2) Semianidado de la muestra 1, se esperaba una banda de aproximadamente 88 pares de bases menos que la descrita al principio, 3) Amplificación con el primer juego de iniciadores a partir de la muestra de mucosa oral, 4) Semianidado muestra 2, 5) Marcador de peso molecular.

Mediante el uso de los juegos de iniciadores FW2-RV y FW-RV3 y, la posterior evaluación de las colonias, que contenían los fragmentos de interés clonados, en el gel de electroforesis, se obtuvieron bandas menores a las 200 pb (Figura 4), siendo 161 pb el tamaño esperado tras el diseño de los iniciadores; se lograron amplificaciones apenas por debajo de las 500 pb (Figura 5), siendo que el resultado esperado era entre 427-443 pares de bases, basándonos en la secuencia reportada por Falcao et al., para *C. durissus*.

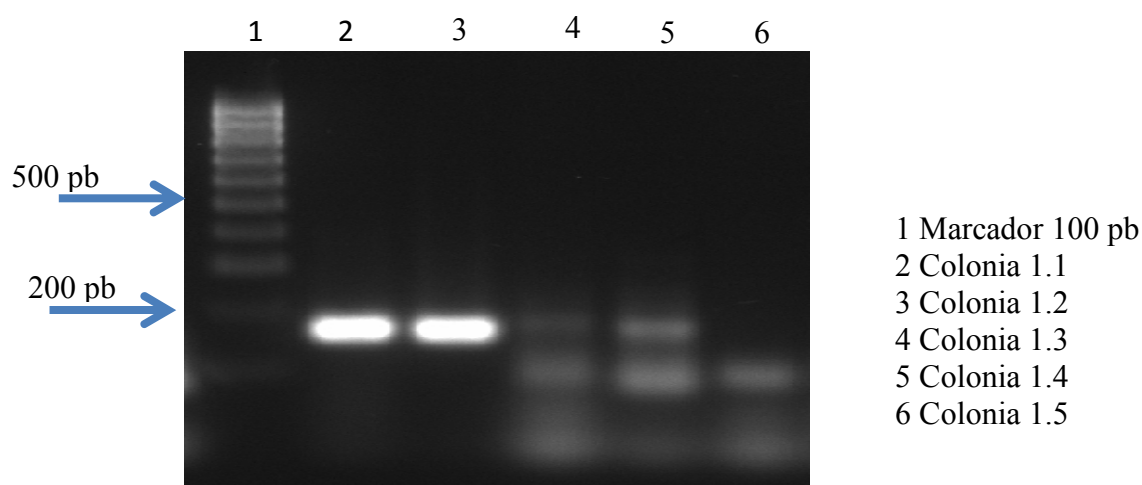


Figura 4. Evaluación de las colonias tras el proceso de clonación, se esperaba una banda de 161 pares de bases.

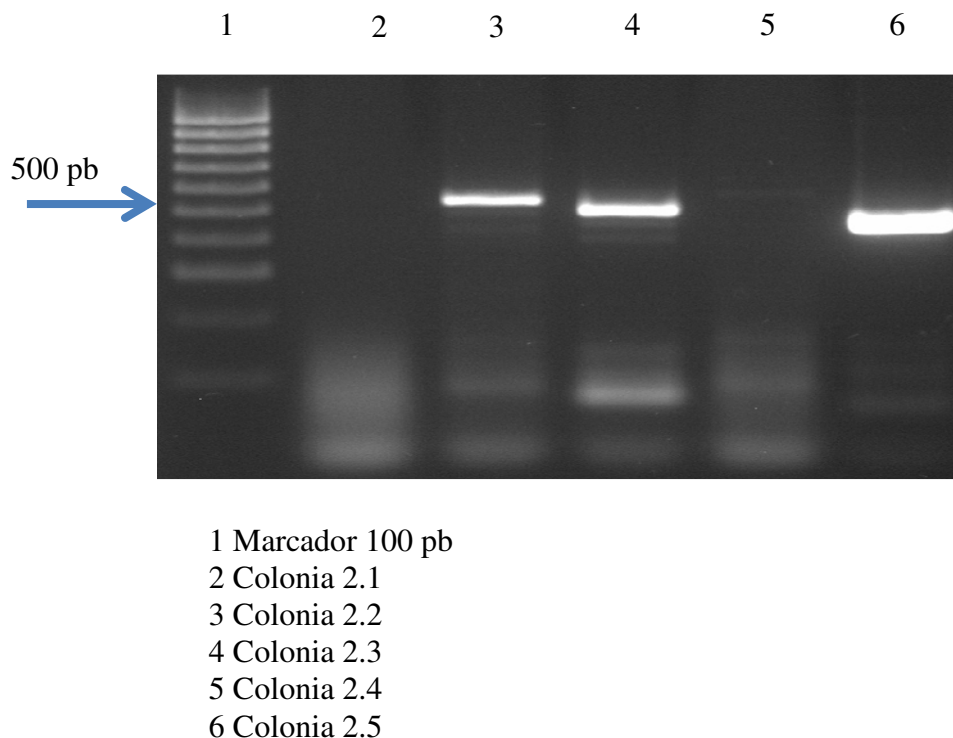


Figura 5. Evaluación de las colonias tras el proceso de clonación del fragmento más grande. Se esperaban bandas entre los 427 y los 443 pares de bases.

Tras el análisis y la edición, se obtuvo una secuencia de 566 pares de bases, coincidente con el tamaño reportado para otras especies de serpientes, cuyo rango está entre 555-585 pares de bases; (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015), considerando que los iniciadores utilizados no comienzan en el codón de inicio del transcrito, es decir, harían falta 4 nucleótidos para tener la secuencia completa, la cual constaría de 570 pares de bases, tamaño exacto de las reportadas para las especies *B. lutzi* y *B. atrox* (Falcao *et al.*, 2014). El análisis BLAST mostró una alta homología con secuencias para cateligidinas de serpientes reportadas, siendo principalmente parecida a la reportada por Falcao *et al.*, para las especies de *Crotalus durissus* y *Lachesis muta rhombeata* (95% de homología cubriendo el 100% de la secuencia evaluada) (Figura 6). La predicción de marcos de lectura abiertos en los servidores Translate tool (Figura 7) y Transeq (Figura 8) mostró una secuencia de 187 aminoácidos, coincidiendo nuevamente para los tamaños reportados para otras especies, los cuales comprenden entre 184 y 194 residuos (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015), una vez más,

considerando la falta de los primeros nucleótidos, es muy posible que se pudieran tener un par de aminoácidos más en la región N-terminal del propéptido, es decir, debería haber un total de 189 residuos para el precursor completo, tamaño que sería igual a los reportados para *B. lutzi* y *B. atrox* (Falcao *et al.*, 2014). La predicción en ambos servidores arrojó como resultado la misma secuencia de aminoácidos en el tercer marco de lectura abierto.



Figura 6. Resultados de la búsqueda BLAST, se observa un alto grado de homología con otras secuencias de catelicidinas reportadas para otras especies de serpientes.

La predicción del péptido señal en los servidores SignalP (Figura 9), ProP 1.0 y SMART (Figura 10) fue coincidente, siendo 20 aminoácidos de la región N-terminal los que conforman esta estructura, habiendo una escisión entre una alanina y una histidina, lo cual ha sido reportado antes para propéptidos de catelicidina de serpientes, cuyos péptidos señal oscilan entre los 20-22 aminoácidos, con un sitio de escisión entre alanina/prolina e histidina (Falcao *et al.*, 2014), para otras especies esta estructura comprende 30 residuos (Dürr *et al.*, 2006), hay que mencionar que la secuencia evaluada por nosotros carece de dos aminoácidos al inicio, que también formarían parte del péptido señal, cuyo tamaño predicho sería entonces de 22 aminoácidos.

```

aagggttcttctggaagaccttgctggtggtggcgctctgcgggacccccgcctccctcgcc
  G F F W K T L L V V A V C G T P A S L A
cacggccctgagctacggggaagccctggagctggccgtgagcatctacaacggcaag
  H R P L S Y G E A L E L A V S I Y N G K
gcgggcgaggcgctccctctaccgcctcctggaggccgttcctcagctcgagtgggatccc
  A G E A S L Y R L L E A V P Q L E W D P
agttctgagggcagtcacagctgaacttcaccctcaaggagacggcggtgccagctggaa
  S S E G S Q Q L N F T L K E T A C Q L E
gaagaacgttccctggaggaatgcggcttccaagaagacggggtggtcctggagtgcaca
  E E R S L E E C G F Q E D G V V L E C T
ggctactatttcttggagagacgccccgggtggtcgtcctctcctgtgtatctgtggac
  G Y Y F F G E T P P V V V L S C V S V D
gtaatggaggaggaggaggagccgaaggcagaggcgagaaacgacgaggaggtggagaag
  V M E E E E E P K A E A E N D E E V E K
gagaagggggacaaggagaaggaccagcccaaacgggtcaagcggttcaagaaatttttc
  E K G D K E K D Q P K R V K R F K K F F
aagaaagtcaagaaaagcgtgaagaagcggtcaagaaaatcttcaagaagccgatggtc
  K K V K K S V K R L K K I F K K P M V
atcggggtctccttcccttctaa
  I G V S F P F -

```

Figura 7. Predicción del marco de lectura abierto mediante el servidor de Translate tool. Se muestra la secuencia de nucleótidos sobre la de aminoácidos, indicando los codones correspondientes a cada aminoácido, el guion representa el codón de paro.

```

>EMBOSS_0019_3
GFFWKTL LVVAVCGT PASLAHRPLSYGEALELAVSIYNGKAGEASLYRLL EAVPQLEWDP
SSEGSQQ LNFILKETACQLEEEERSLEE CGFQEDGVVLECTGY YFFGETPPVVVLSCVSD
VMEEEEEPKAEAE NDEEVEKEKGDKEKDQPKRVKRFKKFFKVKKSVKKRLKKIFKKPMV
IGVSFPF*

```

Figura 8. Predicción de marco de lectura abierto con el servidor EMBOSS-Transeq. Se muestran los aminoácidos en clave de una letra y se observa el codón de paro indicado con un asterisco (*).

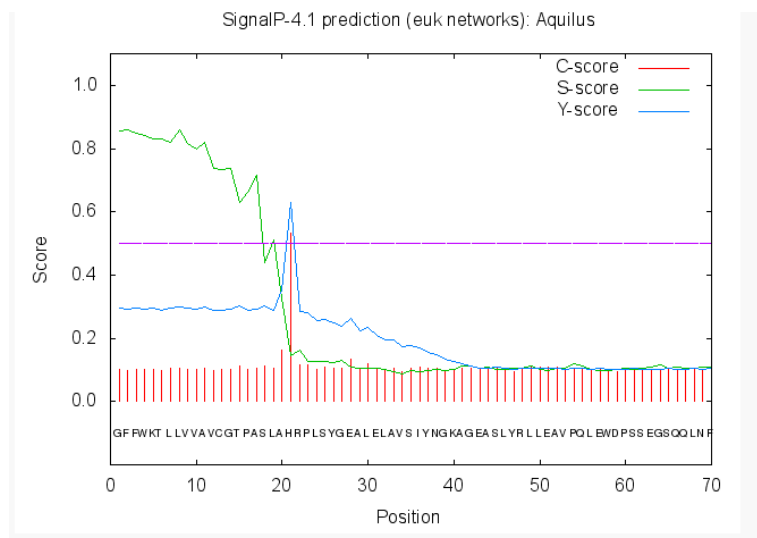


Figura 9. Predicción del péptido señal mediante el servidor SignalP.

Tras utilizar los servidores Pfam y SMART se detectó la presencia del dominio de catelicidinas (cathelin), que comprendería del residuo 22 al 121 (Figura 10), conformándose de 100 aminoácidos, este dominio está presente en todos los propéptidos reportados para esta familia de péptidos, teniendo un tamaño similar, coincidiendo, además, el inicio y el final del dominio con las demás secuencias para otras especies de serpientes (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015), el tamaño también es similar al del dominio la catelicidina humana, que consta de 101 residuos de aminoácidos (Dürr *et al.*, 2006). En la región correspondiente al dominio cathelin, se observó la presencia de 4 cisteínas conservadas (Figura 14), que forman dos puentes disulfuro intermoleculares, estructura característica en moléculas de este tipo en especies como serpientes, aves, bovinos, porcinos y humano (Wang *et al.*, 2008). Posterior a este dominio conservado, se encuentra una región aniónica hipervariable, rica en residuos de glutamato, que es característico de los precursores de catelicidinas de reptiles, que puede contener entre 25-37 residuos (Wang *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014), teniendo en este caso 29 aminoácidos (Figura 14); y que se había caracterizado previamente en precursores de péptidos de anfibios, siendo localizados, justamente, entre el dominio y el péptido maduro (Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008), la probable función de esta zona puede estar relacionada con la neutralización de la carga neta de los péptidos maduros, impidiendo un efecto del precursor proteico (Wang *et al.*, 2008); se sugiere que también tiene una función en el plegamiento del propéptido, facilitando su almacenamiento en los gránulos de secreción (Tomasinsig y Zanetti, 2005).

El análisis en AMPA mostró una región por debajo del umbral de 0.25, lo que indica una posibilidad fuerte de ser una región con actividad antimicrobiana del aminoácido 155 al 185 (Figura 11), pudiendo representar una zona que abarque del péptido maduro, la gráfica y la secuencia tienen un alto grado de similitud para las evaluadas por Falcao *et al.*, presentando mayor grado de homología con las de las especies *Crotalus durissus terrificus* y *Lachesis muta rhombeata*.

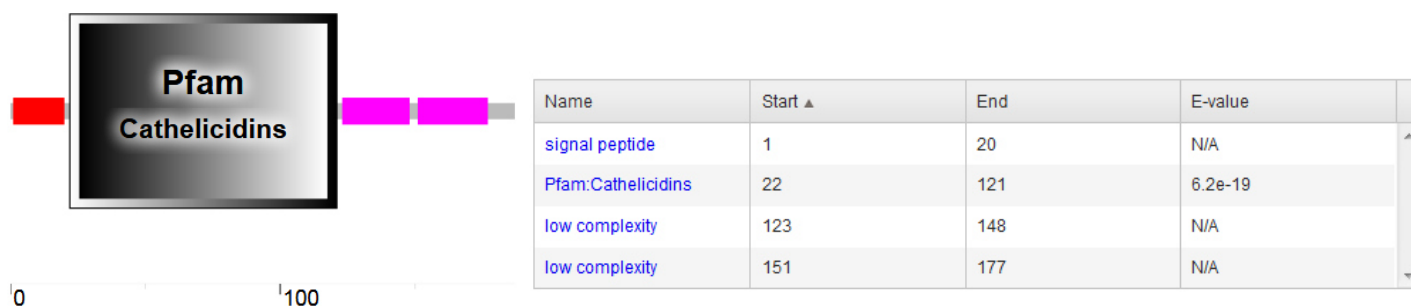


Figura 10. Resultado de la predicción de dominio por el servidor SMART, mostrando el perteneciente a la familia de las catelicidinas (Pfam), en rojo se observa el péptido señal y en rosa las regiones de baja complejidad.

AMPA result

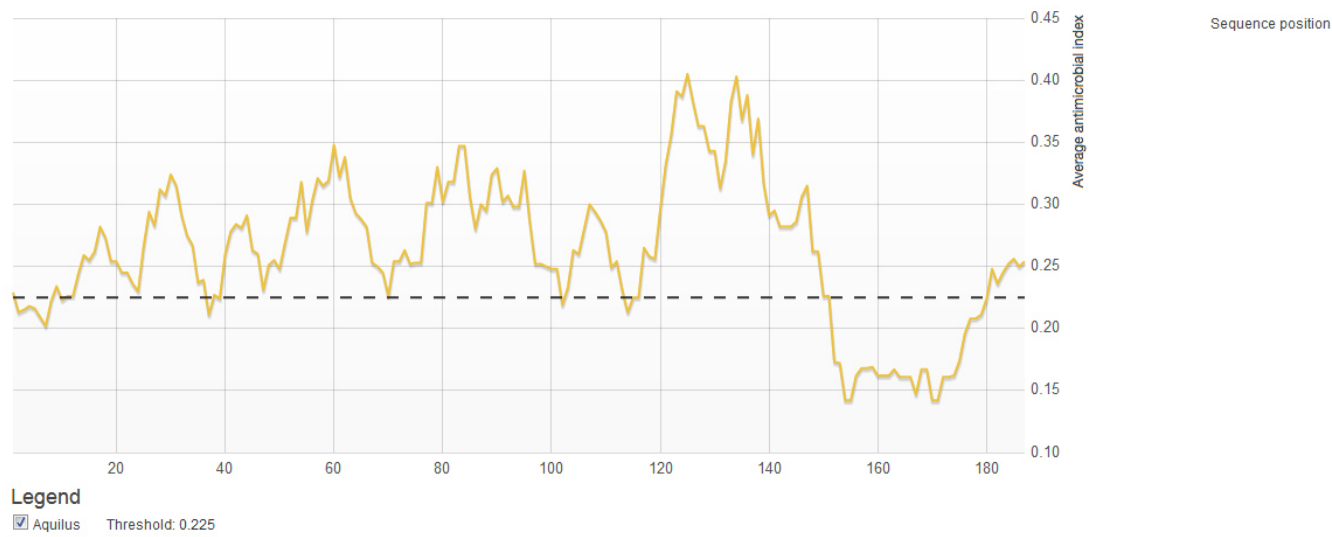


Figura 11. Predicción de la región con actividad antimicrobiana mediante el servidor AMPA.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las catelicidinas son procesadas por elastasas para liberar el péptido maduro, siendo los residuos de valina y alanina los más sensibles a la actividad de estas enzimas (Shinnar *et al.*, 2003), se analizó la secuencia de aminoácidos en PeptideCutter con la configuración de elastasa de neutrófilo, prediciendo varios sitios de escisión, entre ellos, uno en la valina 153 de la secuencia, considerando los 2 aminoácidos que faltan al inicio del propéptido, se tendría que el sitio exacto de corte por elastasa sería en la posición 155. En otras catelicidinas de serpientes, el sitio predicho de escisión se encuentra en la valina 150 (Pt-CRAMP 1 y 2), 155 (Batroxicidina y Lutzicidina), 160 (Crotalicidina y Lachesicidina) (Falcao *et al.*, 2014), 157 (Catelicidina-BF, OH-CATH y NA-CATH) (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) y 153 (Hc-CATH) (Wei *et al.*, 2015), lo que haría coincidente la predicción de la secuencia evaluada por nosotros con las demás que se han reportado, liberando en todos los casos un péptido maduro de 34 aminoácidos, incluyendo el estimado por nosotros en este trabajo. Este sitio de escisión por elastasas, cortando en un residuo de valina, es muy conservado en péptidos de peces, aves y mamíferos (Shinnar *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2006), sin embargo, para el caso de la catelicidina de *Bungarus fasciatus* (Catelicidina BF), donde se aisló el péptido a partir de veneno mediante una serie de fraccionamientos cromatográficos, se encontró que

Catelicidina BF estaba conformada únicamente por 30 aminoácidos, pudiendo deberse a dos razones: 1) el péptido de 34 residuos sufre un procesamiento adicional o 2) el sitio de escisión no es precisamente la valina 157, considerando que hay catelicidinas que son procesadas por otro tipo de enzimas (Wang *et al.*, 2008), tal es el caso de la LL-37 que es liberada tras la acción de la proteasa-3 (Sorensen *et al.*, 2001). Asimismo, tras notar el elevado grado de similitud entre el precursor de Catelicidina BF y Hc-CATH (*Hydrophis cyanocinctus*), se predijo que compartían sitio de procesamiento, por lo que el péptido maduro analizado por Wei *et al.*, solo consta de 30 residuos. En nuestro caso, teniendo en cuenta la predicción en el servidor de AMPA y el sitio de escisión por elastasa en PeptideCutter, se determinó que la catelicidina madura de *Crotalus aquilus* consta de 34 aminoácidos, siendo la secuencia la siguiente: KRFKKFFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVSFPF, la cual se compone por 13 lisinas, 2 argininas, 6 fenilalaninas, 4 valinas, 2 prolinas, 2 serinas, 2 isoleucinas, 1 leucina, 1 glicina y 1 metionina; conteniendo un total de 15 residuos básicos, que le otorgan una carga neta de +15 (+16 si se toma la amidación en la parte C-terminal). No contiene residuos ácidos (glutamato y aspartato), como en la mayoría de las catelicidinas de serpientes (Zhao *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015) a excepción de la Catelicidina BF que presenta un residuo de glutamato en su secuencia (Wang *et al.*, 2008); las catelicidinas de serpientes con 34 aminoácidos presentan una carga neta entre +13 y +16, siendo +15 lo más frecuente (De Latour *et al.*, 2010; Falcao *et al.*, 2014). La catelicidina de *C. aquilus* tiene un peso de 4171.32 Da, y un punto isoeléctrico de 12.09 (asciende a 14 con el extremo C-terminal amidado), según lo estimado con el servidor Peptide Property Calculator; para los péptidos reportados de 34 aminoácidos, el peso calculado oscila entre 4151.38-4258.35 Da y el punto isoeléctrico entre 12.04-12.50 (Falcao *et al.*, 2014), las características predichas del péptido de la víbora de cascabel oscura de Querétaro entran dentro de estos rangos. En la figura 12 se muestra el acomodo que tendrían los aminoácidos en la configuración de α -hélice. Tras el análisis BLAST del péptido maduro, se encontró que coincide en un 97.06% con la isoforma 2 de la catelicidina de *Crotalus durissus* y la catelicidina de *Lachesis muta*, difiriendo de estas en un solo aminoácido, una fenilalanina por una isoleucina en el primer caso y una serina en lugar de una treonina en el segundo; estas variaciones se encuentran en las posiciones 32 y 31 del péptido maduro, respectivamente). En cambio, en

comparación con la isoforma 3 reportada para *C. durissus*, aquella a la que se le evaluó su actividad antimicrobiana, difiere en un par de aminoácidos (teniendo las dos variaciones descritas anteriormente), observándose una similitud del 94.11%, siendo estos péptidos, reportados por Falcao *et al.*, con quiénes se tuvo mayor grado de homología.

Otras características importantes a considerar en los péptidos antimicrobianos son su índice de hidrofobicidad y el momento hidrofóbico, ya que esto, aunado a la carga neta y la predisposición a adoptar una forma helicoidal, influye en la efectividad que pueden tener, así como en el grado de citotoxicidad que presenten (Dathe y Wieprecht, 1999). El índice hidrofóbico de las catelicidinas de serpientes se encuentra entre 0.172-0.393, mientras que el momento hidrofóbico tiene valores entre 0.357-0.483 (Falcao et al., 2014), la catelicidina de *C. aquilus* mostró un índice de hidrofobicidad de 0.254 y un momento hidrofóbico de 0.440, lo que es muy similar a lo reportado para las viperidinas (Falcao et al., 2014).

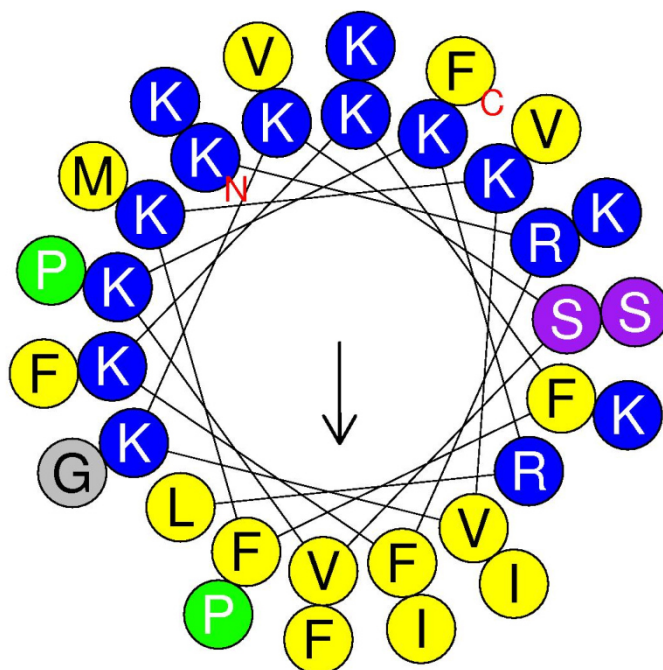


Figura 12. Organización en α-hélice predicha para la catelicidina de *C. aquilus* en el servidor HeliQuest, se muestran los aminoácidos básicos en azul, en amarillo los no polares y en morado los polares, la flecha indica la cara hidrofóbica de la hélice.

Aunque muchas de las catelicidinas de serpientes han demostrado tener poca actividad hemolítica y citotóxica, se han evaluado fragmentos o análogos de las mismas buscando conservar su actividad antimicrobiana y disminuir los efectos no deseados en

células sanas de mamíferos, varios péptidos derivados han sido diseñados y analizados con esta finalidad, haciendo modificaciones desde fragmentar los péptidos para tener estructuras de menor tamaño, sustituir aminoácidos y utilizar residuos no naturales, cambiando las características físico-químicas de estas moléculas (De Latour *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2015; Falcao *et al.*, 2015). Con la finalidad de obtener un péptido más pequeño que fuera más sencillo de sintetizar, más económico y que no perdiera su potencial actividad antimicrobiana, se seleccionó un péptido de 23 aminoácidos, que representa una región conservada entre las catelicidinas de *C. aquilus*, *C. durissus* y *L. muta* (Falcao *et al.*, 2014), siendo esta secuencia: FFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVI (Figura 13), esto se logró tras los análisis bioinformáticos descritos en la sección de metodología, basándonos en la secuencia predicha por AMPA, en el análisis en el servidor CAMP3, utilizando tres diferentes algoritmos en este último, y en uno de los sitios de escisión mostrados tras la evaluación en el servidor Prop 1.0, que indicaba un posible sitio de corte, provocado por proteasas tipo furina, entre residuos de lisina y arginina, en la posición 158 de la secuencia del propéptido (160 si se considera la adición de los dos aminoácidos faltantes), abarcando desde el residuo 159 al 181, o del aminoácido 6 al 28 del péptido maduro. Este péptido tiene un peso molecular de 2848.72 Da, una carga neta de +11 (+12 con el extremo C-terminal amidado), punto isoeléctrico teórico de 11.56, un índice hidrofóbico de 0.232 y un momento hidrofóbico de 0.536; teniendo características similares a los péptidos Catelicidina-BF y Hc-CATH, pero que están conformados por 30 aminoácidos, ambos péptidos fueron sumamente eficientes al ser evaluados contra distintas cepas de microorganismos, presentaron buena estabilidad en suero y poca capacidad hemolítica y citotóxica (Wang *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2015); por lo que al poseer propiedades físico-químicas similares, se consideró un buen candidato para ser evaluado, tomando en cuenta que nunca antes se había analizado la actividad de esa zona.

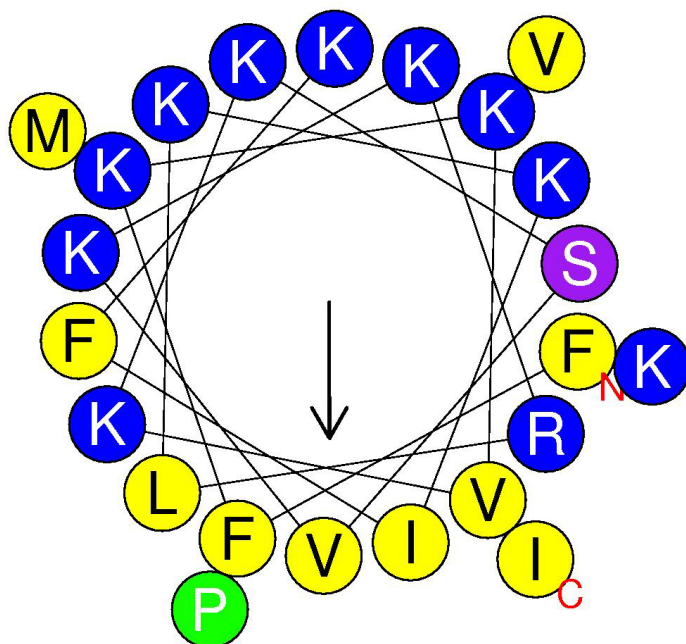


Figura 13. Organización en α -hélice predicha para el péptido de 23 aminoácidos, de la región conservada de las catelicidinas de *C. aquilus*, *C. durissus* y *L. muta*, en el servidor HeliQuest, se muestran los aminoácidos básicos en azul y en amarillo los no polares, la flecha indica la cara hidrofóbica de la hélice

Para la predicción de la estructura tridimensional del péptido maduro, basándonos en el alto grado de homología presentado con el péptido reportado para *Crotalus durissus*, se obtuvo una estructura que, en su mayor parte, representa una hélice alfa (residuos 3-21), y que termina con una región no estructurada (22-34), muy similar al péptido mencionado anteriormente (Falcao *et al.*, 2015).



Figura 14. . Alineamiento múltiple de secuencias de los precursores de catelicinas de serpientes realizado en el servidor Clustal Omega. La secuencia de *Crotalus aquilus* está subrayada con color amarillo para facilitar su ubicación. Se muestran los aminoácidos con el código de colores: rojo, no polares; verde, polares; azul, residuos ácidos; rosa, residuos básicos. Los asteriscos indican residuos conservados. El péptido señal se muestra encerrado en un cuadro, subrayado con línea azul, el dominio cathelin; las flechas señalan las cisteínas conservadas del dominio cathelin; la llave en color morado muestra la región aniónica hipervariable, donde se marca, en rectángulo rojo, la presencia de una glicina que únicamente aparece en las secuencias del género *Crotalus*; la línea punteada anaranjada señala los péptidos maduros de 34 aminoácidos.

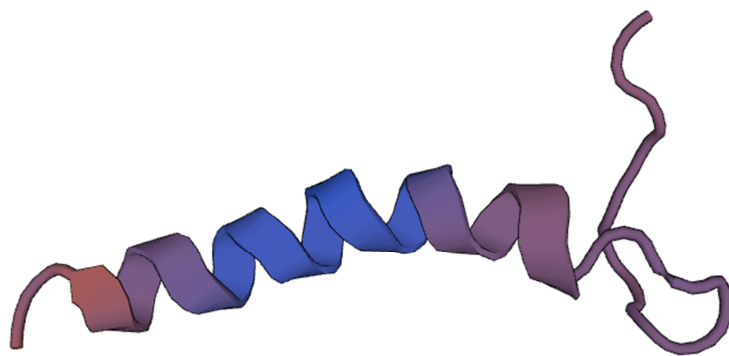


Figura 15. Posible estructura tridimensional del péptido maduro, basándonos en la homología con el péptido de *C. durissus*.

Los cromatogramas del veneno completo y de la Fracción 3 obtenida por FPLC (Hernández-Arvizu, 2016) mostraron la presencia de varios picos (Figuras 16 y 17), aunque al realizar la comparación entre ambas muestras se nota una ausencia de gran cantidad de cromóforo en una zona en específico (Figura 18), tras ajustar la pendiente se observó una separación más precisa (Figura 19), sin embargo, aún hicieron falta estrategias para un mejor abordaje y poder encontrar aquella fracción donde pudiera localizarse el péptido. En el estudio realizado por Wang *et al.*, en el 2008, aislaron la catelicidina-BF del veneno de *Bungarus fasciatus*, utilizando columnas de exclusión molecular, de intercambio catiónico y de fase reversa en HPLC; entre cada proceso se evaluó la actividad antimicrobiana de los picos observados. La catelicidina-BF en el protocolo de fase reversa, eluyó con una concentración menor a 50% de acetonitrilo y tuvo un tiempo de retención mayor a los 40 minutos (Wang *et al.*, 2008), por lo que esperaríamos que el péptido de *C. aquilus* pudiera aislarse tras llevar a cabo procesos con condiciones similares.

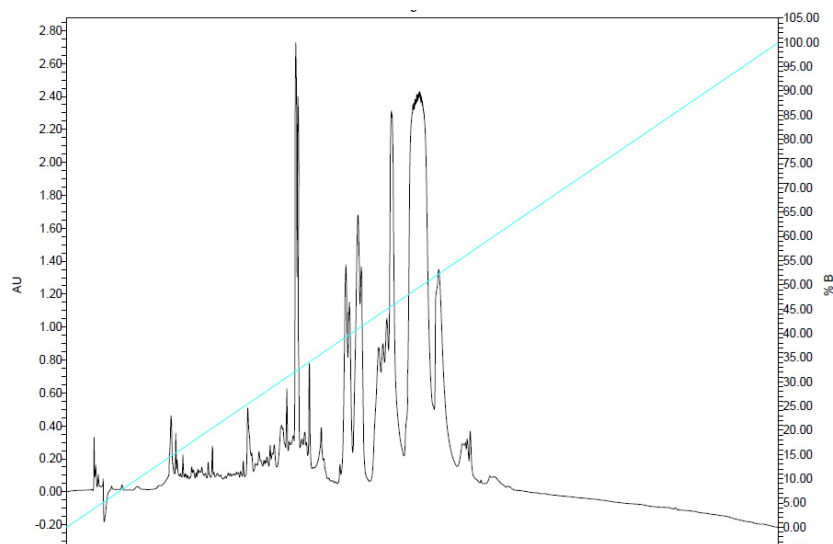


Figura 16. Cromatograma de veneno completo, gradiente 0-100% de solución B.

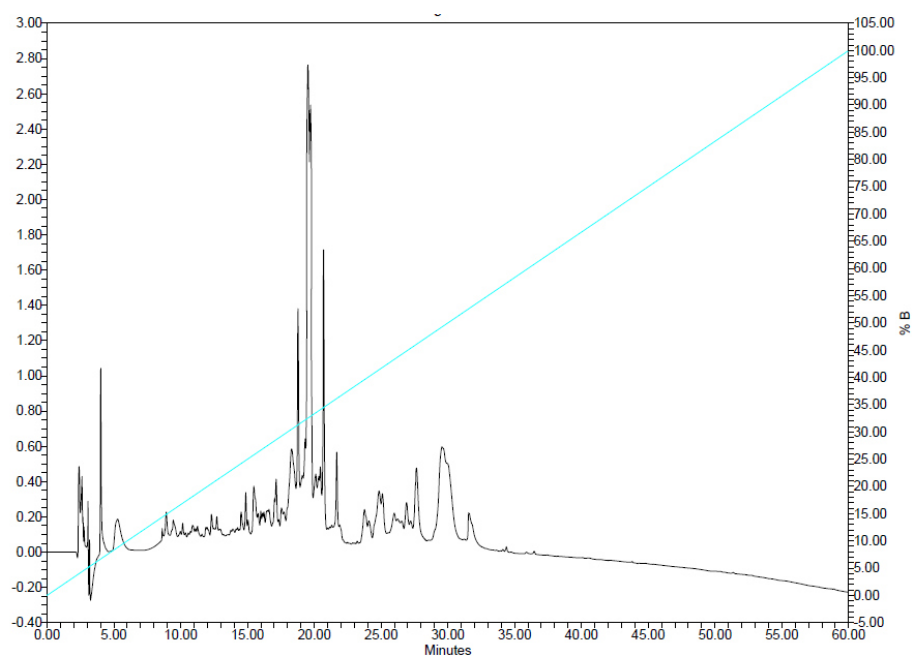


Figura 17. Cromatograma de la fracción 3 obtenida por FPLC (Hernández-Arvizu, 2016), gradiente 0-100% de solución B.

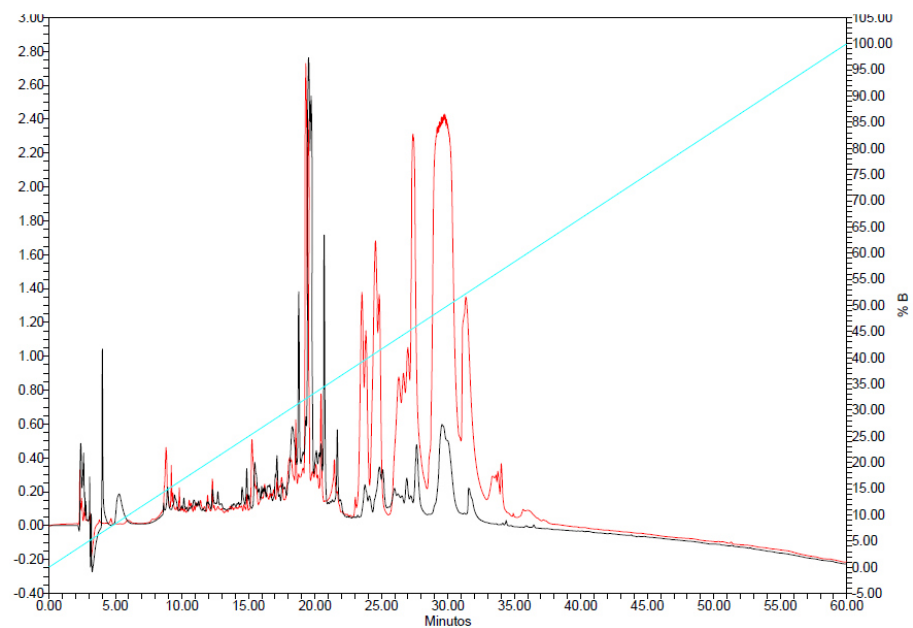


Figura 18. Comparación entre los cromatogramas del veneno completo (en rojo) y la fracción 3 obtenida por FPLC (negro).

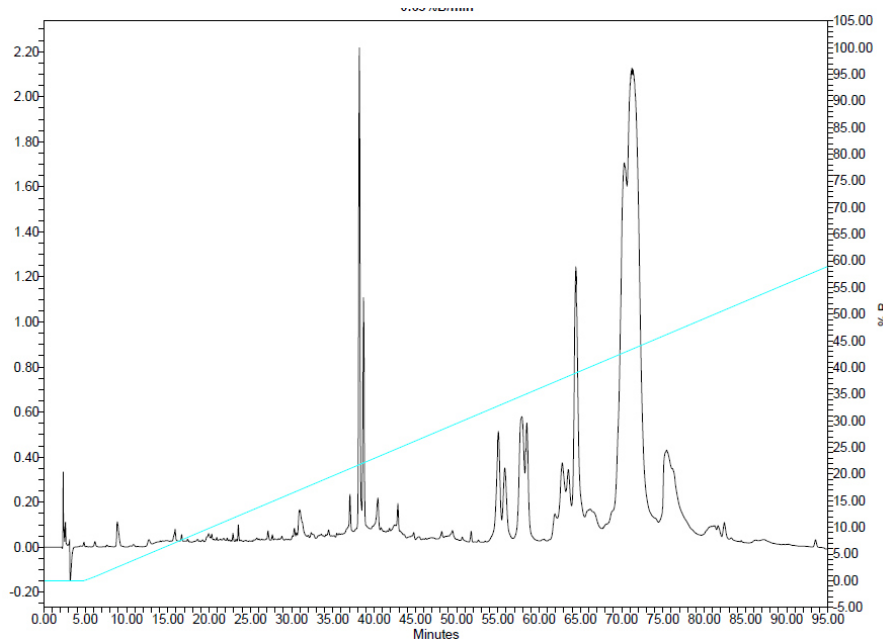


Figura 19. Cromatograma del veneno completo, tras ajustar el gradiente de 0.65-59% de solución B.

Se muestran las absorbancias obtenidas tras los ensayos de actividad antimicrobiana y la lectura a longitud de onda de 655 nm en el lector de microplacas para los ensayos con las cepas de laboratorio de *E. coli* TOP10 (Tabla 5), *S. aureus* ATCC6538 (Tabla 6) y *P. aeruginosa* (Tabla 7); para las cepas de aislados clínicos (AC) de *E. coli* (Tabla 8), *S. aureus* (Tabla 9) y *P. aeruginosa* (Tabla 10); se enlistan las lecturas reportadas para cada repetición (se realizó por triplicado), la media aritmética de los tres valores y la desviación estándar. Según el CLSI, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como “la menor concentración de agente antimicrobiano que evite completamente el crecimiento visible de un microorganismo”, esto se determinó haciendo la comparación de los valores obtenidos de los pozos que contenían únicamente el inóculo con el agua estéril, con los de los pozos que contenían solamente el caldo Mueller Hinton estéril y los de los pozos de cada una de las concentraciones evaluadas de péptidos y antibióticos con el inóculo bacteriano.

Tabla 5. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de *E. coli*. TOP10.

<i>E. coli</i> TOP10	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	1	0.125	2	2
1	0.034	0.131	0.065	0.037	0.036	0.033
2	0.03	0.111	0.066	0.03	0.033	0.032
3	0.032	0.116	0.06	0.036	0.034	0.033
Media aritmética	0.032	0.119333333	0.063666667	0.034333333	0.034333333	0.032666667
Desviación estándar	0.002	0.01040833	0.00321455	0.003785939	0.001527525	0.00057735

Tabla 6. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de *S. aureus* ATCC6538.

<i>S. aureus</i> ATCC6538	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	0.5	0.125	8	4
1	0.034	0.165	0.027	0.032	0.029	0.029
2	0.03	0.146	0.035	0.032	0.017	0.016
3	0.044	0.143	0.035	0.033	0.033	0.031
Media aritmética	0.036	0.151333333	0.032333333	0.032333333	0.026333333	0.025333333
Desviación estándar	0.007211103	0.011930353	0.004618802	0.00057735	0.008326664	0.008144528

Tabla 7. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	1	0.125	4	4
1	0.032	0.271	0.033	0.024	0.033	0.031
2	0.029	0.219	0.032	0.028	0.031	0.03
3	0.029	0.253	0.04	0.031	0.032	0.032
Media aritmética	0.03	0.247666667	0.035	0.027666667	0.032	0.031
Desviación estándar	0.001732051	0.02640707	0.004358899	0.003511885	0.001	0.001

Tabla 8. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de *E. coli*.

<i>E. coli</i> AC	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	256	0.125	4	4
1	0.035	0.217	0.035	0.029	0.031	0.039
2	0.031	0.24	0.034	0.03	0.033	0.031
3	0.03	0.225	0.031	0.028	0.032	0.033
Media aritmética	0.032	0.227333333	0.033333333	0.029	0.032	0.034333333
Desviación estándar	0.002645751	0.011676187	0.002081666	0.001	0.001	0.004163332

Tabla 9. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> AC	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	0.125	0.125	8	4
1	0.037	0.213	0.036	0.033	0.039	0.039
2	0.038	0.203	0.035	0.031	0.03	0.029
3	0.031	0.217	0.035	0.038	0.033	0.032
Media aritmética	0.035333333	0.211	0.035333333	0.034	0.034	0.033333333
Desviación estándar	0.003785939	0.007211103	0.00057735	0.003605551	0.004582576	0.005131601

Tabla 10. Absorbancias obtenidas tras lectura a 655 nm para la cepa de aislado clínico de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i> AC	Caldo estéril	Inóculo + Agua	Ampicilina	Gentamicina	Péptido 34	Péptido 23
CMI µg/ml	-	-	256	0.125	4	8
1	0.021	0.513	0.043	0.033	0.07	0.053
2	0.02	0.516	0.02	0.034	0.04	0.058
3	0.03	0.531	0.035	0.03	0.065	0.068
Media aritmética	0.023666667	0.52	0.032666667	0.032333333	0.058333333	0.059666667
Desviación estándar	0.005507571	0.009643651	0.011676187	0.002081666	0.016072751	0.007637626

En la tabla 11 se resumen los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los dos péptidos y los dos antibióticos evaluados. Los resultados se muestran a concentraciones de $\mu\text{g/ml}$. Para el caso de la catelicidina completa de *C. aquilus* la actividad inhibitoria se dio a concentraciones de entre 2-8 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de todas las cepas, siendo las dos de *S. aureus* las que requirieron una mayor concentración de péptido para que se inhibiera su crecimiento. En el caso del péptido de 23 aminoácidos, correspondiente a una región conservada en las catelicidinas de *C. durissus*, *L. muta* y *C. aquilus*, las concentraciones mínimas inhibitorias estuvieron en el rango de 2-4 $\mu\text{g/ml}$ para todas las cepas evaluadas. Si bien, en la mayoría de los casos, la ampicilina inhibió el crecimiento bacteriano a concentraciones de 0.125-1 $\mu\text{g/ml}$, para los aislados clínicos de *E. coli* y *P. aeruginosa* se reportó la inhibición solamente a la concentración más alta evaluada (256 $\mu\text{g/ml}$), por lo que, según lo indicado en las tablas del manual M100 del CLSI, se clasificarían como resistentes a la acción de este antibiótico. Todas las cepas evaluadas fueron susceptibles a la acción de la gentamicina, cuyo rango de actividad se presentó entre las dos concentraciones más bajas evaluadas 0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$.

La capacidad de ambos péptidos (34 y 23 aminoácidos) para inhibir el crecimiento, si bien las cepas contra las que se ha probado la actividad antimicrobiana no son las mismas y los protocolos pudieron llevarse a cabo bajo distintas condiciones experimentales, puede compararse con los registros para otras catelicidinas de serpientes o sus análogos, por ejemplo, ambos péptidos tuvieron actividad inhibitoria contra las dos cepas de *E. coli* a dosis de 2-4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que las viperidinas analizadas (crotalicidina y batroxidina) contra la cepa de *E. coli* ATCC25922 tuvieron actividad a 0.25 $\mu\text{g/ml}$, mismo caso que la OH-CATH, Pt-CRAMP1 inhibió a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$; aunque para la cepa del aislado clínico todas estas catelicidinas tuvieron efecto a 16 $\mu\text{g/ml}$ (Falcao *et al.* 2014). Hc-CATH inhibió el crecimiento de *E. coli* ATCC25922 a una concentración de 2.34 $\mu\text{g/ml}$, mientras que las cepas de aislados clínicos de esta bacteria fueron susceptibles a este péptido en rangos comprendidos entre 2.34-9.38 $\mu\text{g/ml}$ (Wei *et al.*, 2015). OH-CATH30, péptido derivado de la catelicidina de *O. hannah*, formado por 30 aminoácidos únicamente, inhibió a las cepas de *E. coli* (ATCC25922 y aislados clínicos) entre 3.125-12.5 $\mu\text{g/ml}$, (Li *et al.*, 2012). En el caso de la Catelicidina-BF, ante cepas de *E. coli*, tanto la ATCC25922 como las cepas de aislados clínicos, el crecimiento se vio

inhibido en rangos de 0.6-2.3 $\mu\text{g/ml}$ (Wang *et al.*, 2008). Para la actividad contra *P. aeruginosa*, los dos péptidos de *C. aquilus* tuvieron buena actividad contra ambas cepas evaluadas a concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, a su vez, las viperidinas registraron CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa ATCC27853, OH-CATH requirió la mitad de esa concentración, mientras que Pt-CRAMP1 registró la inhibición a 8 $\mu\text{g/ml}$; en el caso de la evaluación ante la cepa clínica, fueron entre 16-32 $\mu\text{g/ml}$ (Falcao *et al.*, 2014). Hc-CATH presentó efecto contra *P. aeruginosa* ATCC27853 a dosis de 18.75 $\mu\text{g/ml}$, para una de las cepas clínicas evaluadas requirió 37.50 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, al evaluarse ante otro aislado clínico su actividad inhibitoria no fue eficiente a concentraciones menores de 200 $\mu\text{g/ml}$ (Wei *et al.*, 2015). OH-CATH30, tuvo acción ante las distintas cepas de *P. aeruginosa* a dosis de entre 6.25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$, considerando cepas de aislados clínicos y la ATCC27853 (Li *et al.*, 2012). Las concentraciones mínimas inhibitorias de la Catelicidina-BF contra *P. aeruginosa* estuvieron en el rango de 1.2-18.7 $\mu\text{g/ml}$, considerando la cepa ATCC27853 y tres cepas de aislados clínicos resistentes a ampicilina y bencilpenicilina (Wang *et al.*, 2008). Para las cepas de *S. aureus*, tanto la ATCC6538 como el aislado clínico, el péptido de 34 aminoácidos registró una concentración mínima inhibitoria de 8 $\mu\text{g/ml}$, en ambos casos, mientras que el péptido de 23 tuvo actividad con solo 4 $\mu\text{g/ml}$, para ambas cepas. Las bacterias Gram positivas requieren, en muchas ocasiones, concentraciones medias o elevadas de catelicidina para inhibir su crecimiento, tal es el caso de las cepas de *S. aureus* ATCC29213 y una proveniente de aislado clínico, que mostraron inhibición del crecimiento a dosis entre 32-64 $\mu\text{g/ml}$, con los péptidos crotalicidina, batroxidina, Pt-CRAMP1 y OH-CATH (Falcao *et al.*, 2014); Hc-CATH tuvo efectividad a 4.69 $\mu\text{g/ml}$ contra dos cepas de *S. aureus*, una de ellas ATCC25923 y otra aislado clínico, sin embargo, ante tres cepas más, también aisladas clínicamente, su acción fue eficaz a más de 200 $\mu\text{g/ml}$ (Wei *et al.*, 2015). En el estudio realizado por Wang *et al.*, en el 2008, con Catelicidina BF, únicamente la cepa *S. aureus* ATCC2592 se inhibió con 4.7 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, contra la cepa ATCC25923 y otras más provenientes de aislados clínicos, se observó actividad a dosis sumamente elevadas (entre 75 a más de 400 $\mu\text{g/ml}$), lo que demuestra la poca susceptibilidad que tuvieron ante una de las catelicidinas más potentes que se han caracterizado. En cambio, OH-CATH30 y sus derivados mostraron una buena actividad contra cepas de *S. aureus*: ATCC25923, ATCC43300 MRSA y tres aislados clínicos; a

concentraciones de entre 3.125 a 12.5 $\mu\text{g/ml}$, incluso ante cepas multirresistentes a antibióticos (Li *et al.*, 2012).

Tras lo descrito en el párrafo anterior, se puede decir que los péptidos de *C. aquilus* han demostrado tener un buen efecto en la inhibición del crecimiento de microorganismos, tanto las cepas de laboratorio o estándar, como las provenientes de aislados clínicos humanos, en un rango que puede ser equiparable con lo registrado hasta el momento por parte de otros autores para otras especies de serpientes, considerando que las pequeñas dosis requeridas para lograr las concentraciones mínimas inhibitorias.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (en $\mu\text{g/ml}$) de péptidos y antibióticos contra los microorganismos evaluados.

Microorganismos	CMI Antimicrobiano			
	Péptido 34 aminoácidos	Péptido 23 aminoácidos	Ampicilina	Gentamicina
<i>E. coli</i> TOP10	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<i>S. aureus</i> ATCC6538	8 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<i>P. aeruginosa</i>	4 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<i>E. coli</i> AC	4 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	256 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<i>S. aureus</i> AC	8 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<i>P. aeruginosa</i> AC	4 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	256 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$

Los medicamentos basados en péptidos normalmente se obtienen mediante síntesis química, lo cual representa un alto costo en materia económica, siendo una de las principales desventajas para la inclusión de terapias con péptidos antimicrobianos, se busca trabajar con secuencias más cortas que puedan conservar los efectos deseados de los péptidos parentales (De Latour *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Diversos péptidos derivados de catelicidinas de diferentes especies se han evaluado, BF-15 (conformado por 15 aminoácidos), péptido diseñado a partir de la catelcidina-BF, presentó actividad antimicrobiana a dosis más elevadas, en la mayoría de los casos, que el péptido del cual se

origina (Wang et al., 2008). Una variante de 24 aminoácidos de OH-CATH, considerada como la estructura mínima que pudo tener actividad antimicrobiana, necesitó de elevadas concentraciones para inhibir el crecimiento bacteriano, por su parte OH-CATH30 tuvo un desempeño similar al péptido de 34 aminoácidos, pero con la ventaja de ser menos hemolítico (Zhang et al., 2010). OH-CM6, péptido que carece de los 10 últimos residuos de la región C-terminal de OH-CATH30 con la sustitución de algunos aminoácidos, fue eficiente al doble de concentración que su análogo de 30 residuos contra bacterias Gram negativas, mientras que mantuvo la efectividad, incluso disminuyendo la CMI en un par de cepas de *S. aureus*, ante bacterias Gram positivas; demostrando que la región C-terminal de OH-CATH30 tiene poca influencia en su actividad antimicrobiana (Li et al., 2012). En el estudio realizado por Falcao et al., en 2015, donde se realiza una separación estructural con base en la predicción de un sitio de escisión por elastasa de neutrófilo, se obtuvieron dos fragmentos del péptido crotalicidina (Ctn), uno de catorce aminoácidos, denominado Ctn[1-14] y otro de 20, Ctn[15-34], en la cual, el segundo fragmento demostró tener mejor actividad antimicrobiana a pesar de carecer, en su mayor parte, de una estructura en α -hélice y tener menor carga neta que Ctn[1-14] (+8 de la región C-terminal y +9 de la región N-terminal), si bien se atribuyó la ausencia de actividad antimicrobiana a la baja cantidad de residuos hidrofóbicos que contenía y al bajo nivel de anfipaticidad que presentaba, se argumentó que la mayor actividad bactericida estaba confinada a Ctn[15-34], es decir, a la región C-terminal. Ctn[15-34], de igual manera, fue menos eficiente que la crotalicidina completa de la cual se deriva, sin embargo, ante bacterias Gram negativas mantuvo concentraciones bajas al momento de inhibir su crecimiento, mostrando, además, ser más inocuo que Ctn (Falcao et al., 2015). De Latour et al., en 2010, diseñaron un par de péptidos de 11 aminoácidos basados en motivos repetidos dentro de la secuencia de NA-CATH, la catelicidina de la cobra china (*Naja atra*); con uno de ellos presentando una variación en un par de aminoácidos, uno de ellos ATRA-1, demostró tener buena actividad, comparable con la secuencia original, ante las bacterias *E. coli* y *A. actinomycetemcomitans*. Con el objetivo de encontrar un péptido de menor tamaño que pudiera conservar su potencial actividad antimicrobiana, que facilitara su síntesis y disminuyera el costo, en este trabajo se seleccionó una región de 23 aminoácidos conservada entre las catelicidinas reportadas para *C. durissus* y *L. muta* (Falcao et al.,

2014), que también se encuentra en la descrita por nosotros para *C. aquilus* y, de la cual, no se había evaluado su capacidad hasta la fecha. Este péptido, según las aproximaciones bioinformáticas, conserva gran parte de la estructura helicoidal (del residuo 1 al 15 de su secuencia) y posee 7 aminoácidos conformando su región C-terminal con la configuración de zona no estructurada. La actividad de este péptido fue prácticamente igual a la presentada por su similar de mayor tamaño contra los microorganismos evaluados al momento, siendo incluso más eficiente en los ensayos contra las cepas de *S. aureus*. Cabe resaltar, que esta secuencia se seleccionó tras coincidir en las predicciones de los algoritmos de dos servidores (AMPA y CAMP3), aunado a los resultados del análisis de sus características físico-químicas de carga neta, hidrofobicidad y momento hidrofóbico, buscando que, con menor cantidad de residuos en su secuencia, fueran similares a las que presentan algunas de las catelicidinas que han demostrado tener buen efecto antimicrobiano, poca actividad hemolítica y citotóxica y buena estabilidad en suero, como han sido catelicidina-BF, OH-CATH30 y Hc-CATH (Wang et al., 2008; Li et al., 2012; Wei et al., 2015). La mayoría de los derivados de péptidos presentan cambios importantes en los aspectos descritos anteriormente, por ejemplo la disminución en la carga neta, lo que disminuye su capacidad inhibitoria en comparación con los péptidos parentales de los que provienen. Wei et al., en 2015, sintetizaron análogos de Hc-CATH, sustituyendo residuos de lisina y arginina por alaninas, obteniendo péptidos con cargas de +9 y +6, que fueron menos eficientes que el péptido original, que tenía una carga neta de +12, requiriendo concentraciones de 2-19 veces de lo que necesitó Hc-CATH para mostrar efecto inhibitorio; asimismo, se demostraron que la conformación en α -hélice es de suma importancia para que estos péptidos lleven a cabo su actividad. Atendiendo a los ejemplos citados anteriormente, se establecieron los parámetros para las características físico-químicas de la secuencia corta a elegir: índice de hidrofobicidad no menor a 0.220, carga neta no menor a +10 y momento hidrofóbico mayor a 0.420; así como la importancia de presentar una estructura helicoidal que con una cara hidrofóbica bien definida, como se muestra en la Figura 13. Como resultado, se obtuvo un péptido de un tamaño más conveniente (23 aminoácidos) que, contra los microorganismos evaluados, ha tenido un desempeño prácticamente igual al exhibido por la catelicidina completa (34 aminoácidos), aunque haría

falta realizar experimentos con mayor número de bacterias y otros microorganismos para poder aseverar esto por completo.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (en μM) de péptidos y antibióticos contra los microorganismos evaluados.

Microorganismos	CMI Antimicrobiano			
	Péptido 34 aminoácidos	Péptido 23 aminoácidos	Ampicilina	Gentamicina
<i>E. coli</i> TOP10	0.47 μM	0.70 μM	2.86 μM	0.26 μM
<i>S. aureus</i> ATCC6538	1.91 μM	1.40 μM	1.43 μM	0.26 μM
<i>P. aeruginosa</i>	0.95 μM	1.40 μM	2.86 μM	0.26 μM
<i>E. coli</i> AC	0.95 μM	1.40 μM	732.67 μM	0.26 μM
<i>S. aureus</i> AC	1.91 μM	1.40 μM	0.35 μM	0.26 μM
<i>P. aeruginosa</i> AC	0.95 μM	1.40 μM	732.67 μM	0.52 μM

Al reportar los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias en escala micromolar (μM), lo que permite una comparación más directa de la efectividad teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada uno de los componentes evaluados (De Latour et al., 2010), es notorio el buen rendimiento de ambos péptidos (Tabla 12), siendo, en la mayoría de los casos, más eficientes que la ampicilina que, en 4 de las 6 cepas evaluadas, precisó, como mínimo, más del doble de concentración μM que los péptidos, esto también es muy coincidente con comparaciones de otras catelicidinas y derivados con antibióticos de uso común (Wang et al., 2008; Wei et al., 2015; Falcao et al., 2015). A pesar de ser cepas sumamente susceptibles a la acción por la gentamicina, no representando organismos multirresistentes, se destacan los rangos comprendidos entre 0.47-1.91 μM , de la catelicidina de *C. aquilus*, y 0.7-1.4 μM , de la región de 23 residuos conservada en tres especies de vipéridos, para presentar efecto inhibitorio, valores semejantes a los exhibidos por los péptidos de serpientes citados con anterioridad.

Los resultados obtenidos tras los ensayos antimicrobianos de ambos péptidos, representan un buen indicio de la enorme funcionalidad que pueden llegar a tener, ya sea sirviendo como base para el diseño de nuevos agentes terapéuticos o siendo usados directamente como componentes con efecto antibacteriano. Es prudente recalcar que hace faltar llevar a cabo más experimentos donde se evalúe la actividad de estos péptidos ante otras clases de microorganismos, así como desafiarlos ante cepas que se cataloguen como resistentes a los antibióticos normalmente utilizados, para conocer su verdadero potencial. A su vez, es importante señalar que es necesario someter ambas moléculas a análisis de hemólisis y citotoxicidad, con la finalidad de establecer un índice terapéutico que permita determinar la viabilidad de la catelicidina de la víbora de cascabel oscura de Querétaro y su derivado como posibles candidatos para el tratamiento de enfermedades causadas por organismos resistentes a las terapias con los antimicrobianos actuales.

V. CONCLUSIONES

- Se identificó la catelicidina de *Crotalus aquilus* a partir muestras de piel y mucosa oral, siendo el primer gen de este tipo encontrado en un vipérido endémico del centro de México.
- La secuencia de nucleótidos estaría conformada por 570 pares de bases, lo que daría lugar a un propéptido de 189 aminoácidos, en ambos casos, tomando en cuenta los elementos faltantes no determinados en este trabajo.
- Se confirmó que la catelicidina presenta una estructura similar a las reportadas por otras especies de serpientes, conformándose por un péptido señal, un dominio cathelin, una región aniónica, característica de reptiles y anfibios, y un péptido maduro de 34 aminoácidos, muy similar a los reportados para otros vipéridos sudamericanos.
- La catelicidina de *C. aquilus* y su derivado son altamente eficientes contra las cepas bacterianas evaluadas, evitando su crecimiento a concentraciones de 0.47-1.91 μM y 0.7-1.4 μM , respectivamente; mostrando, en la mayoría de los casos, mejor capacidad inhibitoria que la ampicilina.

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.
- 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 abscess 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.
- 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 anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*; 77:451-9.

Bowdish D.M.E., Davidson D.J., Speert D.P., Hancock R.E.W, The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes, *J. Immunol.* 172 (2004) 3758–3765.

Buchanan- Gibbons. 1974. “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” – 8th Edition- Williams 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. 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.

Dathe, M., Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 71–87.

De Latour, F.A.; Amer, L.S.; Papanastasiou, 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.

Di Nardo A., A.Vitiello, R.L. Gallo, Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide, J. Immunol. 170 (2003) 2274–2278.

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.

Dorschner R.A,V.K. Pestonjamas, S. Tamakuwala, T.Ohtake, J.Rudisill, V. Nizet, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, R.L. Gallo, Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A streptococcus, J. Invest. Dermatol. 117 (2001) 91–97.

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

Duckert Peter, Brunak Søren y Nikolaj Blom. 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Engineering, Design and Selection: 17: 107-112.

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.

Edgar, R.C. 2004.MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797 DOI: 10.1093/nar/gkh340

El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S.R., Luciani A., Potter S.C, Qureshi M., Richardson L.J., Salazar G.A., Smart A., Sonnhammer E.L.L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto. 2019. The Pfam protein families database in 2019. S.C.E, R.D. Finn *Nucleic Acids Research* doi: 10.1093/nar/gky995

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

Falcao CB, De La Torre BG, Pérez-Peinado C, Barron AE, Andreu D, Rádis-Baptista G. 2014. Viperidins: A novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids*;46(11):2561-2571. doi:10.1007/s00726-014-1801-4.

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

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) Hecidin—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.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607

Gautier R., Douguet D., Antonny B. and Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008 Sep 15;24(18):2101-2.

Hancock, R.E.W.; Brown, K.L.; Mookherjee, N. Host defence peptides from invertebrates—Emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 2006, 211, 315–322.

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

Hancock, R.E.; Haney, E.F.; Gill, E.E. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat. Publ. Gr.* 2016, 16.

Heilborn, J.D., Nilsson, M.F., Kratz, G., Weber, G., Sorensen, O., Borregaard, N., Stahle-Backdahl, M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 379–389.

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.

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 Kubly*. McGrawHill. Sexta Edición. Traducción: Palacios Martínez. México, 59-61

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

Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrucker K., Unterberger P., Zaiou M., Lebherz C., Karl A, Raake P., Pfosser A., Boekstegers P.,

Welsch U., Hiemstra P.S, Vogelmeier C., Gallo R.L., Clauss M., Bals R., An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1665–1672.

Kosciuczuk, E.M.; Lisowski, P.; Jarczak, J.; Strzałkowska, N.; Józwik, A.; Horbanczuk, J.; Krzyzewski, J.; Zwierzchowski, L.; Bagnicka, E. Cathelicidins: Family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, 39, 10957–10970.

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.

Letunic Ivica, Bork Peer. 2018. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, Pages D493–D496, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>

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.

Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R.D., Hampton, T.G., Li, J., Sellke, F., Carmeliet, P., Simons, M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis, *Nat. Med.* 6 (2000) 49–55.

Li J, Xu X, Xu C, Zhou W, Zhang K, et al. (2007) Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Mol Cell Proteomics* 6: 882–894.

Lu Y, Ma Y, Wang X, Liang J, Zhang C, et al. (2008) The first antimicrobial peptide from sea amphibian. *Mol Immunol* 45: 678–681.

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.

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.

Nielsen Henrik. 2017. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In Kihara, D (ed): Springer. Protein Function Prediction (Methods in Molecular Biology vol. 1611) pp. 59-73,doi: 10.1007/978-1-4939-7015-5_6

Niyonsaba F., Ushio H., I. Nagaoka, K. Okumura, H. Ogawa, The human β -defensins (-1,-2,-3,-4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes, *J. Immunol.* 175 (2005) 1776–1784.

Niyonsaba F., Someya A., M. Hirata, H. Ogawa, I. Nagaoka, Evaluation of the effects of peptide antibiotics beta-defensin-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 1066–1075.

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.

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

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.

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.

Rice P., Longden I. and Bleasby A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite Trends Genet. 16(6):276-277 DOI: 10.1016/S0168-9525(00)00204-2.

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. and Higgins D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. DOI: 10.1038/msb.2011.75

Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. Biopolymers 2002, 66, 236–248.

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.

Shinnar AE, Butler KL, Park HJ. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. Bioorg Chem 2003;31:425–36.

Sorensen O.E., P. Follin, A.H. Johnsen, J. Calafat, G.S. Tjabringa, P.S. Hiemstra, N. Borregaard, Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3, Blood 97 (2001) 3951–3959

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.

Steintaesser 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.

Tam, J.P.; Wang, S.; Wong, K.H.; Tan, W.L. Antimicrobial Peptides from Plants. Pharmaceuticals (Basel) 2015, 8, 711–757.

Tomasinsig L, Zanetti M (2005) The cathelicidins—structure, function and evolution. Curr Protein Pept Sci 6:23–34

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

Tokumaru S., Sayama K., Y. Shirakata, H. Komatsuzawa, K. Ouhara, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, H. Nagai, L. Yang, S. Higashiyama, A. Yoshimura, M. Sugai, K. Hashimoto. 2005. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37, *J. Immunol.* 175, 4662–4668.

Torrent, Tommaso, Pulido, Noguéis, Notredame, Boix y Andreu. 2011. AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions, *Bioinformatics*, Volume 28, Issue 1, 1 January 2012, Pages 130–131,

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

Wang X, Song Y, Li J, Liu H, Xu X, et al. (2007) A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. *Peptides* 28: 2069–2074.

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.

Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. 2015. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 2015 : gkv1051v1-gkv1051. Epub 2015 Oct 13. PubMed PMID: 26467475. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Xiao Y, Cai Y, Bommineni YR, Fernando SC, Prakash O, et al. (2006) Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. *J Biol Chem* 281: 2858–2867.

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. Crotonamine, 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 crotonamine. *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.