



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MORELOS



---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13  
presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en B. Carmen Itzamatul Rodríguez Alejandro

TUTOR: DRA. MA. DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE

Cuernavaca, Morelos

Enero 2019

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Bacterias.....</i>	2
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus.....</i>	3
2.1.2 <i>Escherichia coli.....</i>	4
2.1.3 <i>Pseudomona aeruginosa.....</i>	5
2.2 <i>Antibióticos.....</i>	6
2.3 <i>Resistencia bacteriana.....</i>	6
2.3.1 <i>Mecanismos de resistencia.....</i>	8
2.4 <i>Péptidos antimicrobianos.....</i>	13
2.4.1 <i>Mecanismos de acción de los PAM.....</i>	14
2.5 <i>Proteínas con actividad antimicrobiana.....</i>	15
<b>3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 <i>Scolopendra polymorpha.....</i>	18
3.2 <i>SPC13.....</i>	19
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
6.1 <i>Objetivos particulares.....</i>	22
<b>7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>

8.1 Obtención del veneno.....	23
8.2 Purificación de SPC13.....	23
8.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de SPC13 por el método de difusión en agar.....	23
8.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de SPC13 y los péptidos derivados de SPC13.....	24
8.5 Digestión de SPC13.....	24
8.6 Purificación por RP-HPLC de los péptidos trípticos.....	24
8.7 Determinación de secuencia de aminoácidos.....	25
8.8 Síntesis y purificación de péptidos derivados de SPC13.....	25
8.9 Pruebas de actividad antimicrobiana por ensayos de microdilución.....	25
8.10 Actividad hemolítica.....	26
8.11 Análisis estadístico.....	26
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
9.1 Purificación de SPC13.....	27
9.2 Determinación de actividad antimicrobiana de SPC13 por el método de difusión en agar.....	27
9.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de SPC13.....	29
9.4 Digestión de SPC13.....	31
9.5 Purificación por RP-HPLC de péptidos derivados de la digestión tríptica de SPC13.....	31
9.5.1 Controles utilizados para la purificación de péptidos derivados.....	32
9.6 Pruebas de actividad antimicrobiana.....	33

9.7 Secuenciación de péptidos derivados de la digestión trípica de SPC13.....	34
9.8 Síntesis de los péptidos derivados de la digestión de SPC13.....	37
9.9 Pruebas de actividad antimicrobiana con los péptidos sintetizados.....	38
9.9.1 Pruebas de actividad antimicrobiana por el método de microdilución.....	39
9.10 Determinación de la MIC del péptido sintético derivado de SPC13.....	40
9.11 Actividad hemolítica.....	41
10. DISCUSIÓN.....	42
11. CONCLUSIÓN.....	47
12. PERSPECTIVAS.....	48
13. REFERENCIAS.....	49

## INDÍCE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Bacterias causantes comúnmente involucradas en infecciones intrahospitalarias y en la comunidad.....	8
Tabla 2. Clasificación de antibióticos, mecanismos de acción y resistencia.....	9
Tabla 3. Actividad de SPC13 frente a <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> .....	28
Tabla 4. CMI de SPC13 frente a <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> .....	29
Tabla 5. Tiempos de retención de los productos de la digestión de SPC13 con actividad antimicrobiana.....	33
Tabla 6. Péptidos derivados de SPC13.....	35
Tabla 7. Base de datos de PAMs.....	36
Tabla 8. Resultados de BLAST en CAMP <sub>R3</sub> .....	37
Tabla 9. Péptidos sintetizados derivados de SPC13.....	38

## INDICE DE FIGURAS

**Pág.**

---

Figura 1. Mecanismos de resistencia por modificación de antibióticos.....	10
Figura 2. Mecanismo de resistencia mediadas por bombas efflux.....	11
Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana por modificación o protección del sitio blanco.....	12
Figura 4. <i>Scolopendra polymorpha</i> .....	18
Figura 5. Secuencias parciales de SPC13.....	20
Figura 6. Metodología.....	22
Figura 7. Perfil electroforético de veneno total de <i>S. polymorpha</i> y ubicación de SPC13.....	27
Figura 8. Pruebas de inhibición por el método de difusión en agar de SPC13.....	28
Figura 9. Determinación de MIC de SPC13.....	30
Figura 10. Perfil cromatográfico representativo de las digestiones de SPC13.....	31
Figura 11. Perfil cromatográfico de los controles de la digestión de SPC13.....	32
Figura 12. Pruebas de actividad antimicrobiana de los productos de .....digestión trípica de SPC13.....	34
Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE al 20% de los TR con actividad antimicrobiana.....	35
Figura 14. Pruebas de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar de los péptidos derivados de SPC13.....	38
Figura 15. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de microdilución de péptidos derivados de SPC13 frente a <i>S.</i> <i>aureus</i> (ATCC 25923).....	39
Figura 16. Determinación de MIC de SPC13-DIC frente a <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	40
Figura 17. Actividad hemolítica de péptido sintético SPC13-DIC.....	41

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Neurofarmacología del Centro de Investigación en Biotecnología.



Contó con la asignación de la beca No: 267392 y una beca mixta durante tres meses para una estancia en la Aix Marseille Université (Marseille, Francia), ambas, por parte de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).



*“La constancia es la virtud por la que todas las cosas dan su fruto”*

*Arturo Graf.*

*¡Gracias Dios por todas tus bendiciones!*

**Mamá, Papá:** esto es por y para ustedes, gracias por ser mi pilar, mi refugio, mi motivación y mi propulsor más grande. Gracias por enseñarme a no dejarme vencer y luchar por todo lo que quiero. Sin duda alguna, yo no hubiese llegado hasta aquí, sin su apoyo. ¡Gracias Dios por bendecirme con los mejores padres!

**Nana,** no tengo palabras para agradecerte todo tu apoyo, por las risas, por los enojos, por las lágrimas, por las burlas, por ser mi mejor cómplice, mi concejera. Y por ser el pequeño motor de la casa. Gracias por siempre impulsarme a ser más, siempre.

*Familia Rodríguez Alejandro solo puedo decir que: “Los amo infinitamente”.*

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco infinitamente a la Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte por la confianza que depositó en mi para realizar este proyecto, así como todo el apoyo para realizar cada uno de los objetivos del proyecto de forma satisfactoria. Gracias por alentarme a dar lo mejor de mí siempre, por enseñarme a tener un poco más de paciencia para las cosas y fomentar el amor a lo que hago. ¡Mil gracias Jefa!

Quiero agradecer de forma especial a la Dra. Irene Perea, por todo su apoyo desde la Maestría, gracias por sus consejos y la infinita paciencia que tuvo conmigo.

Al comité tutorial:

- Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte
- Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
- Dr. Jesús Silva Sánchez
- Dr. Luis Caspeta Guadarrama
- Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal
- Dra. Ma. Eugenia Núñez Valdez
- Dra. Ma. Del Refugio Trejo Hernández

Gracias por el tiempo que dedicaron en cada uno de mis tutorales y revisiones, así como sus observaciones y todo su apoyo para realizar este proyecto.



A la **PhD. Olga Iranzo** por su infinito apoyo en mi proyecto y las aportaciones que brindó a mi proyecto que me brindó durante la estancia que realicé en Aix Marseille Université (Marseille, Francia).

A mis compañeros del laboratorio: **Manuel, Judith, Lucero, Arturo, Adriana, Anita, Abraham, Mundo, Edgar y Perlita** por hacer cada uno de los días de trabajo divertidos, gracias equipo por ser y estar siempre.

A la **TLF. Lucero Valladares Cisneros**, por su apoyo en la enseñanza y perfeccionamiento de las técnicas, si soy meticulosa en mis experimentos es por ti y en verdad te lo agradezco infinitamente. Y claro por ser más que una compañera, gracias amiga.

A la **Maestra Carolina Abarca**, por apoyarme en la revisión de mi tesis, pero sobre todo por tener siempre un buen consejo, una bonita plática y siempre una sonrisa.

Al **Dr. Alexis Rodríguez**, por su amistad y por toda su disposición para resolver mis dudas.

A **Víctor Martínez** por todo el apoyo que me brindó para realizar mis tutoriales, gracias por hacerte cargo de que no tuviera problemas con el equipo de cómputo, por eso nunca falló mis presentaciones en tutoriales. Gracias Vic por que eres más que un compañero, gracias por ser un gran amigo.

A la familia **Castorena y Bringas** por ser mis ejemplos a seguir: Lic. Gloria Alicia Castorena y en especial al Lic. Maclovio Castorena, señor especialmente para usted.

## RESUMEN

Actualmente, los venenos de animales se consideran una fuente potencial de numerosos péptidos bioactivos de interés bioquímico y farmacológico, como los péptidos con actividad antitrombótica, anticoagulante y antimicrobiana.

En nuestro grupo de trabajo en el 2014 se purificó por electroelución, a SPC13, un péptido antimicrobiano de 13 kDa, presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*, que tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 45 µg/ml; este péptido tiene una actividad hemolítica del 20.5%. Sus secuencias parciales mostraron una identidad del 98% con la histona H3 reportada en *S. viridis*.

En este trabajo se determinó la actividad bactericida de SPC13 frente *P.aeruginosa* obteniendo una CMI de 192.5 µg/ml, así como actividad bacteriostática contra *E. coli* obteniendo el efecto máximo a una concentración de 155 µg/ml. De la digestión triptica de SPC13 se purificó un péptido antimicrobiano aniónico de 8 aminoácidos, denominado SPC13-DIC, este péptido mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml (144.1µM), presentando una actividad hemolítica de 1.7 % frente a eritrocitos humanos, mostrando una reducción del 91.7% con respecto a la actividad hemolítica de SPC13.

## ABSTRACT

Currently, animal venoms are considered a potential source of bioactive peptides numerous biochemical and pharmacological interest, such as peptides with antithrombotic, anticoagulant and antimicrobial activity source.

In our working group in 2014 he was purified by electroelution, to SPC13, an antimicrobial peptide of 13 kDa present in the venom of *Scolopendra polymorpha*, which has antimicrobial activity against *S. aureus* with minimal inhibitory concentration of 45 µg/ml; this peptide has a hemolytic activity of 20.5%. Their partial sequences showed a 98% identity with the histone H3 reported in *S. viridis*.

In this work, the bactericidal activity of SPC13 against *P.aeruginosa* was determined obtaining an minimal inhibitory concentration of 192.5 µg / ml, as well as bacteriostatic activity against *E. coli*, obtaining the maximum effect at a concentration of 155 µg/ml. From the tryptic digestion of SPC13 was purified an anionic antimicrobial peptide of 8 amino acids, called SPC13-DIC, this peptide showed antimicrobial activity against *S. aureus* with a minimum inhibitory concentration of 125 µg/ml (144.1µM), presenting a hemolytic activity of 1.7% against to human erythrocytes, showing a reduction of 91.7% with respect to the hemolytic activity of SPC13.

## 1.INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de agentes antimicrobianos crea una presión selectiva para el surgimiento de cepas resistentes (Becerra *et al.* 2009). Si no se toman las medidas adecuadas para entender y controlar la cambiante epidemiología y sintomatología clínica, puede convertirse en un importante problema de salud en un futuro cercano (Sussmann *et al.* 2001; World Health Organization, 2018).

Además de los péptidos antimicrobianos convencionales, todos los organismos eucariotas, unicelulares y pluricelulares, producen una amplia gama de agentes anti-infecciosos naturales que también incluyen las proteínas y otras moléculas que a menudo no se consideran como parte del sistema inmune innato. Los ejemplos van desde las histonas, ácidos grasos y otros componentes estructurales de las células a los pigmentos y proteínas reguladoras. Estos probablemente representan factores de defensa muy antiguos que han sido reutilizados en nuevas formas durante la evolución (Smith *et al.* 2010; González *et al.* 2017).

Los centípedos son artrópodos depredadores que pertenecen la clase Chilopoda. Esta clase, ha sido utilizada por miles de años para tratar diversas enfermedades tales como: apoplejía, epilepsia, tétanos, tuberculosis, tosferina, así como también han sido empleados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en Corea, China y Asia Oriental (Kong *et al.* 2012). Se han realizado pocos estudios químicos, fisiológicos y toxicológicos acerca de la composición y efectos del veneno del ciempiés. En años recientes se han reportado diversos péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de chilopodos, los cuales tienen amplio espectro frente a bacterias y levaduras patógenas (Wenhua *et al.* 2006; Peng *et al.* 2009; Kong *et al.* 2013). Particularmente del veneno del género *Scolopendromorpha*, se han purificado numerosos péptidos antimicrobianos de amplio espectro que varían de 2.5 a 4.4 kDa, purificados de *S. subspinipes mutilans*. *SPC13* es un péptido antimicrobiano aislado de *Scolopendra polymorpha*, su secuencia parcial presenta una alta identidad con la histona H3, reportada en *Scolopendra viridis*. *SPC13* tiene actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 45 µg/ml y presenta un 20.5% de hemólisis, por lo que, sus características lo hacen importante para favorecer su desarrollo como posible terapéutico (Rodríguez-Alejandro, 2014). Por lo anterior en este trabajo se determinó la especificidad de *SPC13* y sus derivados, frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y cepas multirresistentes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tamaño variable cuyo límite inferior está en las  $0,2\mu\text{m}$  y el superior en las  $50\mu\text{m}$ ; sus dimensiones medias oscilan entre  $0,5$  y  $1\mu\text{m}$ . Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores: son células procariotas que contienen información genética, sistemas de producción de energía y sistemas biosintéticos necesarios para el crecimiento y reproducción. Una célula bacteriana típica tiene las siguientes estructuras: material genético (ADN) no delimitado por una membrana nuclear, algunas bacterias pueden contener fragmentos circulares de ADN dispersos en el citoplasma denominados plásmidos, además presentan ribosomas, citoplasma y membrana citoplasmática, por fuera está la pared bacteriana, estructura que por su composición bioquímica se puede decir que es propia de las bacterias, algunas bacterias como los micoplasmas, carecen de pared celular (Cardenas-Perea *et al.* 2014).

La naturaleza rígida, flexible y elástica de la pared celular de todas las bacterias reside en un mucopéptido (peptidoglicano) formado por cadenas acetilglucosamina y ácido murámico, estas cadenas se encuentran unidas por enlaces peptídicos; de acuerdo con su composición química las bacterias pueden comportarse de forma distinta al tñirlas con la técnica de Gram (Cardenas-Perea *et al.* 2014). Algunos tipos de bacterias tienen una segunda membrana (membrana externa) que recubre la capa de peptidoglicano por su parte exterior. En aquellas bacterias en las que existe una membrana externa (bacterias Gram-negativas), la capa de peptidoglicano es más delgada que en las que carecen de ella (bacterias Gram-positivas). Se denomina espacio periplásmico al comprendido en las bacterias Gram-negativas entre las membranas interna y externa y al inmediatamente adyacente a la membrana interna en el caso de las bacterias Gram-positivas.

Las diferencias estructurales entre las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son las responsables del comportamiento de las células a la tñición de Gram. En dicha tñición, se forma dentro de las células un complejo cristal insoluble, violeta-yodo, que en el caso de las Gram-negativas puede extraerse con alcohol, pero no en las Gram-positivas. El alcohol deshidrata las bacterias Gram-positivas, las cuales poseen paredes celulares muy gruesas con varias capas de peptidoglicano, provocando el cierre de los poros de las paredes impidiendo la salida del complejo cristal violeta-yodo; en bacterias Gram-negativas, el alcohol penetra rápidamente en la capa externa que es rica en lípidos y la fina capa de

peptidoglicano no impide el paso de solvente por lo que el complejo se extrae fácilmente.

Estos microorganismos cuentan con una forma de desarrollar mecanismos de adaptación permitiéndoles responder y modificar su entorno, incluso modificando la respuesta de seres multicelulares, esta adaptación incluye la habilidad de inhibir o esquivar amenazas existentes en su hábitat. Estas características le dan una particular importancia debido a que existe un amplio grupo de bacterias responsables de importantes infecciones, que afectan a un gran grupo de organismos, entre ellos, al ser humano; que al dificultar su control las convierte en un problema de salud mundial.

En los últimos años ha emergido, un grupo de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas que han tomado especial interés, debido a que han generado cierto tipo de resistencia a los antibióticos ya conocidos, por lo que la OMS los considera de alto riesgo, entre estos organismos encontramos a *S. aureus* y sus serotipos meticilino resistentes (MRSA), *P. aeruginosa* y *E. coli* (World Health Organization, 2014).

### 2.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram- positivo, inmóvil, de 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se divide en tres planos para formar colonias lisas, brillantes y convexas, de color amarillo-naranja a blanco, es aerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con o sin oxígeno, fermenta glucosa, lactosa y maltosa, no presenta movilidad ni forma cápsula, esta bacteria es capaz de crecer hasta con un 10% de sal común y tiene un amplio rango de temperatura de crecimiento (30-40°C) y un pH de 4.8 a 9.4 (Madigan *et al.* 2004). *S. aureus* es un colonizador de piel y mucosa de mamíferos y aves, considerado un patógeno oportunista de importancia nosocomial frecuentemente asintomático, causando diferentes tipos de infecciones, por ejemplo, infecciones de la piel y tejidos blandos, forunculosis, abscesos, osteomielitis, neumonía, sepsis, endocarditis, estafilococo tóxico, síndrome de shock, o fascitis necrotizante (Mehraj *et al.* 2016).

Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas, dentro de estas existen cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La función principal de estas proteínas es ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotóxicas

estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina. Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped (Bustos-Martínez *et al.* 2006; Madigan *et al.* 2004; Winstel *et al.* 2015). En este sentido, se ha puesto más atención en *S. aureus* MRSA, la cual se ha convertido en un problema de salud pública aumentando en las últimas tres décadas; alrededor del 23% del total de infecciones de sangre producidas por *S. aureus* en 2011 y recientemente la Organización mundial de la salud (World Health Organization, 2014) reportó la presencia de MRSA en más del 50% del total de los aislados de infecciones nosocomiales, en cinco de las seis zonas marcadas por la OMS, siendo España el país con mayor incidencia. De acuerdo con reportes del 2011 en México la presencia de *S. aureus* MRSA en hospitales de tercer nivel había aumentado de un 2 a un 64% en 30 años, mostrando una prevalencia de un 50-85% en aislados clínicos (Miranda, 2017).

### 2.1.2 *Escherichia coli*

*E. coli* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*; es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Es un bacilo Gram-negativo, de 0.5µm de ancho por 3µm de largo, con flagelos peritricos, anaerobio facultativo, capaz de crecer en agar y en medios simples con o sin NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos; es una bacteria de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, coloniza el tracto intestinal de muchos animales sanos y es el principal organismo anaerobio facultativo, actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. Sin embargo, si la bacteria adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos desencadenará un cuadro clínico de importancia en humanos y otros mamíferos. Además, *E. coli* constituye un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana, que juegan un papel importante para desempeñar un papel epidemiológico en la propagación de la resistencia.

La resistencia a antibióticos de esta bacteria está aumentando en forma considerable a nivel mundial; España, es uno de los países de mayor impacto, que ha visto el aumento de resistencia a ciprofloxacino de un 17,9% en 2001 a un 35% en 2011. *E. coli* ha conseguido incrementar su resistencia a las cefalosporinas de tercera generación del 1.6% 2001 al 12.3% de 2011; aunado a esta situación la

resistencia, a múltiples antibióticos en esta bacteria se ha duplicado durante la última década, pasando del 12% en 2001 al 26% en 2011 (World Health Organization, 2014). Siendo las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) las que ganan una atención especial, ya que confieren resistencia a muchos de los antibióticos betalactámicos comúnmente utilizados en la medicina veterinaria y humana, los cuales pueden ser transferidos con facilidad entre diferentes cepas debido a la frecuente localización plasmídica de estos genes (Rodríguez-Ángeles, 2002; Madigan *et al.* 2004; Alonso *et al.* 2016).

### 2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, flagelada con forma de bastoncillo, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria de amplia distribución y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos, en humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano. Es una de las bacterias patógenas nosocomiales más comunes alrededor del mundo, ocasiona infecciones que incrementan los costos médicos, particularmente en pacientes inmunocomprometidos o críticamente enfermos. Estas infecciones son difíciles de tratar debido a que las cepas responsables pueden ser resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación. Además, puede ocurrir resistencia antibiótica durante o después del tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* (Madigan *et al.* 2004; World Health Organization, 2014).

En los últimos años se ha demostrado que la capacidad de esta bacteria para eliminar los antimicrobianos que penetran en la misma, es empleando para ello sistemas de expulsión activa, es tan importante o más que la baja permeabilidad de su membrana externa. Además, la totalidad de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* expresaron una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase C que contribuye a la resistencia a muchos de los  $\beta$ -lactámicos de uso clínico, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas y muchas de las cefalosporinas de tercera generación. La resistencia a imipenem en España aumentó del 15 al 21% entre 2006 y 2011. Todo ello reduce notablemente las opciones terapéuticas frente a las infecciones causadas por este agente. En la actualidad, los  $\beta$ -lactámicos que, desde un punto de vista clínico, tienen buena actividad frente a *P. aeruginosa* incluyen algunas penicilinas (ureidopenicilinas, carboxipenicilinas, etc.) oximiinocefalosporinas (ceftazidima), las cefalosporinas zwitteriónicas (como cefepima) y las carbapenemas (imipenema y meropenema).



Aunque la aparición de *P. aeruginosa* multirresistente (MDR) es un problema crítico en la práctica médica. Las características clave involucradas en la aparición y propagación de la *P. aeruginosa* MDR siguen siendo desconocidas (World Health Organization, 2014; World Health Organization, 2018; Fariñas y Martínez-Martínez, 2013; Miyoshi-Akiyama *et al.* 2017).

## 2.2 Antibióticos

La Organización Panamericana de la Salud, define a los antibióticos como sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos que poseen la capacidad de destruir, impedir o retardar la multiplicación de otros microorganismos (Organización Panamericana de la Salud, 2004); constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y su toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (World Health Organization, 2014).

Wise en el 2002 estimó que el consumo de antibióticos a nivel mundial se encontraba entre las 100,000 y 200,000 toneladas; de las cuales el 75% fue destinado a su aplicación en salud humana (Wise, 2002). En el 2009 se estimó que el valor comercial de la industria de los antibióticos a nivel mundial fue de US\$42 billones de dólares (Hamad, 2010); aumentando cerca de US\$ 1.2 billones de dólares para el 2012. México es el segundo mercado más grande de América Latina en la industria farmacéutica, calculando que las ventas anuales de esta clase de agentes terapéuticos se sitúan en cerca de los US\$960 millones de dólares (Dresser *et al.* 2008; Fuente: Secretaría de Economía, 2013).

El dinamismo de estos fármacos ha llevado al abuso de estos y, por lo tanto, a la generación de cepas resistentes; lo que limita su eficacia, trayendo como consecuencia un problema de salud mundial.

## 2.3 Resistencia bacteriana

Se define como resistencia bacteriana o a los antimicrobianos (RAM), cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) se modifican al ser expuestos a algún tipo de antimicrobiano (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos, por ejemplo). Teniendo como resultado la ineficacia de estos fármacos y la persistencia de infecciones (World Health Organization, 2018).

En la última década se ha aumentado la incidencia de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas resistentes a múltiples fármacos, incluyendo diversas cepas MDR, como *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes* y diversas enterobacterias, entre otras especies patógenas para el humano (Ver tabla 1). Estos microorganismos generalmente están implicados en infecciones graves, por lo que actualmente suponen un gran problema de salud pública mundial (Rodríguez *et al.* 2014; World Health Organization, 2014). Este aumento de resistencias antimicrobianas, unido al poco desarrollo de nuevos antibióticos, hace que cada vez se disponga de menos opciones terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades infecciosas y suponen un gran problema de salud pública mundial (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013).

En datos más recientes y con la creación del sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (denominado GLASS, por sus siglas en inglés) de la OMS que incluye, hasta la fecha, 52 países (25 de ingresos altos, 20 de ingresos medianos y siete de ingresos bajos), revela la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en 500 000 muestras de 22 países, en los que había sospechado de infecciones bacterianas. Las bacterias más frecuentes fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Donde la RMA de los antibióticos más utilizados fue desde un 0 a un 82%; específicamente penicilina, el antibiótico más utilizado para neumonía, osciló en el 51% de resistencia en los países estudiados, y de los aislados de *E. coli* presentó un 8-65% de resistencia a ciprofloxacina el antibiótico comúnmente utilizado para las infecciones causadas por esta bacteria (World Health Organization, 2018).

Particularmente en México, hasta el 2017, el 85% de las cepas aisladas de *E. coli* son resistentes a la aminopenicilina, ubicando el quinto lugar de “amenaza” entre los países de riesgo de resistencia, por debajo de Pakistán (93%), India (92%), China (88%) y Kenia (86%) (Miranda, 2017).

**Tabla 1. Bacterias comúnmente involucradas en infecciones intrahospitalarias y en la comunidad.**

Bacteria/ Resistencia	Ejemplos típicos de enfermedades	De 194 países, que proporcionan datos:	N° de regiones de la OMS con informes nacionales de 50% de resistencia o más
<i>Escherichia coli</i> / -vs Cefalosporinas (tercera generación) -vs Fluroquinolonas	- Infecciones del tracto urinario - Infecciones del torrente sanguíneo	86 92	5/6 5/6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / -vs Cefalosporinas (tercera generación) -vs Carbapenemes	- Neumonía - Infecciones en torrente sanguíneo - Infecciones en tracto urinario	87 71	6/6 2/6
<i>Staphylococcus aureus</i> / -vs meticilina "MRSA"	-Heridas infectadas -Infecciones en torrente sanguíneo	85	5/6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> / - No susceptible o resistente a penicilina	- Neumonía - Meningitis - Otitis	67	6/6*
<i>Salmonella no tifoïdal</i> / -vs Fluroquinolonas	- Dearrea transmitida por alimentos - Infecciones en torrente sanguíneo	68	3/6*
Especies de <i>Shigella</i> / -vs Fluroquinolonas	-Disentería bacilar	35	2/6*
<i>Neisseria gonorrhoea</i> / -vs Cefalosporinas (tercera generación)	- Gonorrea	42	3/6*

\*N° de regiones de la OMS con informes nacionales de 25% de resistencia o más. Información tomada de World Health Organization, 2014.

### 2.3.1 Mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos, sin embargo, algunas de ellas pueden adquirir resistencia ya sea por mutación en genes cromosomales y por transferencia horizontal de genes. Los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana, en la tabla 2 se puede observar la relación entre

los mecanismos de acción de los antibióticos y la resistencia hacia estos (Organización Mundial de la Salud, 2013; Daza, 1998).

Tabla 2. Clasificación de antibióticos, mecanismos de acción y resistencia

Antibióticos	Mecanismo de acción	Blanco de acción	Mecanismo de resistencia	Actividad	Base genética
<b>β-lactámicos:</b> penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobetalactámicos, inhibidores de las β-lactamasas	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas unidoras de penicilinas (PBPS)	a) Hidrólisis del anillo β-lactámico del antibiótico b) Alteración del blanco c) Permeabilidad cambios en las proteínas de membrana externa	Hidrólisis Enzimática	a) Plásmido y cromosoma b) cromosoma c) cromosoma
<b>Macrolidos y lincosamidas</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	a) Metilación del RNA ribosomal 23S b) Hidrólisis de la lactona de eritromicina y oleandomicina	ARN Metilasas, Esterasas, Hidrolasas, Transferasas, Fosforilasas	a) Plásmido y cromosoma b) Plásmido
<b>Cloranfenicol</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando la unión al ribosoma	Cloranfenicol-acetil transferasa (CAT)	Plásmido
<b>Aminoglicosidos:</b> estreptomina, kanamicina, gentamicina, neomicina, etc...	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50S del ribosoma	a) Modificación del antibiótico impidiendo su transporte b) Modificación del RNA 16S de la subunidad 30S del ribosoma c) Bajo potencial de	Acetilación, Fosforilación, Adenilación	a) Plásmido y cromosoma b) Plásmido c) Cromosoma
<b>Estreptomina</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 30S	Modificación de proteínas ribosomales	Proteínas S12 de la subunidad 30S ribosomal	Cromosoma
<b>Fluoroquinolonas y ácido nalidixico</b>	Inhibición de replicación, transcripción, recombinación y super enrollamiento de DNA	DNA girasa	a) Mutación sobre DNA girasa b) Disminución de la permeabilidad c) Eflujo	DNA girasa modificada mutación NalB NorA	a) Cromosoma b) Cromosoma c) Cromosoma
<b>Tetraciclinas</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	Proteínas de la unidad ribosomal	Interferencia con el transporte de la droga, aumento de flujo	Bombas eflujo y Protección ribosomal	Plásmido

(Información tomada de Fuch et al. 1994; Organización Panamericana de la Salud, 2004; Rodríguez, 2012).

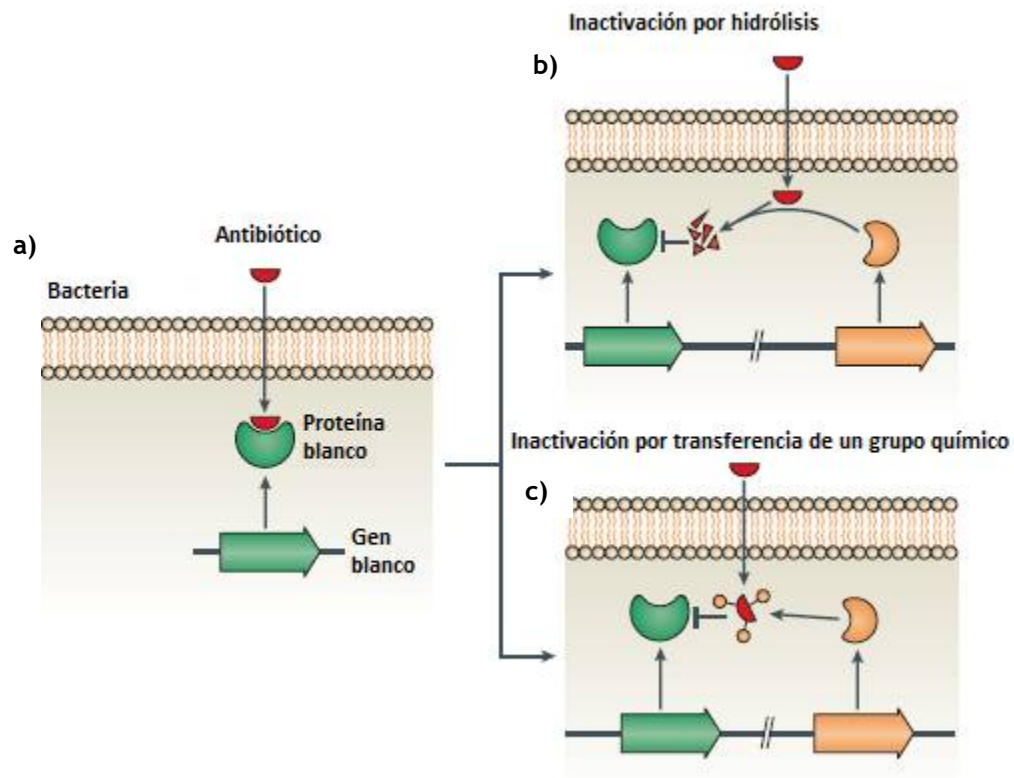
Dependiendo del grupo de antibiótico y la especie bacteriana se pueden agrupar en cuatro grupos de resistencia fundamentales:

**Modificación directa de antibióticos:** ésta basada en la inactivación del antibiótico: las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad (Fig.1).

**Por hidrólisis:** la modificación de antibióticos por enzimas es el mecanismo mayormente utilizado por las bacterias, siendo importante desde el inicio del uso de antibióticos. Existe un gran número de enzimas descritas con este mecanismo que son utilizadas para diferentes clases de antibióticos, incluyendo las β-lactamasas; β-lactamasas de espectro extendido (ESBLs, por sus siglas en inglés);

carbapenemasas incluyendo imipenemasas, oxalinasas y enzimas NDM en bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Fig. 1b).

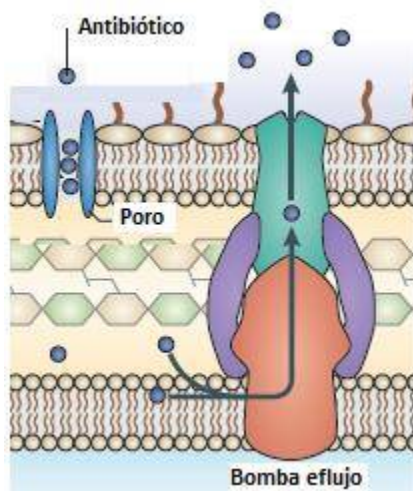
Inactivación de antibióticos por transferencia de un grupo químico: Es la adición de un grupo químico a sitios vulnerables del antibiótico por medio de enzimas bacterianas, evitando que el antibiótico llegue a su sitio blanco. Entre los grupos descritos se encuentran fosfato, aciles, ribitol y nucleotidil (Ver Fig. 1c) (Tafur *et al.* 2008; Walsh, 2000; Sussman *et al.* 2009; Blair *et al.* 2015).



**Figura 1. Mecanismos de resistencia por modificación de antibióticos:** a) Bacteria susceptible a un antibiótico; b) Inactivación por hidrólisis: adquisición y producción de enzimas que destruyen a los antibióticos (por ejemplo, ESBLs); c) Transferencia de grupos químicos al antibiótico: producción de enzimas que añadirán grupos químicos al antibiótico que modificará su estructura. (Imagen modificada de Blair *et al.* 2015)

## Expulsión de antibiótico:

Presencia de bombas eflujo: Es debido a la presencia de proteínas especializadas de membrana. Por ejemplo, las que alteran la producción de energía para disminuir no solamente la entrada del antibiótico, si no que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Operan tomando el antibiótico del espacio periplasmático y expulsándolo al exterior, evitando que llegue a su sitio de acción. Algunas bombas efflux transportan solo un antibiótico, pero existen otras que su espectro es muy amplio y pueden exportar una gran gama de antibióticos. Estas son conocidas como bombas eflujo multirresistentes (MDR por sus siglas en inglés). Este mecanismo es el mayor contribuyente a la resistencia intrínseca en bacterias Gram- negativas (Ver Fig. 2) (Sussman *et al.* 2009; Garza-Ramos *et al.* 2009; Tafur *et al.* 2008; Blair *et al.* 2015).



**Figura 2. Mecanismo de resistencia mediadas por bombas efflux.** En la imagen se muestra la entrada del antibiótico a través de una porina, sin llegar a su sitio blanco, debido a la eficiente expulsión al espacio extracelular por una bomba eflujo.

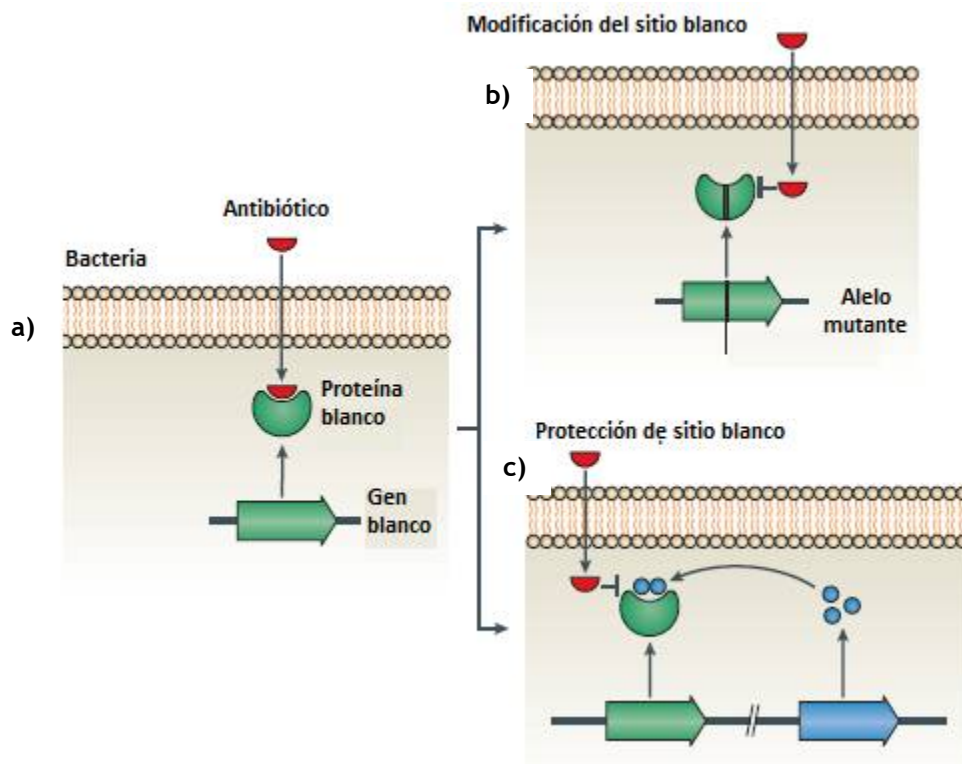
## Modificación y protección del sitio blanco:

Modificación del sitio blanco: la base de acción de todos los antibióticos es la alta afinidad por su sustrato. En respuesta a esto, las bacterias han desarrollado uno de los mecanismos más exitosos de resistencia bacteriana, lo cual se enfoca en la evasión de la acción de los antibióticos por modificación del blanco molecular. Dicho mecanismo, a menudo genera mutaciones puntuales en genes seleccionados, resultando en el desarrollo de cambio de blancos moleculares, sin generar cambios radicales en el microorganismo (Fig.3). Este mecanismo es, principalmente, utilizado por bacterias Gram-positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de



los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a nivel de las proteínas que se unen a la penicilina (Ver Fig. 3b) (Garza-Ramos *et al.* 2009; Tafur *et al.* 2008; Paniagua, *et al.* 2003; Blair *et al.* 2015).

Modificación de enzimas y proteínas para evadir la acción de los antibióticos: este mecanismo consiste en la repromagramación del sitio blanco o la modificación del objetivo mediante la adición de un grupo químico. También puede prevenir la unión de antibióticos sin alterar la secuencia de la proteína primaria del blanco, conservando su actividad y, además de ser eficaz no requiere cambios mutacionales en los genes que codifican para las moléculas blanco. En el caso de *S. aureus*, la cual presenta afinidad menor por los antibióticos beta-lactámicos; PBP2' es la base genética para el desarrollo del fenotipo Meticilina resistente (MRSA), ampliamente diseminado y de preocupación clínica (Ver Fig. 3c) (Deresinski, 2005; Paniagua *et al.* 2003; Blair *et al.* 2015).



**Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana por modificación o protección del sitio blanco:** a) Bacteria susceptible a un antibiótico; b) Modificación del sitio blanco: producto de una mutación o recombinación de un gen; c) Protección del sitio blanco: la modificación del blanco es por adición de un grupo químico, que también puede prevenir la unión de antibióticos sin alterar la secuencia de proteína primaria del blanco conservando su actividad. (Imagen modificada de Blair *et al.* 2015).

Estos microorganismos con multiresistencia generalmente están implicados en infecciones graves, por lo que actualmente suponen un gran problema de salud pública mundial. Este aumento de resistencias antimicrobianas, aunado al poco desarrollo de nuevos antibióticos, hace que cada vez se disponga de menos opciones terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades infecciosas (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013); lo que trae como consecuencia una amenaza a la prevención y el tratamiento eficaz hacia una gran gama de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos (World Health Organization, 2014).

Una realidad es que la mayoría de los antibióticos usados en la medicina humana son derivados de microorganismos que producen esta clase de fármacos que son utilizados en contra de otras especies de microorganismos de su entorno natural. Este proceso natural favorece al desarrollo de resistencia en especies nativas, la cual es susceptible a movilizarse o transferirse a patógenos humanos. Además del uso constante de fármacos antibacterianos y el uso indiscriminado e irracional, ha ido incrementando el fenómeno de resistencia, esto sin mencionar la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico, lo que convierte a esta situación en un problema de salud a nivel mundial. Tal parece que el descubrimiento de nuevos antibióticos resuelve el problema, sin embargo, la constante aparición de nuevos mecanismos de resistencia, incluyendo a los antibióticos recientemente autorizados, como es el caso de deptomicina que tuvo resistencia antes de su primer uso clínico, dificulta el control total de estas infecciones bacterianas.

## 2.4 Péptidos antimicrobianos

La inmunidad innata y la inmunidad adquirida son elementos esenciales de los diversos mecanismos de defensa que muchos organismos han desarrollado, para lograr sobrevivir en presencia de microorganismos potencialmente patógenos. Uno de los elementos de la inmunidad innata que tiene un papel crucial para combatir las infecciones, son los péptidos antimicrobianos (PAM), su amplia distribución tanto en animales y vegetales sugiere que los péptidos antimicrobianos han cumplido un papel fundamental en la exitosa evolución de los organismos multicelulares complejos dada su presencia en organismos primitivos y se han logrado conservar hasta en los mamíferos donde, curiosamente, han sido de los últimos en descubrirse (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002; Zasloff, 2002). Estas proteínas son de bajo peso molecular, por lo general, están compuestas de 10-50 residuos de aminoácidos, son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas y se disponen en diferentes grupos dependiendo de la composición de aminoácidos, tamaño y conformación. El papel principal de los péptidos antimicrobianos es la lisis directa de microorganismos; sin embargo, a la fecha también se han descrito



propiedades quimiotácticas, que le permiten modular el sistema inmune y de esta forma constituir un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Rivas-Santiago *et al.* 2006; Sierra *et al.* 2017; González *et al.* 2017).

#### 2.4.1 Mecanismos de acción de los PAM

En general, los mecanismos de acción de los PAM comprenden tres pasos: el primero es la interacción entre el péptido antimicrobiano (catiónico) y la membrana aniónica de un microorganismo, la cual se lleva a cabo por la atracción electrostática, la cual puede ser inhibida por grandes concentraciones de sal en la solución en la que se lleva a cabo esta interacción; el segundo paso es la permeabilización de la membrana. Este mecanismo se da por la formación de poros en la membrana debido a la incorporación de los péptidos y su organización en poros. Al final se lleva a cabo la lisis celular por choque osmótico.

Para explicar este mecanismo de acción de los PAM se han propuesto diversos modelos:

*Modelo de tapón de barrel-steve:*

En este modelo los péptidos forman un poro en la membrana con un lumen central que semeja a un tapón compuesto por péptidos helicoidales. Las regiones hidrofóbicas del péptido se alinean con la región lipídica central de la membrana y la región hidrofílica del péptido forma la región interior del poro (Bechinger y Gorr, 2016).

*Modelo poro toroidal:*

Los péptidos se unen a la membrana al alcanzar una concentración límite que hace que los lípidos se doblen formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos que, a diferencia del anterior, forma un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana. Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como magainina y mellitina (Bechinger y Gorr, 2016; Midura-Nowaczeck y Markowska, 2014).

*Modelo agregado:*

En este mecanismo, los péptidos no se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados con la cara externa y, al alcanzar una concentración crítica, forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso en una configuración de micelio; eventualmente, se produce la muerte celular por pérdida del citoplasma. Este tipo de mecanismos se ha encontrado en péptidos como latarcín Ltc2a, derivado del

veneno de la araña *Lachesana tarabaevi* (Midura-Nowaczek y Markowska, 2014).

*Mecanismo de carpeta:*

En este modelo, similar a la función de los detergentes, el péptido se une a la membrana y, a una concentración suficiente, se reorienta, lo que permite la formación de estructuras parecidas a los micelios que se extienden en la bicapa en un complejo péptido lipídico. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido péptido y agua, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o pueden desintegrarse espontáneamente, lo que lleva a la translocación de los péptidos hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción interna (Téllez y Cataño, 2010; Castañeda-Casimiro *et al.* 2009; Haney *et al.* 2016; Sierra *et al.* 2017; Bechinger y Gorr, 2016; Midura-Nowaczek y Markowska, 2014).

## 2.5 Proteínas con actividad antimicrobiana

La mayoría de los organismos multicelulares están expuestos a la presencia de microorganismos patógenos, por lo que su sistema inmune como respuesta, genera una gran cantidad de moléculas de defensa, entre las que podemos encontrar numerosas proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana. La producción, ya sea de forma constitutiva o inducida, de proteínas y péptidos antimicrobianos (PAMs), actúan contra la invasión de numerosos patógenos (Padhi *et al.* 2014). En la actualidad han incrementado los reportes de PAMs a través de la búsqueda de secuencia de posibles fragmentos antimicrobianos de proteínas grandes. Hasta el momento se ha demostrado que actividad antimicrobiana directa de estas proteínas las convierten en generadores potenciales de fragmentos activos de los cuales deriven PAMs. Por lo anterior es que esta clase de moléculas se han considerado como nuevas alternativas de tratamiento para combatir infecciones bacterianas.

Existe una amplia gama de proteínas con la misma eficacia que los péptidos antimicrobianos, esta clase de moléculas en su mayoría aisladas de vertebrados, con pesos que oscilan entre los 10-80 kDa, su actividad es de amplio espectro con MICs que van desde los 0.0095-50  $\mu\text{M}$ , como las serprocidinas (37 kDa) (Padhi *et al.* 2014), lactoferrinas (80 kDa) (Arnold *et al.* 1980; Levay and Viljoen 1995; Newman *et al.* 2017), catepsinas (23 a 42 kDa) (Padhi *et al.* 2014; Shafer *et al.* 1986), lisozimas, fosfolipasas (14 y 18 kDa) (Smith y Dyrinda, 2015; Mukherjee y Hooper, 2015) por mencionar algunas. De las pocas proteínas antimicrobianas reportadas en invertebrados, las crustinas son una amplia familia de proteínas ricas en

cisteínas, aisladas de crustáceos, con pesos moleculares que van desde los 7 hasta los 14 kDa, la actividad de esta familia es de amplio espectro con CMI de 1.6 a 50  $\mu\text{M}$  (Relf *et al.* 1999).

Un grupo potencial para generar derivados de proteínas con la actividad antimicrobiana, y que ha tomado relevancia en la investigación son las histonas y sus derivados, estas proteínas se han descrito en numerosos organismos, las actividades de estas proteínas tienen amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con CMI de 1.5-5 y 0.5-1.0  $\mu\text{M}$  respectivamente (Smith and Dyrynda, 2015).

Las histonas son mejor conocidas, como componentes principales del nucleosoma en células eucariotas, que contribuyen a la regulación de la transcripción de genes. Estas se clasifican en dos grupos: histonas ricas en Lys (H1, H2 y H3) e histonas ricas en Arg (H3 y H4). Estos cinco subtipos de histonas también se clasifican como histona “linker” o enlazadora (H1) e histonas nucleosomales (H2A, H2B, H3 y H4). Estudios recientes mostraron que estas proteínas están presentes, no sólo dentro del núcleo, sino también en las mitocondrias, gránulos citosólicos y en la superficie celular y además muestran distintas actividades biológicas. Estas histonas “extracelulares” se sabe que participan en diferentes roles fisiológicos; en particular, existe una creciente evidencia de actividad antimicrobiana de amplio espectro, principalmente de histonas y sus fragmentos en ostras, camarones, peces, anfibios e incluso mamíferos (Pavia *et al.* 2012; Tagai *et al.* 2011).

Las propiedades antimicrobianas de las histonas fueron reportadas, por primera vez, en 1942 donde se observó que las histonas de timo de ternera ejercen actividad bactericida frente a bacterias Gram- positivas y Gram- negativas (Miller *et al.*, 1942). En 1958 se demostró actividad antimicrobiana en histonas ricas en argininas (H3 y H4), contra *E. coli*, *S. albus*, *K. neumoniae*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, por mencionar algunas, manteniendo diferentes pH y concentraciones salinas (Hirsh, 1958). Muchos péptidos con actividad antimicrobiana son derivados de la digestión proteolítica de histonas intactas, en este grupo se incluye a los péptidos buforin I y II, originalmente aislado del anfibio *Bufo bufo gargarizans*, presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram- negativas con una CMI de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Además, se demostró que estos PAM no inducen a lisis, si no que atraviesan la membrana de la célula bacteriana inhibiendo las funciones de ésta, a diferencia de la magainina II la cual induce a la formación de poros de 2-3 nm de diámetro (Cho *et al.* 2002; Park *et al.* 1998; Cho *et al.* 2009; Imura *et al.* 2008). De acuerdo con las observaciones

realizadas por Lee y colaboradores (2009). La histona H4, presente en la glándula sebácea humana puede contribuir a la respuesta inmune innata en la piel, que actúa en defensa contra infecciones bacterianas; la histona H4 presente en estas células tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *P. acnés*, con una CMI de 25 µg/µl. Tras una lesión en la mucosa epitelial en el bagre (*Parasilurus asotus*), se produce Parasin I, la cual surge de la digestión proteolítica de H2A con catepsina D, presente en el citoplasma de la mucosa epitelial; este péptido presenta actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos, entre ellos *S. aureus*, con una CMI de 2µg/µl; lo que lo hace 25 veces más potente que la magainina II del cual su CMI es de 50 µg/µl (Cho *et al.* 2002; Park *et al.* 1998).

El mecanismo de acción de las histonas al parecer involucra mecanismos que facilita el contacto directo de las histonas con los patógenos, como son la liberación de trampas extracelulares que causan apoptosis celular o bien estas pueden ser liberadas al medio exterior (encapsuladas en gotas de lípidos) y con ayuda de proteasas digerirse y los péptidos resultantes pueden ejercer su acción (Nicapitaya *et al.* 2013). Se ha propuesto que las histonas antimicrobianas han evolucionado del sistema de defensa innato que actúa contra microorganismos patógenos, que pudieron haber sido cooptadas de la estructura de estas abundantes proteínas componentes de la cromatina de organismos eucariotas (Smith *et al.* 2010; Nicapitaya *et al.* 2013).

Como consecuencia de la resistencia bacteriana, en los últimos años la investigación farmacológica se ha encaminado hacia la obtención de agentes antimicrobianos con propiedades o mecanismos de acción diferentes a los convencionales, entre los cuales podemos encontrar péptidos y proteínas antimicrobianas, provenientes de diversas fuentes, como venenos animales.

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

#### 3.1 *Scolopendra polymorpha*

En México se han documentado cerca de 180 especies de ciempiés dentro de cuatro órdenes y 17 familias (Cupul-Magaña, 2013). Los ciempiés o quilópodos son artrópodos terrestres, típicamente solitarios y de ellos se conocen cerca de 3110 especies a nivel mundial.

*Scolopendra polymorpha*, también conocido como ciempiés de desierto, varía 10 - 18 cm de largo; habita en pastizales secos, bosques y desiertos; en estos hábitats los ciempiés generalmente residen debajo de las piedras, a pesar de que se han observado la creación de madrigueras en ambientes adecuados y dentro de troncos podridos. Los segmentos del cuerpo tienen una línea lateral, y por esta razón también se conoce como el ciempiés tigre o ciempiés tigre-raya y sus antenas tienen 7 o más segmentos lisos (Ver Fig. 4) (Cupul-Magaña, 2014).



Figura 4. *Scolopendra polymorpha*: ejemplares colectados en el sur de estado de Morelos.

Existen pocos reportes acerca de Scolopendras y su efecto de la mordedura de estos; sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico las reacciones dependerán de la especie de *Scolopendra* y varían según el paciente (Mohri *et al.* 1991; Yildiz *et al.* 2006). La intoxicación en el hombre se manifiesta, habitualmente, por fuerte dolor en el área afectada, entumecimiento, enrojecimiento, descamación, hinchazón, dolor de cabeza, palpitaciones, ansiedad, náusea, prurito, entre otros y los registros de fatalidades son muy escasos. Sin embargo, se ha documentado que los ciempiés, además de ser parte importante de la fauna del suelo y de la dieta de aves y mamíferos terrestres, también están presentes en el ámbito cultural. Por ejemplo, en localidades de Corea son utilizados para aliviar problemas relacionados con golpes, convulsiones,

tétanos, linfagitis, hinchazón, carbunco, neoplasma, alopecia areata y mordidas causadas por víboras (Pemberton, 1999). En México, en la localidad de Tlacuilotepec, Puebla, el potencial tóxico de los ciempiés del género *Scolopendra* es de importancia etnobiológica, ya que se prepara un antídoto, para todo tipo de animal ponzoñoso, en el que el ciempiés vivo es introducido en alcohol (Cupul-Magaña, 2007). Es por ello que es posible considerarlo una fuente potencial de compuestos bioactivos entre ellos péptidos antimicrobianos.

### 3.2 SPC13

*SPC13*, es un péptido antimicrobiano aislado del veneno de *Scolopendra polymorpha*, el cual presenta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (CMI 45 µg/ml), este péptido tiene un peso molecular de 13kDa, y el 48% de su secuencia presenta un 98% de homología con la histona H3 de *S. viridis* (GenkBank: DQ222181.1); también se observa que los aminoácidos más numerosos presentes en *SPC13* son lisina, arginina y leucina (Ver Fig. 5). Cabe mencionar que este patrón es constante en los reportes de histonas o péptidos derivados de histonas con actividad antimicrobiana, en cuyas secuencias existe gran número de aminoácidos cargados positivamente, como arginina y lisina, aminoácidos conservados en muchas Histonas H3 y H4 (Hirsh, 1958; Lee *et al.*2009). Por ello se puede pensar que el péptido *SPC13* corresponde a una Histona H3 con actividad antimicrobiana. Las histonas tienen un peso entre los 11 y 20 kDa (Smith *et al.*2010), que concuerda con el peso de péptido *SPC13*; este péptido se puede considerar como un antimicrobiano potente, como la mayoría de las histonas o derivados de histonas con actividad antimicrobiana, de las cuales sus CMI son menores a 10µg/µl. Hasta el momento *SPC13* es el péptido antimicrobiano, de mayor peso molecular, reportado dentro del género *Scolopendromorpha*; de acuerdo con las características en su secuencia podría ser considerado como el primer reporte de una histona con actividad antimicrobiana dentro de la especie *S. polymorpha* y de la clase Chilopoda (Rodríguez-Alejandro, 2014).

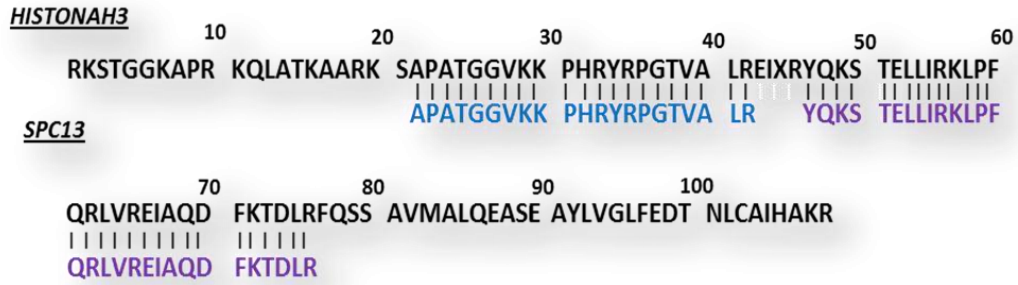


Figura 5. Secuencias parciales de *SPC13*: En color negro se muestra la secuencia de la Histona H3 correspondiente a *Scolopendra viridis* de un total de 109 aminoácidos con un PM de 12kDa, en azul y morado se muestran las secuencias obtenida del péptido *SPC13*, los cuales mostraron un 48% de cobertura de la histona H3.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Una terapia antimicrobiana adecuada puede ser la diferencia entre la curación o recaída de un paciente, sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha impulsado la expansión incesante de microorganismos resistentes. Esta situación ha orillado a la industria farmacéutica a ver casi agotada su capacidad de introducir nuevos fármacos antimicrobianos (World Health Organization, 2018). Por lo anterior, en los últimos años las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de péptidos antimicrobianos, provenientes de diversas fuentes como: venenos animales y tejidos de plantas o animales (Rodríguez-Alejandro, 2014). Recientemente se han descrito péptidos derivados de diversas proteínas, entre ellas histonas, que además de mantener su actividad antimicrobiana, disminuyen notablemente su porcentaje de hemólisis, convirtiéndolo en una opción terapéutica (Padhi *et al.* 2014; Tagai *et al.* 2011; Pavia *et al.* 2012; Sierra *et al.* 2017). De ahí la importancia de caracterizar al menos un péptido derivado de SPC13, que conserve la actividad antimicrobiana y disminuya su actividad hemolítica que pueda ser utilizado como alternativa de tratamiento. Sin embargo, la cantidad de veneno de *S. polymorpha* como el resto del género *Scolopendromorpha* es limitada y el tiempo de regeneración es prologado, por lo que, en este trabajo se realizó la síntesis química de los fragmentos derivados de la digestión de SPC13 con actividad antimicrobiana para su caracterización.

## 5. HIPÓTESIS

Existe un número considerable de péptidos antimicrobianos que son producto de la digestión de proteínas con actividad antimicrobiana, que además de conservar esta actividad, reducen considerablemente el porcentaje de hemólisis. Por lo que se espera que al menos uno de los péptidos derivados de la digestión de SPC13, presente actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos y disminuya su actividad hemolítica.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Determinar las actividades antimicrobiana y hemolítica de SPC13 y los derivados de su digestión frente a diferentes microorganismos patógenos.



## 6.1 Objetivos particulares

- ✓ Determinar la actividad antimicrobiana de *SPC13* frente a diferentes cepas bacterianas.
- ✓ Caracterizar química y funcionalmente a los péptidos producto de la digestión trípica de *SPC13*

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 6 se muestra la estrategia experimental, que fue utilizada para cumplir con los objetivos establecidos en este proyecto.

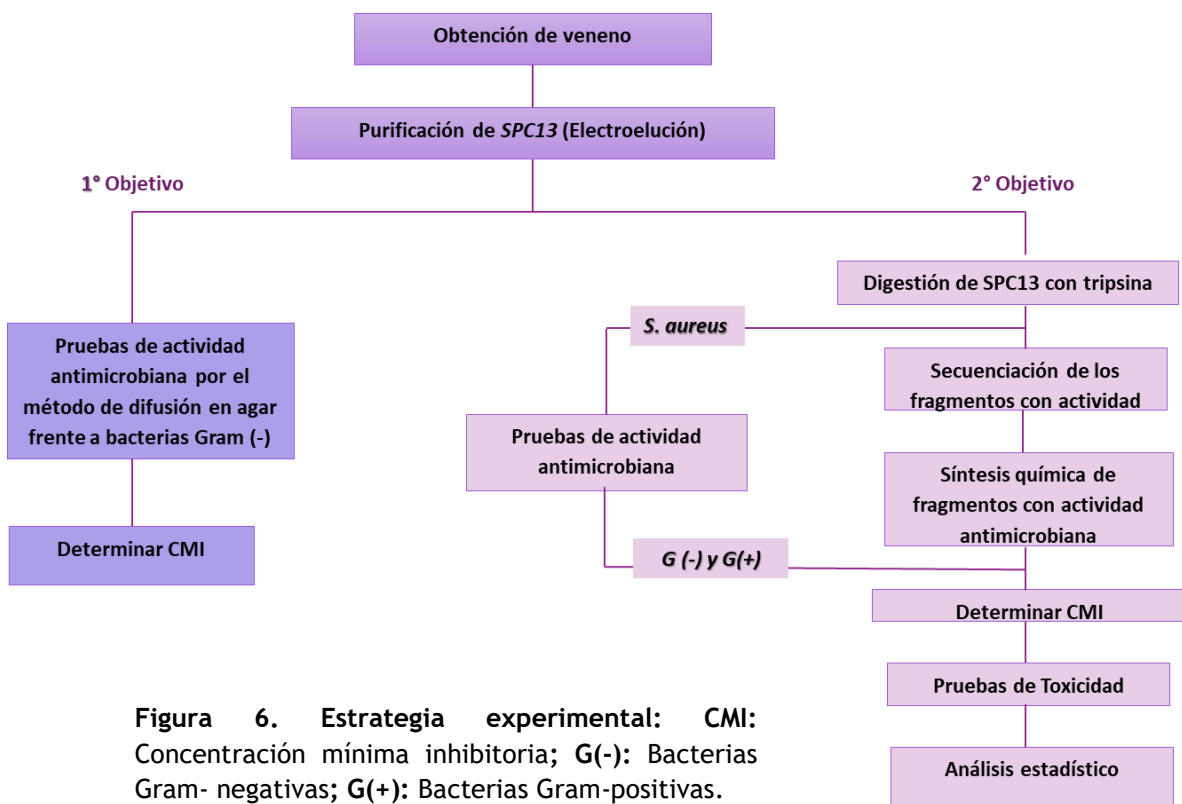


Figura 6. Estrategia experimental: CMI: Concentración mínima inhibitoria; G(-): Bacterias Gram- negativas; G(+): Bacterias Gram-positivas.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Obtención del veneno

Para realizar la ordeña, los ciempiés fueron adormecidos colocándolos en un contenedor a 4 °C durante 5 minutos, finalmente el veneno se colectó con la ayuda de una punta para micropipeta, que se colocó en un tubo eppendorf con 20 µl de agua bidestilada. Posteriormente se realizó la cuantificación de la proteína total por el método de Lowry y finalmente se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

### 8.2 Purificación de SPC13

Para la purificación del péptido se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 20% donde se colocó veneno total (~800 µg) repartido en diez pozos. Finalizada la electroforesis, se tiñó un carril con azul de comassie, este carril fue utilizado como patrón para cortar la banda de 13 kDa (SPC13) en el resto del gel no teñido. Posteriormente los cortes del gel se depositaron en membranas Spectrum (MWCO: 8000 Da) y se colocaron en una cámara de electroelución en un buffer de 50 mM Tris-HCl pH 6.8 pasando corriente a 75 volts, por 2 h a 4 °C. A continuación, se dializó contra 2 lt de H<sub>2</sub>O-MiliQ por 2 h a 4 °C en agitación constante, con cambios cada 30 min. Finalmente, el péptido fue liofilizado y almacenado para las pruebas de actividad antimicrobiana (Rodríguez-Alejandro, 2014).

### 8.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de SPC13 por el método de difusión en agar

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando una cepa Gram-positiva como control positivo (*S. aureus* ATCC 29213) y dos Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853). Las tres cepas se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C durante 16 horas, los pre-inóculos se dejaron crecer hasta alcanzar una concentración de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/ml (escala de McFarland) correspondiente a una densidad óptica de 0.070-0.13 (λ 600 nm) (Normas CLSI, 2017). Posteriormente, los inóculos se estiraron, con ayuda de un hisopo estéril, sobre cajas Petri con medio agar Müeller-Hinton (MH). Una vez sembrados, al inóculo se colocaron alícuotas a diferentes concentraciones de SPC13 y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Detectando el efecto antimicrobiano por el halo de inhibición formado en el lugar donde se colocaron las muestras.

#### **8.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de SPC13 y los péptidos derivados de SPC13**

La determinación de la MIC se realizó mediante el método de microdilución; las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en presencia (control positivo) y ausencia (control negativo) de ampicilina, así como de SPC13 y sus péptidos derivados, los cuales se añadieron a un inóculo de bacterias en medio líquido (hasta igualar la escala de Mc Farland  $1 \times 10^8 = 0.070- 0.080$  nm). El seguimiento de las cinéticas se realizó midiendo el cambio de absorbancia (595 nm) respecto al tiempo de incubación de los inóculos de bacterias en medio líquido (Normas CLSI, 2017). Cabe mencionar que esta misma prueba se realizó con los péptidos sintéticos, cuya secuencia se basó en la secuencia de los productos de la digestión de SPC13. Con la finalidad de conocer si la actividad de SPC13 y sus derivados tienen actividad bactericida o bacteriostática, al final de cada cinética se tomaron 10  $\mu$ l del pozo y se inoculó en cajas de agar MH por 18 h a 37°C.

#### **8.5 Digestión de SPC13**

Para la obtención de los péptidos derivados de SP13 se llevó a cabo una digestión triptica de acuerdo con Kinter y Sherman (2000). Una vez purificado SPC13, en el día 1: 1) se resuspendió en 100  $\mu$ l de urea 6M/Tris-HCl 50 Mm, pH 7.8 y se sonicó por 2 min. 2) la muestra se redujo por la adición de 5 $\mu$ l de DTT 200 mM/Tris-HCl 50 Mm, pH 7.8, incubando por 1hr a temperatura ambiente; 3) la alquilación se llevó a cabo añadiendo 20  $\mu$ l de iodoacetamida 200 mM/Tris-HCl 50 Mm, pH 7.8, incubando la muestra por 1hr, a temperatura ambiente; 4) posteriormente se agregaron 20  $\mu$ l de agente reductor (DTT 200 mM/Tris-HCl 50 mM, pH 7.8) incubando a temperatura ambiente por 1 hr; 5). Se redujo la concentración de urea por la adición de 775  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MiliQ; 6) la digestión se llevó a cabo agregando tripsina grado secuencia (Trypsin, Modified Sequencing Grade, Roche) a una concentración de 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l (en proporción 1:50 del total de la proteína) y se incubó a 37°C overnight. Día 2: 7) La reacción se detuvo sumergiendo el tubo con la muestra en nitrógeno líquido e inmediatamente se llevó a sequedad para purificar los productos de la digestión por RP-HPLC (Kinter and Sherman, 2000). Posteriormente se liofilizaron y almacenaron a -4° C, hasta su purificación.

#### **8.6 Purificación por RP-HPLC de los péptidos tripticos**

La purificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en un cromatógrafo Agilent 1100, en una columna C18 analítica de fase reversa (RP) (Vydac 218TP54). La columna se equilibró con ácido trifluoroacético (TFA) 0.12% en una hora, la muestra se eluyó por 60 min, usando

un gradiente lineal de 0% de buffer A (TFA 0.12% en agua) a 60% de buffer B (TFA 0.1% en acetonitrilo) con un flujo de 1 ml/min. Las fracciones se colectaron manualmente por monitoreo de absorbancia a 230 nm.

### 8.7 Determinación de secuencia de aminoácidos

La determinación de secuencia de aminoácidos se realizó por el método de degradación de fuch (Edman, 1967), con ayuda de un secuenciador automático. Es importante mencionar que este paso se realizó en Proteomics Discovery Platform IRCM (Institut de Recherches Cliniques de Montreal).

### 8.8 Síntesis y purificación de péptidos derivados de SPC13

Se realizó la síntesis química de los péptidos derivados en fase sólida utilizando la metodología de Fmoc en un sintetizador Automated Microwave Peptide Synthesizer Biotage® Initiator+ Alstra™ (Merrifield., 1963). Utilizando las resinas Fmoc-Arg (Pbf)-Wang, Fmoc-Lys(Boc)-Wang y Rink Amide MBHA (100-200 mesh). El clivaje y desprotección de los péptidos se llevó usando: TFA, Tioanisol, 1-2 Etanodiol y anisol (V/V 90:5:3:2) para los péptidos que en su secuencia contienen Met; para el resto de los péptidos se utilizó una solución de TFA, H<sub>2</sub>O-MiliQ y triisopropilsilano (TIS) (V/V 95: 2.5:2.5). La resina se removió por filtración y los péptidos desprotegidos en solución fueron precipitados con éter frío. Los péptidos crudos se resuspendieron en Buffer B (10% ACTN) para ser purificados por RP-HPLC utilizando una columna analítica C12, en un gradiente lineal de 10 a 50% de B en 30 min.

### 8.9 Pruebas de actividad antimicrobiana por ensayos de microdilución

Para un análisis más detallado de la actividad antimicrobiana se realizaron cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución de acuerdo con lo establecido en el manual M100 (Normas CLSI, 2017); se prepararon diferentes concentraciones de los péptidos SPC13-5 COO- y SPC13-DIC; posteriormente fueron añadidos a un inóculo de *S. aureus* (ATTC 29213) en medio líquido a una concentración  $1 \times 10^8$  según la escala de Mc Farland (0.070- 0.080 nm). El seguimiento de las cinéticas de inhibición se realizó en placas de 96 pozos, midiendo el cambio de absorbancia (595 nm) cada dos horas, respecto al tiempo de incubación de los inóculos de bacterias en medio líquido en presencia de H<sub>2</sub>O-MiliQ (Control Negativo), Ampicilina a una concentración de 1 µg/µl (Control Positivo) y SPC13-5 COO- (58.1 y 116.2 µM), además de SPC13-DIC (144.1 µM).

## 8.10 Actividad hemolítica

Este ensayo se determinó por medio de la actividad hemolítica del péptido mediante la incubación de suspensiones celulares de eritrocitos humanos (EH), proveniente de un donador sano con tipo de sangre O RH+. Los eritrocitos se lavaron intensivamente en buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) (10 Mm, pH 7.2) y posteriormente fueron centrifugados durante 10 min a 2500 rpm, entre cada lavado, hasta que la absorbancia del sobrenadante fuera próxima a la solución de lavado. Los eritrocitos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en presencia de Tritón X-100 al 10% y H<sub>2</sub>O bidestilada (controles positivos), buffer PBS (control negativo) y los péptidos derivados de SPC13. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante. Se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de  $\lambda$  415 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó de acuerdo con la fórmula:

$$\%H = \frac{DO_M - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$
$$\%H = \frac{DO_M - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

## 8.11 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando la plataforma estadística GraphPad Prism (Prism 5.0 para Windows, GraphPad Software 2016 Inc., La Jolla, CA) bajo ANOVA de una cola y la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ). Todos los datos se expresaron como media de tres experimentos independientes y error estándar ( $\bar{X} \pm SEM$ ).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Purificación de SPC13

En la imagen 7a se muestra la ubicación de SPC13, la cual tuvo un rendimiento del 6.8% aproximadamente con respecto al total de las proteínas presentes en el veneno total (por cada ~4.5 mg de veneno se purificó  $\pm$  0.306 mg de SPC13). En la figura 7b se muestra el perfil electroforético de acrilamida SDS-PAGE al 16% de SPC13 en condiciones desnaturalizantes (en 10 minutos de ebullición a 95°C adicionando 0.05% mercaptoetanol-2). En la imagen se puede observar que SPC13 es una sola cadena de aminoácidos.

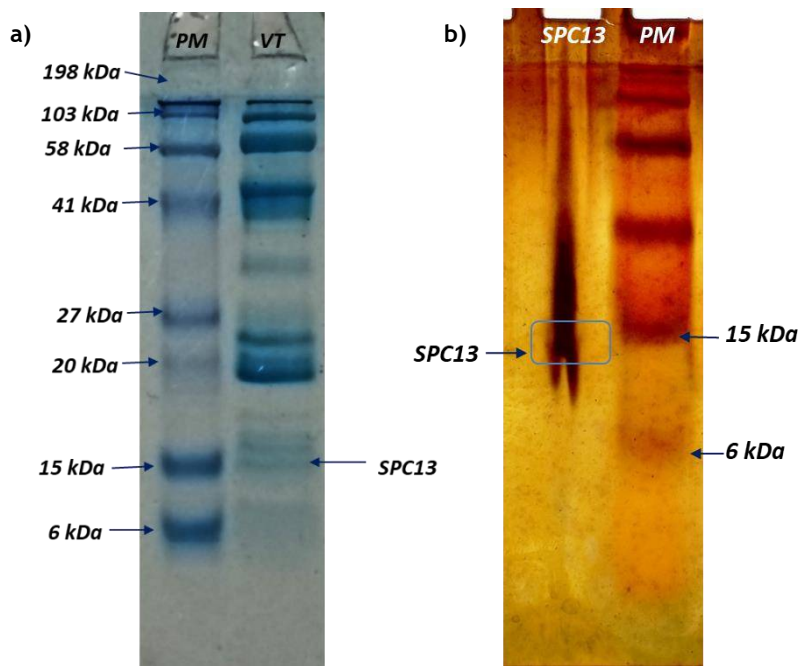


Figura 7. Perfil electroforético de veneno total de *S. polymorpha* y ubicación de SPC13: a) Electroforesis de Acrilamida SDS-PAGE al 16% de veneno total teñido con azul de Comassie: la flecha indica la ubicación de SPC13; b) Electroforesis de Tricina SDS-PAGE al 16% en condiciones desnaturalizantes de SPC13, este gel fue teñido con plata.

### 9.2 Determinación de actividad antimicrobiana de SPC13 por el método de difusión en agar

En la tabla 3 se presentan los diámetros de los halos de inhibición de SPC13 frente a las tres cepas utilizadas en este proyecto. De las dos concentraciones utilizadas para *S. aureus* y *P. aeruginosa* (1.6 y 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), la cepa Gram-positiva resultó ser más susceptible en ambas concentraciones de SPC13 (Ver Fig. 8a), mientras que frente *P. aeruginosa* SPC13 realizó halos de menor diámetro (Ver Fig. 8b), sin embargo y de acuerdo con la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ) no existe diferencia significativa con respecto al control positivo (ampicilina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con ninguna de

las dos cepas. En contraste, SPC13 no fue activo frente a *E. coli*, en ninguna de las concentraciones probadas (3.0 y 6.6 µg/ml), mostrando diferencia significativa con respecto al control negativo (Ver Fig. 8c). Es importante mencionar que las concentraciones utilizadas en este ensayo se establecieron de acuerdo con la disponibilidad de SPC13.

Tabla 3. Actividad de SPC13 frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Péptido SPC13 µg/ml	Diámetro de los halos de inhibición de las cepas evaluadas (mm)		
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)
1.6	ND	5.0 ± 1	6.1 ± 1
3.0	SA	8.7 ± 0.7	10.0 ± 1
6.6	SA	ND	ND
<b>Ampicilina</b>			
5.0	18.3 ± 1	11 ± 1	8 ± 1
CN	SA	SA	SA

ND: No Determinado; SA: Sin Actividad; mm: Milímetros; CN: Control negativo (Carril sin muestra procesado de la misma forma que SPC13); CP: Control Positivo (ampicilina 1µg/µl). Los valores están dados en la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

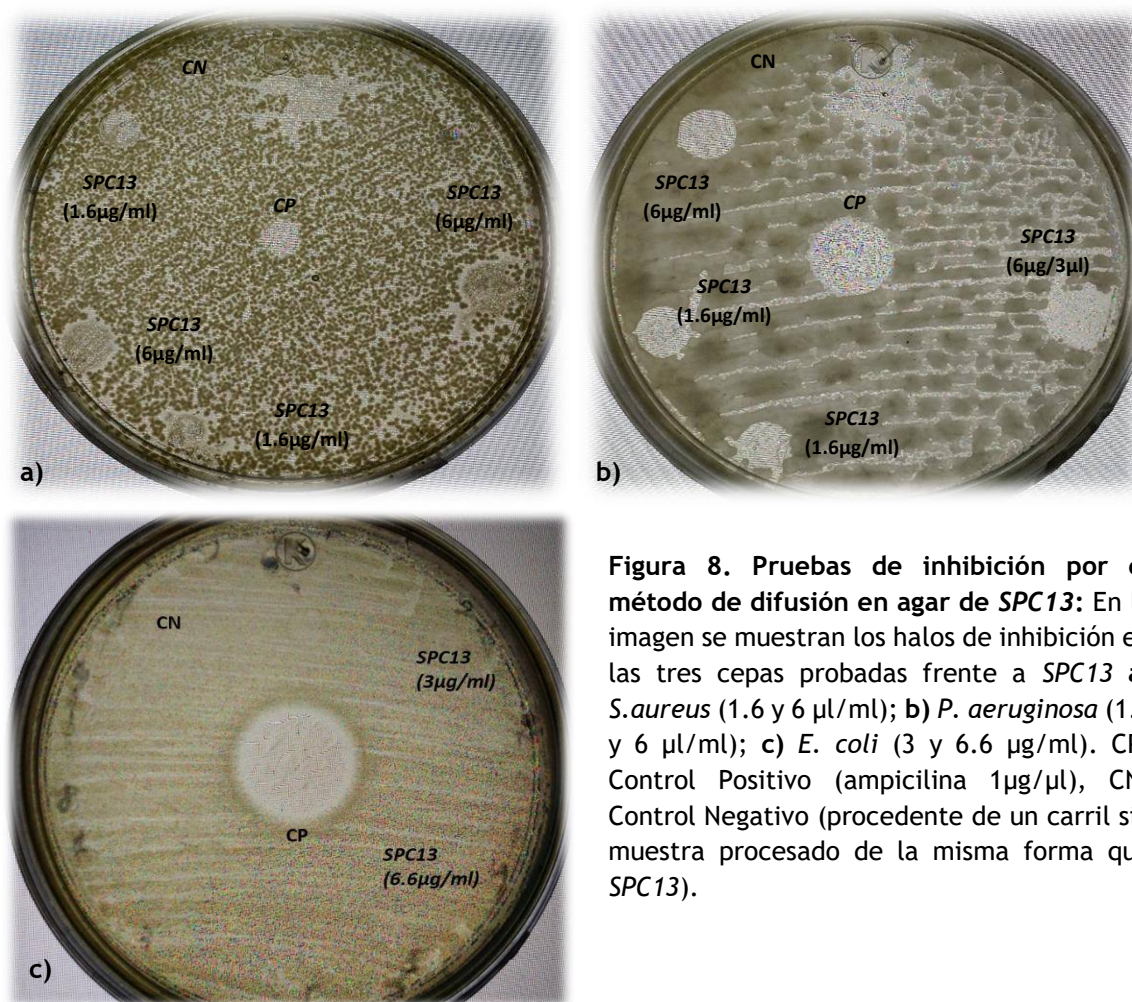


Figura 8. Pruebas de inhibición por el método de difusión en agar de SPC13: En la imagen se muestran los halos de inhibición en las tres cepas probadas frente a SPC13 a) *S. aureus* (1.6 y 6 µl/ml); b) *P. aeruginosa* (1.6 y 6 µl/ml); c) *E. coli* (3 y 6.6 µg/ml). CP: Control Positivo (ampicilina 1µg/µl), CN: Control Negativo (procedente de un carril sin muestra procesado de la misma forma que SPC13).

### 9.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de SPC13

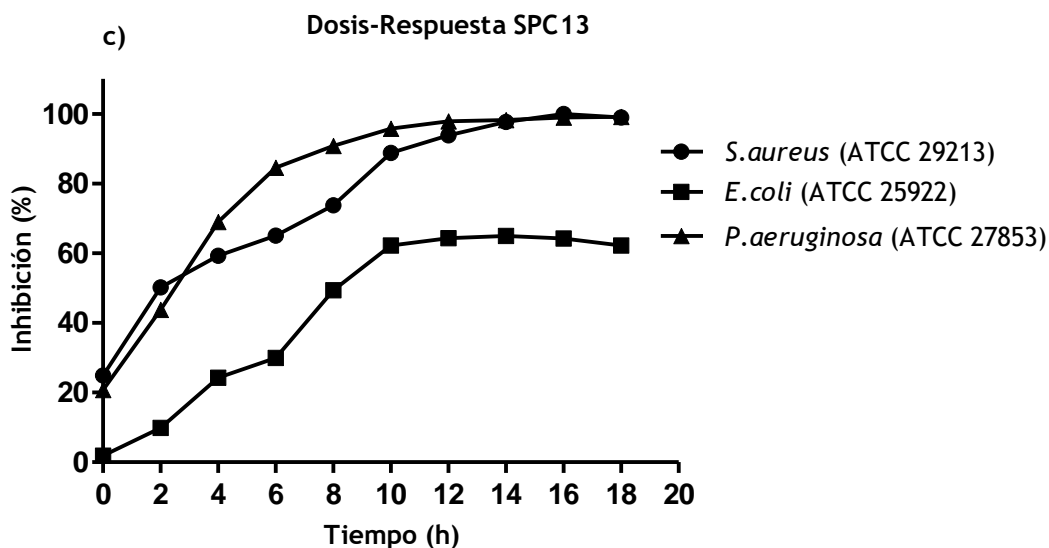
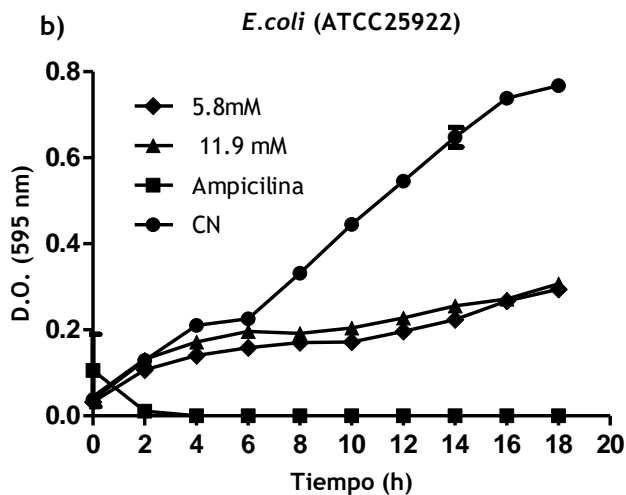
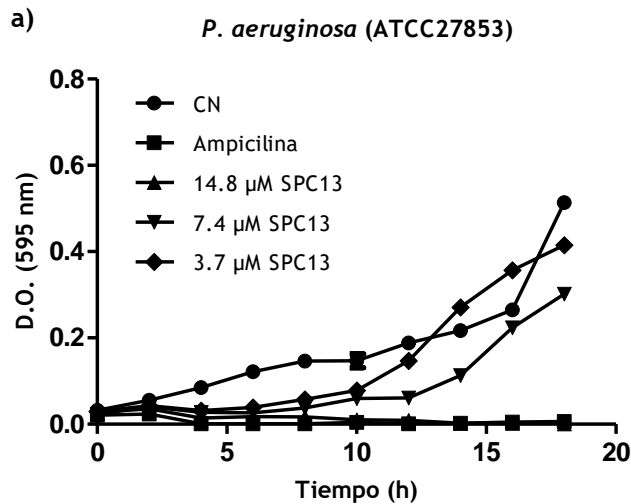
Las cinéticas de crecimiento se realizaron de acuerdo con el punto 8.4. Donde *S. aureus* se utilizó como control positivo para la actividad antimicrobiana de SPC13 a una concentración de 3.5  $\mu\text{M}$  (Rodríguez-Alejandro, 2014); para el caso de *P. aeruginosa* se usaron tres concentraciones diferentes (14.8, 7.4 y 3.7  $\mu\text{M}$ ). En cuanto a *E. coli*, sólo se utilizaron dos concentraciones del péptido (5.8 y 11.9  $\mu\text{M}$ ). Cabe mencionar que las concentraciones de SPC13 utilizadas en este experimento se adecuaron a la disponibilidad de SPC13. La CMI de *P. aeruginosa* fue de 14.8  $\mu\text{M}$ , ya que a esta concentración inhibió al 100% el crecimiento a las 18 hrs de crecimiento (Fig. 9a) además de que presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control negativo al mismo tiempo. La actividad antimicrobiana de SPC13 es dosis- dependiente para esta cepa debido a que a mayor concentración de SPC13 menor crecimiento bacteriano. SPC13 no inhibió por completo el crecimiento de *E. coli*, se ya que se observó el máximo de inhibición a una concentración 11.9 $\mu\text{M}$  (la más alta usada en este experimento), mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los controles negativo y positivo (Ver tabla 4). Los resultados, al final de la cinética, mostraron que SPC13 tiene actividad bactericida frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mientras que para *E. coli* tiene actividad bacteriostática (Ver Fig. 9c).

Tabla 4. CMI de SPC13 frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Microorganismos	MIC	
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$
	SPC13	Ampicilina
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	5.8*	25
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	14.8	25
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	3.5	25

\* 50% de inhibición





**Figura 9. Determinación de MIC de SPC13:** a) Cinética de inhibición de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) en presencia de SPC13 con tres diferentes concentraciones (14.8, 7.4 y 3.7  $\mu\text{M}$ ); b) Cinética de crecimiento *E. coli* (ATCC25922) en presencia de SPC13 con dos diferentes concentraciones (5.8 y 11.9  $\mu\text{M}$ ); c) Curva Dosis-Respuesta de SPC13 frente a las tres cepas probadas.

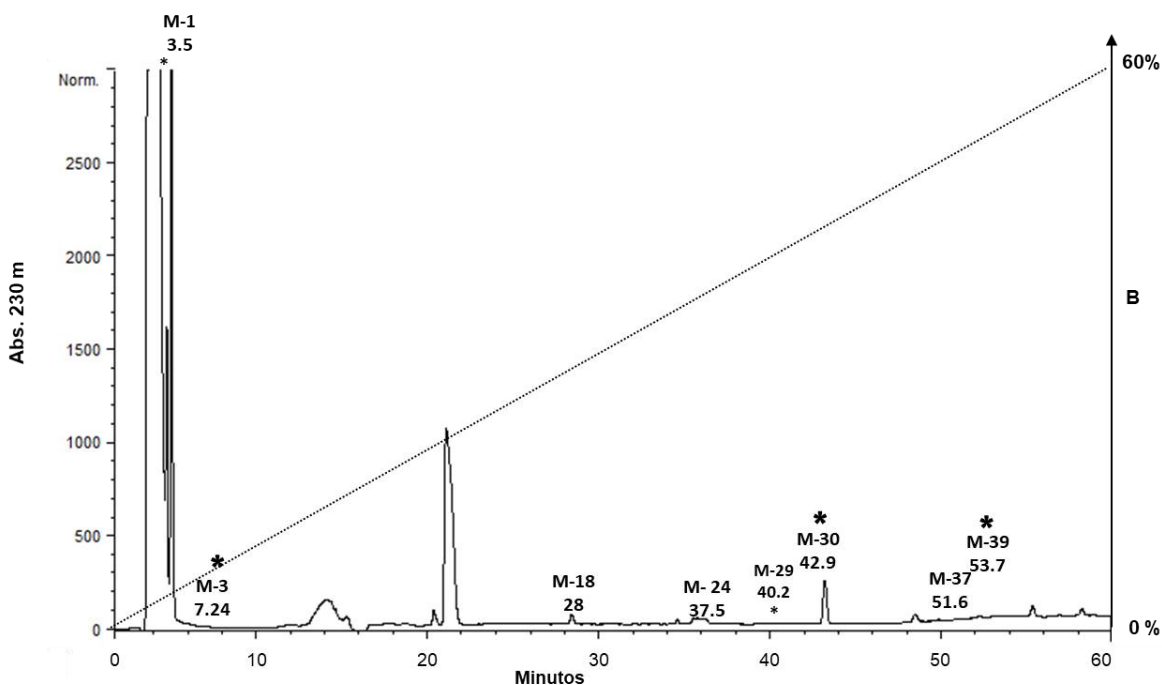
En los tres experimentos se utilizó como control negativo (CN) un carril sin muestra procesado de la misma forma que SPC13) y como control positivo (CP) (ampicilina  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Todos los datos se expresaron como media de tres experimentos independientes y error estándar ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ).

## 9.4 Digestión de SPC13

Se digirieron 679.4, 642.2, 136 y 270 µg de SPC13, de forma independiente y para cada concentración se ajustó el volumen de reacción de acuerdo con lo establecido en el punto 8.5.

## 9.5 Purificación por RP-HPLC de péptidos derivados de la digestión trípica de SPC13

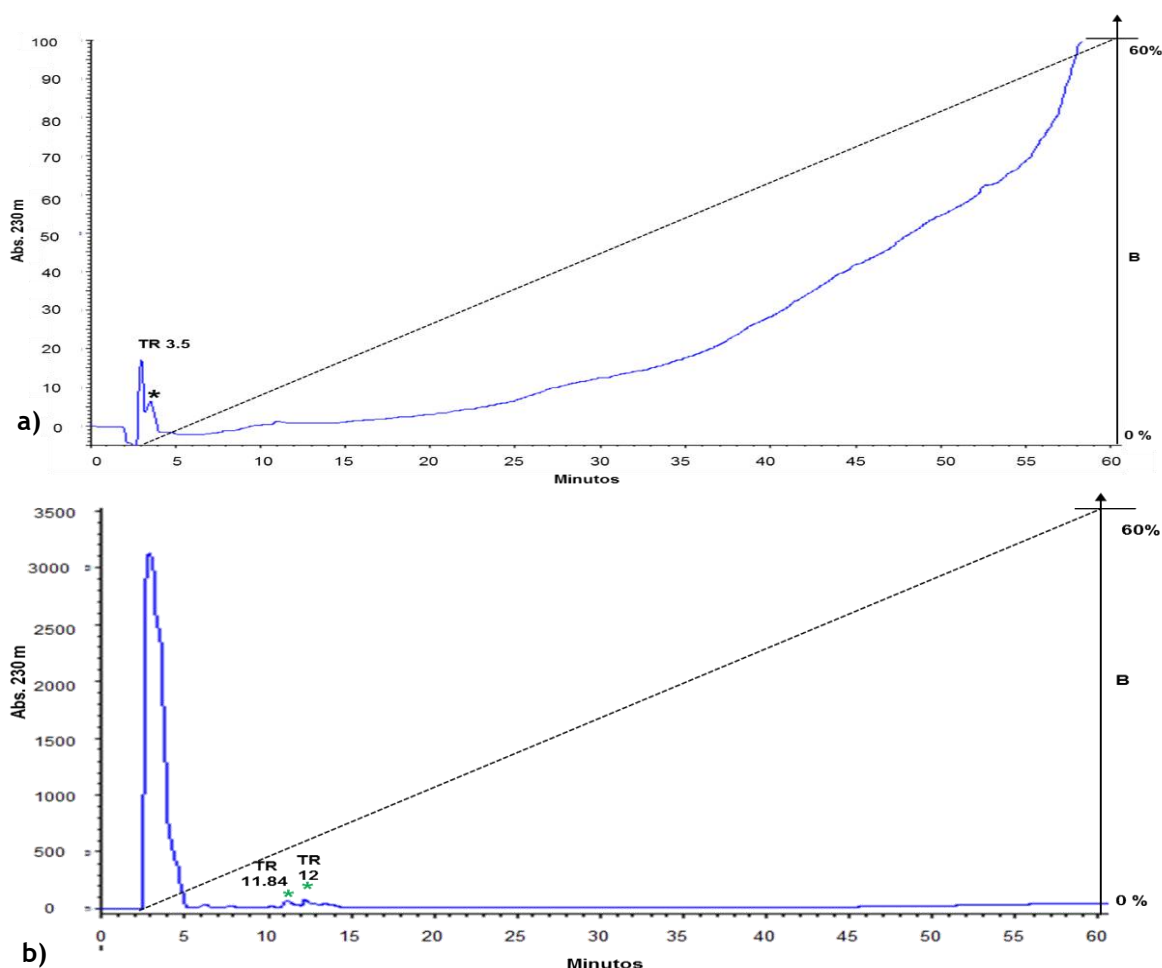
Los derivados de la digestión fueron purificados por RP-HPLC, utilizando una columna C18, en un gradiente lineal de 0% de buffer A a 60% de buffer B, con un flujo de 1ml/min, en un tiempo de elusión de 60 min y se colectó un total de 44 picos, en la figura 10 solo se muestran las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana, las cuales fueron nombradas M-3, M-18, M-24, M-29, M-37, M39 y difusión (Ver apartado 9.6). Posteriormente cada una de las fracciones se liofilizaron y almacenaron a -4°C, hasta su uso para las pruebas de actividad antimicrobiana y secuenciación.



**Figura 10. Perfil cromatográfico representativo de las digestiones de SPC13:** Se digirieron 679.4 µg de SPC13, los productos fueron purificados por RP-HPLC, utilizando una columna C18, en un gradiente lineal de 0% de buffer A (TFA 0.12% en H<sub>2</sub>O) a 60% de buffer B (TFA en CH<sub>3</sub>CN), con un flujo de 1ml/min y un tiempo de elusión de 60 min. En la imagen solo se muestran los derivados que presentaron actividad antimicrobiana. \*Derivados de SPC13 con actividad antimicrobiana que fueron enviados a secuenciar. Este experimento se realizó cuatro veces de forma independiente.

### 9.5.1 Controles utilizados para la purificación de péptidos derivados

Para la purificación de los productos de la digestión de *SPC13* se consideraron dos controles: *SPC13* sin digerir y el buffer de digestión, sin la presencia de péptido. Ambos controles fueron inyectados de forma independiente en el RP-HPLC utilizando una columna C18 en un gradiente lineal de 0% de buffer A (TFA 0.12% en H<sub>2</sub>O) a 60% de buffer B (TFA en CH<sub>3</sub>CN). En la figura 11a se puede observar una fracción con TR de 3.5, tiempo reportado por Rodríguez-Alejandro (2014), en una fracción de VT que presentó actividad antimicrobiana. En el cromatograma obtenido del buffer de digestión sin péptido (ver Fig. 11b), se observan dos fracciones con TR de 11.84 y 12, que son propios del buffer de digestión, los cuales son utilizados como controles negativos en los ensayos de actividad antimicrobiana. (Agilent technologies, 2013).



**Figura 11. Perfil cromatográfico de los controles de la digestión de *SPC13*: a) 121µg de *SPC13*; b) Reactivos utilizados en la digestión. Ambas muestras fueron inyectadas, por separado, en RP-HPLC utilizando una columna C18, un gradiente lineal de 0% de buffer A (TFA 0.12% en H<sub>2</sub>O) a 60% de buffer B (TFA en CH<sub>3</sub>CN), con un flujo de 1ml/min y un tiempo de elusión de 60 min, colectando por fracciones.**

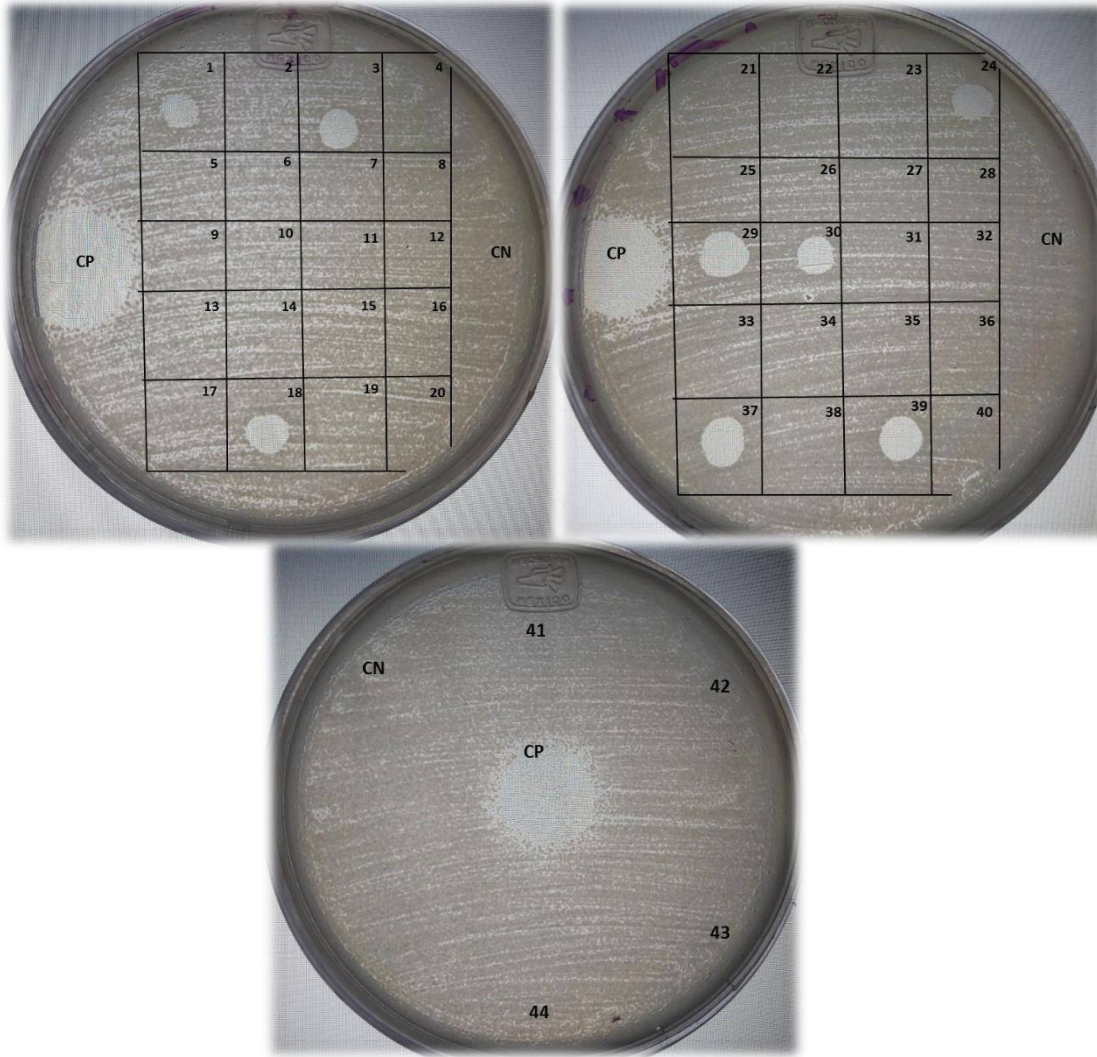
## 9.6 Pruebas de actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron por el método de difusión en agar frente a *S. aureus* (ATCC 29213). Los derivados trépticos se resuspendieron en 20µl de H<sub>2</sub>O-MQ, de los cuales se tomaron 5µl para la prueba. En la tabla 5 y figura 12 se muestran los tiempos de retención (TR) de los productos de digestión de SPC13, que mostraron actividad antimicrobiana: M-1 (TR: 3.5), M- 3 (TR: 7.2), M-18 (TR: 13.2), M-24 (TR: 28), M-24 (TR:37.5), M-29 (TR: 40.2), M-30 (TR: 42.9, M-37 (TR: 51.6) y M-39 (TR: 53.7).

Tabla 5. Tiempos de retención de los productos de la digestión de SPC13 con actividad antimicrobiana

<b>No. De Muestra</b>	<b>TR</b>
M-1	3.5
M-3*	7.24
M-18	28
M-24	37.5
M-29	40.2
M-30*	42.9
M-37	51.6
M-39*	53.7

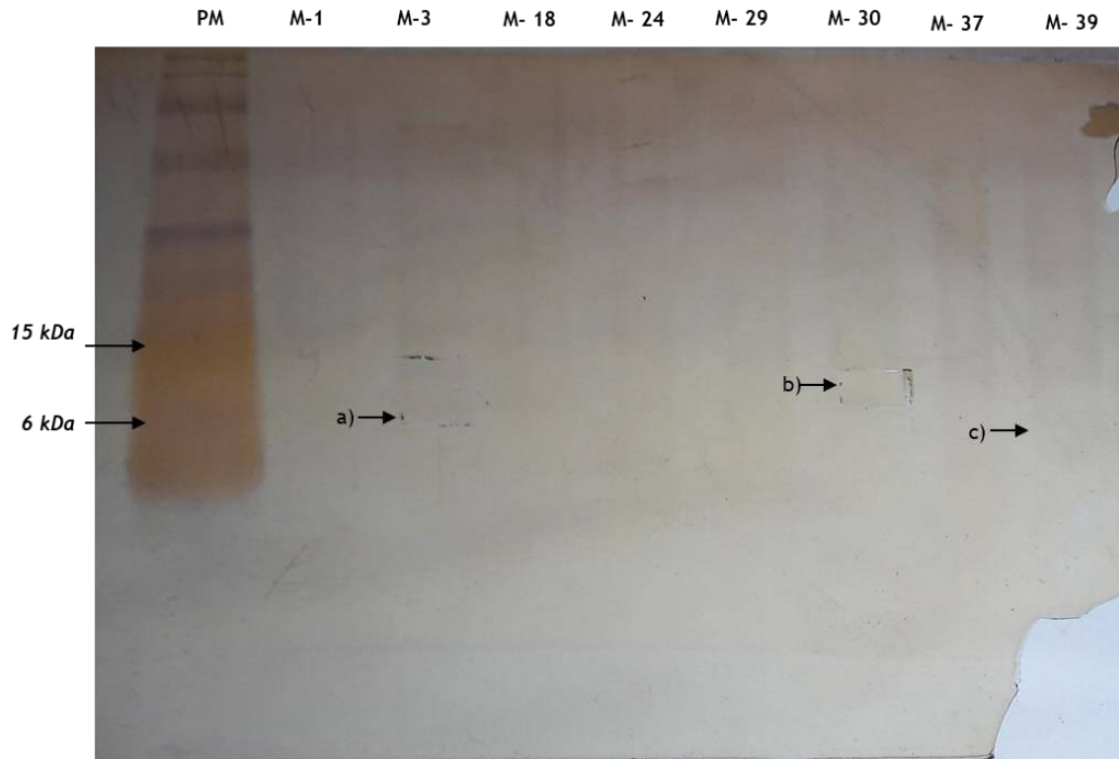
\* TR que se secuenciaron



**Figura 12. Pruebas de actividad antimicrobiana de los productos de digestión trípica de SPC13:** En la imagen se muestran los halos de inhibición de los productos de la digestión de SPC13 frente a *S. aureus* (ATTC 29213). CN: Control Negativo (Buffer de digestión); CP: Control Positivo (Ampicilina 1µg/µl).

### 9.7 Secuenciación de péptidos derivados de la digestión trípica de SPC13

Se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 20% con las muestras que presentaron actividad antimicrobiana. En el perfil electroforético solamente se pudieron observar bandas de peso molecular de 6 y 7 kDa en las muestras M-3, M-30 y M-39 (Fig. 13).



**Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE al 20% de las fracciones con actividad antimicrobiana:** En la imagen se muestran las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana. Las flechas señalan las bandas que se tomaron para secuenciar. a) Banda de 6.8 kDa; b) banda 7.5 kDa; c) 6.5 kDa. Este gel fue teñido con plata.

La secuenciación de los productos de la digestión se realizó por degradación de Edman en el Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM). En la tabla 6 se presenta cinco secuencias parciales del péptido M-3 (TR: 7.24), los fragmentos secuenciados corresponden a péptidos aniónicos con pesos moleculares menores a los 2.2 kDa.

**Tabla 6. Péptidos derivados de SPC13**

Derivados de SPC13	Secuencia	PM (kDa)
SPC13-3.1	SLWNFFMFIGGK	1.7
SPC13-3.2	GSPVDSIDR	0.9
SPC13-3.3	CYHEVNENECGSYKR	1.8
SPC13-3.4	FIDYDWYMQDK	1.5
SPC13-3.5	DKDIVECLNQNDKYNPK	2.2

Con las secuencias obtenidas (Tabla 6), se realizó un BLAST donde mostró un 100% de homología con la fosfolipasa A2 Scol/Pla presente en el veneno de *S. viridis* Say (NCBI ID:C1JAR9.1) reportada por González y colaboradores en el 2010 (González, 2010). Sin embargo, se descartó la homología a la fosfolipasa A2 Scol/Pla debido a que en el alineamiento los fragmentos están dispersos por toda la secuencia de la fosfolipasa. En paralelo se realizó el alineamiento con las secuencias parciales de SPC13, reportadas por Rodríguez-Alejandro, así como la histona H3 reportada en el veneno de *S. viridis* (Rodríguez-Alejandro,2014).

También se realizó una búsqueda en cinco bases de datos de péptidos antimicrobianos (Tabla 7), donde los péptidos SPC13-3.2, SPC13-3.3 y SPC13-3.5, tuvieron resultados en la base de datos CAMPR<sub>3</sub>, con homologías de entre 36-54% con fosfolipasas,  $\beta$ -defensinas y lisozimas reportadas en reptiles y algunos crustáceos (Tabla 8). Sin embargo, en ninguno de los casos se consideró a los derivados de SPC13 como homología de alguna de las proteínas antes mencionadas.

Tabla 7. Base de datos de PAMs.

Base de datos	Enlace
BaAMPs	<a href="http://www.baamps.it/tools/blast">http://www.baamps.it/tools/blast</a>
PDB3	<a href="http://aps.unmc.edu/AP/main.php">http://aps.unmc.edu/AP/main.php</a>
CAMP <sub>R3</sub>	<a href="http://www.camp.bicnirrh.res.in/">http://www.camp.bicnirrh.res.in/</a>
Antisthaphybase	<a href="http://www.antistaphybase.com/">http://www.antistaphybase.com/</a>
PeptideDB	<a href="http://www.peptides.be/">http://www.peptides.be/</a>
Hemolytik	<a href="http://crdd.osdd.net/raghava/hemolytik/">http://crdd.osdd.net/raghava/hemolytik/</a>
DBAASP	<a href="https://dbaasp.org/home">https://dbaasp.org/home</a>

Tabla 8. Resultados de BLAST en CAMP<sub>R3</sub>

Péptido derivado de SPC13	ID CAMP <sub>R3</sub>	UNIPROT	Fragmentos de Secuencia	Identidad (%)	Características
SPC13-2 GSPVDSIDR	CAMPSQ37	A6MEY4	<sup>33</sup> GTPLDQLDR <sup>41</sup>	36	Fosfolipasa A2, aislada de <i>B. faciatius</i> , CMI 0.1 y 0.4 μM para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> respectivamente.
	CAMPSQ3897	B3A003	<sup>73</sup> CHFDVNSDSCGYFQ <sup>86</sup>	36	Lisozima 3, aislada de <i>C. virginica</i>
SPC13-3 CYHEVNEECGSYKR	CAMPSQ2119	P83673	<sup>73</sup> CHWDVNSDSCGYFQ <sup>85</sup>	36	Lisozima 1 <i>C. virginica</i>
	CAMPSQ5956	G4U4J9	<sup>96</sup> YHDWYHSSTCGSYK <sup>109</sup>	50	Big defensina BD3b, <i>M. galloprovincial</i>
	CAMPSQ6108	H9AXM8	<sup>101</sup> VHDWYHSSTCGSYK <sup>114</sup>	50	Big defensin, <i>M. galloprovincial</i>
	CAMPSQ3940	Q0H293	<sup>68</sup> YRGGNLGVCGSYK <sup>80</sup>	54	Big defensin, <i>A. irradians</i>
	CAMPSQ2018	Q6JK69	<sup>89</sup> DKAVAICLRENLDTYNK <sup>106</sup>	44	Homólogo Fosfolipasa A2, <i>B. atrox</i>
SPC13-5 DKDIVECLNQNDKYNPK	CAMPSQ3860	Q9IAT9	<sup>88</sup> DKAVAICLRENLGTYNKK <sup>105</sup>	44	Homólogo Fosfolipasa A2 BnSP-7, <i>B. paoloensis</i>
	CAMPST586	Q90249	<sup>89</sup> DKAVAFCLRENLGTYNKK <sup>106</sup>	44	Complejo BthTx-I, <i>B. jararacussu</i>
	CAMPSQ1976	Q90250	<sup>89</sup> DKAVAFCLRENLGTYNKK <sup>106</sup>	44	Homólogo de fosfolipasa A2

## 9.8 Síntesis de los péptidos derivados de la digestión de SPC13

Se realizó la síntesis química de los péptidos derivados, con una variante de cada uno (Ver Tabla 9), de acuerdo con el punto 8.8 y de cada péptido sintetizado se obtuvieron 10 mg. Los péptidos se enumeraron del 1 al 5 seguido de la especificación de la variante, ya sea con terminación COO<sup>-</sup> que es el péptido resultante de la digestión triptica y su variante, NH<sub>2</sub> (Versión espejo). Cabe mencionar que esta parte del proyecto se realizó en una estancia en la Aix Marseille Université, en el *Instituto de Ciencias Moleculares bajo la tutoría de la PhD. Olga Iranzo*.



Tabla 9. Péptidos sintetizados derivados de SPC13.

Péptido	Secuencia	Carga neta
SPC13-3.1 COO	SLWNFFMFIGGK-COO	1
SPC13-3.1 NH <sub>2</sub>	KGGIFTMFFFNWLS-COO	1
SPC13-3.2 COO	GSPVDSIDR-COO	-1
SPC13-3.2 NH <sub>2</sub>	RDISDVPSG-COO	-1
SPC13-3.3 COO	CYHEVNEGSGSYKR-COO	-1
SPC13-3.3 NH <sub>2</sub>	RKYSGCENENVEHYC-COO	-1
SPC13-3.4 COO	FIDYDWYMQDK-COO	-2
SPC13-3.4 NH <sub>2</sub>	KDQMYWDYDIF-COO	-2
SPC13-3.5 COO	DKDIVECLNQNDKDYNPQ-COO	-2.1
SPC13-3.5 NH <sub>2</sub>	KPNYDKDNQNLCEVIDKD-COO	-2.1
SPC13-DIC	Péptido sintético*	-1

\* Secuencia protegida por Patente.

### 9.9 Pruebas de actividad antimicrobiana con los péptidos sintetizados

De forma cualitativa se determinó la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos por el método de difusión en agar utilizando cuatro concentraciones: 10, 25, 50, 100 µg/5µl frente a *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853); sin embargo, sólo los péptidos SPC13-3.5 COO y SPC13-DIC mostraron actividad con zonas de inhibición no definidas únicamente frente a *S. aureus* (Ver Fig. 14). Por lo que se determinó realizar los ensayos en medio líquido.

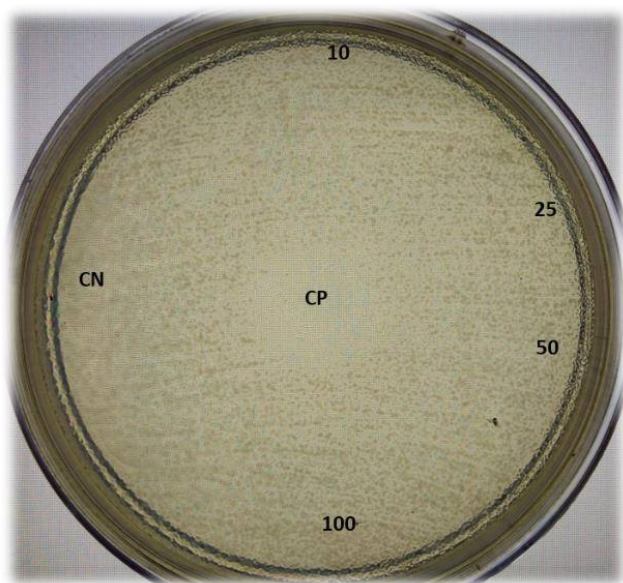


Figura 14. Pruebas de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar de los péptidos derivados de SPC13: En la imagen sólo se muestra la caja donde SPC13-DIC tuvo baja actividad frente a *S. aureus* (ATCC 29213). CN: Control Negativo (H<sub>2</sub>O-MQ); CP: Control Positivo (Ampicilina 1µg/µl).

### 9.9.1 Pruebas de actividad antimicrobiana por el método de microdilución

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron por el método de microdilución acuerdo con el punto 8.9. En este ensayo se utilizaron dos diferentes concentraciones (58.1 y 116.2  $\mu\text{M}$ ) de SPC13-3.5 COO<sup>-</sup> y una para SPC13-DIC (144.1  $\mu\text{M}$ ). En la figura 3 se puede observar que a las ambas concentraciones SPC13-5 COO<sup>-</sup> inhiben el crecimiento en un 79 y 58% respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico, existe una diferencia significativa con respecto a los controles negativo y positivo; por otro lado, SPC13-DIC mostró actividad sin diferencia significativa con respecto al control positivo. De acuerdo con estos resultados se decidió determinó la CMI solamente para SPC13-DIC.

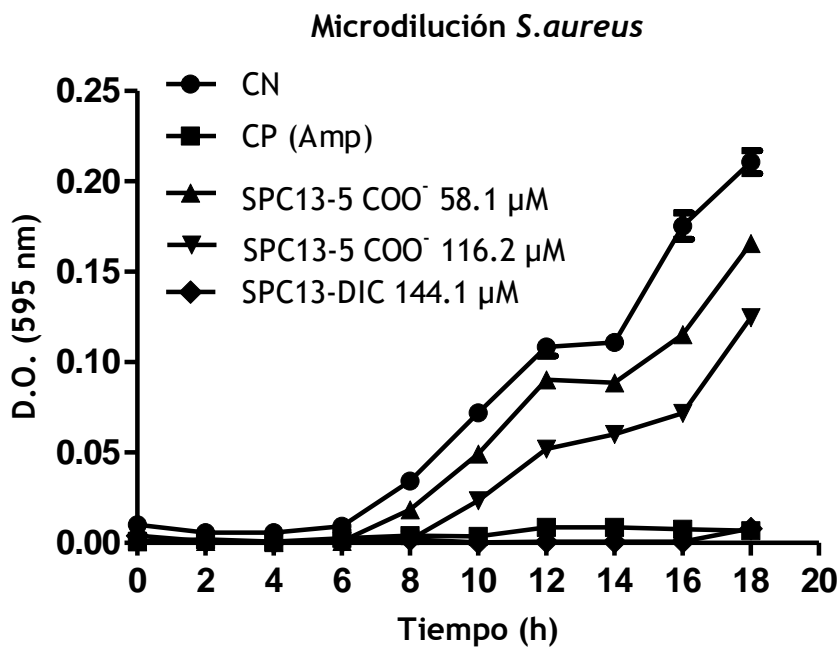
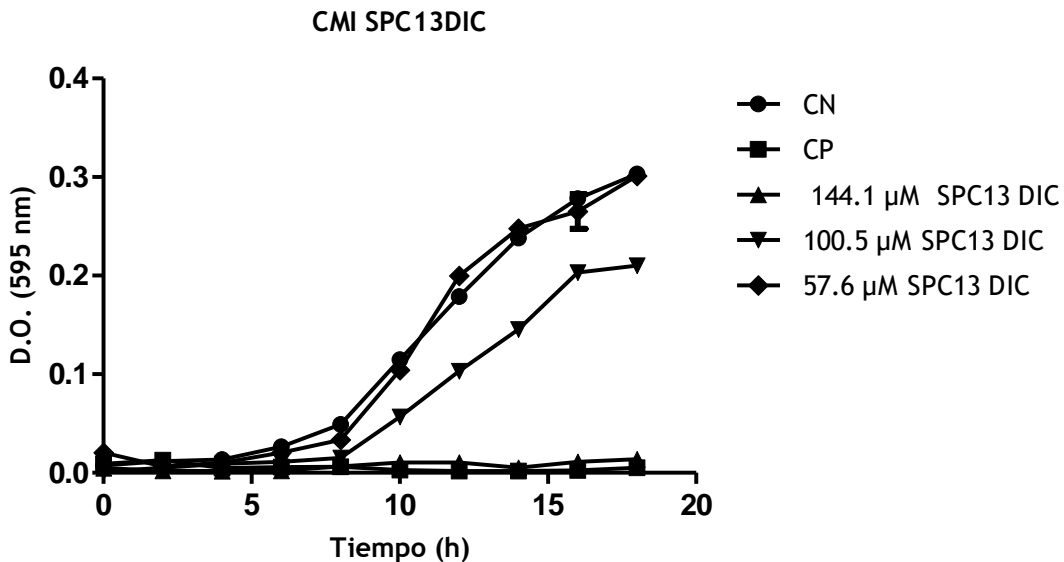


Figura 15. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de microdilución de péptidos derivados de SPC13 frente a *S. aureus* (ATCC 25923): se SPC-5 COO<sup>-</sup> (58.1 y 116.2  $\mu\text{M}$ ) y SPC13-DIC (144.1 $\mu\text{M}$ ). CN: Control Negativo ( $\text{H}_2\text{O}$ ); CP: Control Positivo (Ampicilina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Todos los datos se expresaron como media de tres experimentos independientes y error estándar ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ).

### 9.10 Determinación de la CMI del péptido sintético derivado de SPC13

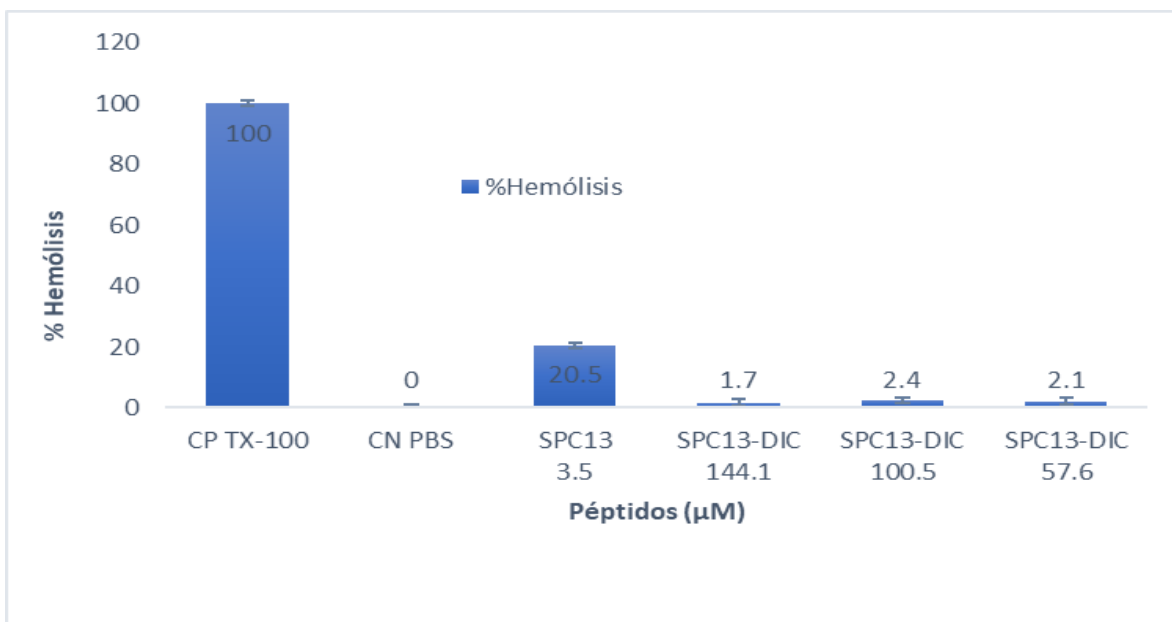
La determinación de la MIC de SPC13-DIC se realizó de acuerdo con lo establecido al punto 8.4. Para este ensayo se utilizaron tres concentraciones (57.6, 100.5 y 144.1  $\mu\text{M}$ ). En la que la concentración de 144.1  $\mu\text{M}$  mostró 100% inhibición de crecimiento, mientras que las otras dos concentraciones (57.6 y 100.5  $\mu\text{M}$ ) inhibieron un 67.3 y 0.7% respectivamente (Ver Fig.16 a y b). Para determinar si SPC13-DIC tenía efecto bactericida, al final de las cinéticas se realizaron plaqueos de cada uno de los pozos, al cabo de 18 h, el crecimiento de *S. aureus* fue nulo por lo que se determinó que SPC13- DIC presenta actividad bactericida.



**Figura 16. Determinación de MIC de SPC13-DIC frente a *S. aureus* (ATCC 25923):** Cinética de crecimiento de *S. aureus* frente a SPC13-DIC. CN: Control Negativo ( $\text{H}_2\text{O}$ ); CP: Control Positivo (ampicilina  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Las barras de error muestran el error estándar de tres experimentos por triplicado. Todos los datos se expresaron como media de tres experimentos independientes y error estándar ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ).

### 9.11 Actividad hemolítica

Los eritrocitos fueron incubados en presencia de las tres concentraciones utilizadas para la determinación de la CMI (57.6, 100.5 y 144.1  $\mu\text{M}$ ). En la figura 16 se puede observar que la CMI de SPC13-DIC provoca un 1.7% de hemólisis. De acuerdo con el análisis estadístico se existe una diferencia significativa entre la concentración de 144.1  $\mu\text{M}$  con respecto al control positivo. De igual forma, las concentraciones de 57.6 y 100.5  $\mu\text{M}$  mostraron un 2.1 y 2.4% respectivamente, sin presentar diferencia significativa con respecto a la concentración de 114.1  $\mu\text{M}$  y al control negativo.



**Figura 17. Actividad hemolítica de péptido sintético SPC13-DIC:** Eritrocitos Humanos fueron incubados a diferentes concentraciones de SPC13-DIC. CP: Control positivo Tritón X-100 al 10%. Las barras de error muestran el error estándar de tres experimentos por triplicado.

## 10. DISCUSIÓN

En la actualidad, la resistencia bacteriana a los antibióticos es un fenómeno creciente debido principalmente al uso indiscriminado de antibióticos. Este fenómeno ha generado la necesidad de desarrollar una nueva generación de antibióticos, que podrían inhibir el crecimiento de manera eficiente a los microorganismos patógenos.

En este sentido, los péptidos con actividad antimicrobiana se han convertido en una alternativa de tratamiento para luchar contra las infecciones bacterianas.

Recientemente, en el laboratorio de Neurofarmacología del CEIB, se reportó por primera vez un péptido antimicrobiano (PAM) de 13 kDa del veneno de *S. polymorpha* denominado SPC13, el cual presentó actividad antimicrobiana frente a *S.aureus* con una CMI de 3.5  $\mu$ M (Rodríguez-Alejandro, 2014) . Con este antecedente, una parte de este proyecto se enfocó a determinar la actividad antimicrobiana de SPC13 frente a bacterias Gram-negativas. Si bien la presencia de actividad antimicrobiana parece ser bastante común en otros animales venenosos (Fratini *et al.* 2017), los informes que muestran su presencia en los venenos de *Scolopendra* son bastante limitados hasta la fecha. Hasta el momento, *S. subspinipes mutilans* es la única especie estudiada, reportando cinco PAMs, con pesos moleculares alrededor de 4.5 kDa. Al igual que SPC13, estos péptidos mostraron un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Ver Fig. 9) (Kong *et al.* 2013; Lee *et al.* 2015; Wenhua *et al.* 2006; Peng *et al.* 2009). Pero, a diferencia de los PAMs aislados de *S. subspinipes mutilans*, SPC13 tiene un peso molecular mayor que aquellos. SPC13 mostró una CMI de 3.5  $\mu$ M y 14.8  $\mu$ M frente a *S. aureus* y *P.aeruginosa*, respectivamente; y a la CMI probada un 20.5% de hemólisis. Estos valores CMI fueron similares en comparación con los otros péptidos del género, donde las CMI varían de 0,5 a 256  $\mu$ g/ml.

La secuencia de aminoácidos particular, con un total de 51 aminoácidos, tiene un 98% de identidad con la histona H3 de *S. viridis*, que cubre el 48% de esta histona. Como se puede observar en la figura 5, los aminoácidos más numerosos son la lisina, la arginina y la leucina, aminoácidos que también se conservan en muchas histonas H3 y H4; sin embargo, SPC13 hasta el momento se considera una proteína desconocida ya debido a que solo se poseen secuencias pequeñas que son insuficientes para poder dar una identidad a SPC13 (Miller *et al.* 1942; Lee *et al.* 2015; Smith and Dyrinda, 2015; Nikapitaya *et al.* 2013; Tagai *et al.* 2011).

De la digestión de SPC13 se obtuvieron un total de cinco péptidos derivados, con las secuencias se realizó un BLAST, estas mostraron un 100% de homología con la fosfolipasa ScolPla reportada en el veneno de *S. viridis* por González en el 2010 (González, 2010). Sin embargo, con el alineamiento se demostró que no existía relación de los péptidos derivados de SPC13 con la fosfolipasa A2 Scol/Pla debido a que los derivados se encuentran dispersos por toda la secuencia; una razón más por la que los péptidos derivados de SPC13 no correspondían a la fosfolipasa es porque a diferencia de Scol/Pla el TR es de 46.24 y de SPC13 es de 3.5, en las mismas condiciones de RP-HPLC; además de que la actividad fosfolipasa de SPC13 es negativa (Rodríguez-Alejandro, 2014). En el alineamiento de las secuencias parciales reportadas por Rodríguez-Alejandro en el 2014 y la histona H3 de *S. viridis* y los péptidos derivados de SPC13, se pudo observar que hay aminoácidos con carga positiva (K y R), que en las secuencias de los péptidos derivados de SPC13 cambian por aminoácidos ya sea cargados negativamente (D y E) o sus amidas (Q y N) (Rodríguez-Alejandro, 2014).

Por otro lado y como parte de la caracterización de los péptidos derivados de la digestión de SPC13, se realizó una búsqueda exhaustiva en GenBank así como en diferentes bases de datos de péptidos antimicrobianos, donde solamente en la base de datos CAMPR3 se obtuvieron homologías para los péptidos: SPC13-2 con un 36% de homología con la fosfolipasa A2 reportada en *B. fasciatus* (elápido), SPC13-3.3 con porcentajes de homología entre 36 y 54% con lizosimas 1 y 3 y defensinas reportadas en moluscos y SPC13-3.5 mostró porcentajes del 44% de homología con una fosfolipasa reportada en serpiente. Los alineamientos entre las secuencias antes mencionadas y los péptidos derivados, al igual que la fosfolipasa reportada por González, no mostraron continuidad, por lo que se consideró tanto a SPC13 y a sus derivados como secuencias no reportadas (Tabla 8).

De los once péptidos sintetizados (ver tabla 9) solo SPC13-3.5 COO<sup>-</sup> y SPC13-DIC mostraron actividad; con respecto a SPC13-3.5 COO<sup>-</sup> mostró su máximo de inhibición a 116.2 µM, y de acuerdo con el análisis estadístico esta concentración presenta diferencia significativa con respecto a los controles tanto negativo como positivo, por lo que no se consideró un péptido con buena actividad antimicrobiana con respecto a SPC13-DIC. Por otro lado, la actividad de SPC13-DIC en los ensayos de microdilución fueron positivos causando la inhibición del crecimiento bacteriano, sin mostrar diferencia significativa con respecto al control positivo (Ver Fig. 15). SPC13-DIC es un péptido aniónico con carga neta de -1, que tiene actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, con una CMI de 144.1 µM, su actividad hemolítica es del 1.7 %, con la secuencia de este péptido se realizó una búsqueda exhaustiva en GeneBank y bases de datos de péptidos antimicrobianos, en los

cuales no se encontró alguna similitud con péptidos reportados. Existen pocos reportes de péptidos aniónicos con actividad antimicrobiana (AAMPs, por sus siglas en inglés) aislados en vertebrados se invertebrados e incluso en plantas; esta clase de péptidos pertenecen de forma integral al sistema inmune innato, son activos frente a bacterias, hongos e incluso plagas, pueden ser inducidos o constitutivos pudiendo presentar modificaciones postraduccionales esenciales para su actividad antimicrobiana, su carga neta va desde -1 hasta -7 y su longitud varía entre los 5 a cerca de 70 residuos (Harris *et al.* 2009). Aun que en años recientes los reportes de esta clase de péptidos se han incrementado, sigue siendo limitado el conocimiento de esta clase de moléculas.

El primer reporte de esta clase moléculas en mamíferos se realizó en 1996, donde reportan péptidos con actividad antimicrobiana descritos como péptidos antimicrobianos asociados a surfactante, los cuales fueron aislados de secreciones pulmonares de ganado ovino. La secuencia de uno de esos péptidos es H-DDDDDD-OH, el cual muestra actividad frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, con una concentración mínima bactericida (CMB) de 0.01 a 0.6 mM, en presencia de  $Zn^{2+}$  frente a *P. hemolytica*. Aunque el mecanismo de acción de este péptido no está descrito, se observó que este no causa cambios morfológicos en la membrana del microorganismo; por el contrario, causa daño intracelular y aglutinaciones en los componentes celulares. Sugiriendo que la presencia del  $Zn^{2+}$  es la parte catiónica que hace la traslocación que facilita la entrada de los AAPs (Brogden *et al.* 1996).

En anfibios, se han reportado varios AAMPs; como por ejemplo el péptido PYL aislado de la piel de *Xenopus laevis*, el cual tiene una carga neta de -5, y presenta actividad antimicrobiana débil aun en presencia de  $Zn^{2+}$ , frente a bacterias Gram-positivas y negativas con MIC >250  $\mu$ M. En esta misma especie en el 2017, se reportó a XLAsp-P2 con carga neta de -5, su actividad hemolítica es baja con menos del 10% a concentraciones >64  $\mu$ g/ml. Este péptido tiene espectro limitado ya que su actividad antimicrobiana es baja frente a bacterias Gram-negativas incluso sin actividad frente a *E. coli* (ATCC 25922); en contraste, presenta buena actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo a *S. aureus* (ATCC 29213) con CMI de 10  $\mu$ g/ml. Los resultados de la microscopia electrónica de transmisión demostraron que el mecanismo de acción de XLAsp-P2 es por destrucción de la membrana (Zhang *et al.*, 2017). Temporin-1Ja es otro AAMPs aislado de *Rana japonica*, el cual posee carga neta de -1 con actividad antimicrobiana moderada frente a *S. aureus* y *E. coli* con CMIs >100  $\mu$ M.

Los AAMPs mejor caracterizados en anfibios son los reportados en el género *Bombina*. Los péptidos conocidos como Bombin H, son PAMs aislados de *Bombina*

*orientalis*, que presentan actividad antimicrobiana limitada frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con MICs de 200  $\mu\text{M}$  y es inactivo frente a levaduras. El AAMP más recientemente reportado en este género es maximinin H5 aislado de *Bombina máxima*, el cual tiene una carga neta de -3 y presenta espectro limitado, ya que muestra baja actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con una MIC de 80  $\mu\text{M}$ , mientras que es inactivo frente a bacterias Gram-negativas y hongos. Maximini H5, a diferencia del resto de los AAMPs reportados para anfibios, no induce a hemólisis a la CMI (Lai *et al.* 2002).

Con respecto a AAMPs aislados de invertebrados, específicamente del plasma de dos especies de camarón se reportó a PvHCt presente en *Penaeus vannamei*, PsHCt1 y PsHCt2 aislados de *Penaeus styrostris*. Los alineamientos de las secuencias de estos péptidos muestran que son derivados de hemocianina, una proteína presente en el plasma del tracto respiratorio de un crustáceo; estos AAMPs tiene espectro limitado, con alta actividad frente a *F. oxysporum*. En estudios posteriores, la versión sintética de PvHCt muestra buena actividad antifúngica con una CMI <15  $\mu\text{M}$  (Harris *et al.* 2009).

En arácnidos se han reportado, pocos AAMPs putativos procedentes de bibliotecas de cDNA, entre los que se encuentra: Amblyoma defensin peptide 1 y 2, aislados de *Amblyoma hebraeum*, Amblyoma-defensin peptide 2, el cual fue aislado de la hemolinfa de garrapatas hembras. Este PAM posee carga neta de -3 y es activo frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con CMIs bajas en rangos de  $\mu\text{M}$  (Harris *et al.*, 2009). En estudios de otros miembros de esta familia, se identificó a BmKa1 y BmKa2 procedentes del banco de cDNA del veneno del alacrán *Buthus martensii*, estos AAMPs sintéticos poseen una carga neta de -12 y -13 respectivamente. La actividad antimicrobiana es de amplio espectro (Harris *et al.* 2009; Zeng *et al.* 2004). Son pocos los AAMPs reportados para esta familia, SPC13-DIC es un péptido aniónico (carga neta -1) derivado de SPC13 AMP presente en el veneno de *S. polymorpha*. Este AAMP al igual que la mayoría de los AAMPs reportados, tiene un espectro limitado y con CMI elevado, en contraste a los péptidos catiónicos; con respecto a la actividad antimicrobiana el espectro se vio reducido a sólo *S. aureus*, con una CMI de 144.1  $\mu\text{M}$ , concentración tres veces mayor a la CMI reportada para SPC13 (proteína original); su actividad antimicrobiana es de rango limitado al igual que la mayoría de los AAMPs reportados. Una de las razones es porque quizá esta clase de PAMs no es la primera línea de defensa del sistema inmune, actuando de forma sinérgica con los CAMPs. El espectro limitado de los AAMPs posiblemente se deba a la morfología de las bacterias, en este sentido, el grupo más vulnerable son las bacterias Gram-positivas ya que estas no cuentan con una membrana externa, lo que facilita la



interacción entre el péptido y la bacteria Gram-positiva; lo que ocasiona que se necesite mayor concentración del AAMP (Harris *et al.* 2009). En el caso de SPC13-DIC el aumento de la concentración tal vez se debe a el tamaño de la molécula de SPC13-DIC con respecto a SPC13, ya que se necesita mayor número de moléculas para ejercer su acción. Por otro lado, la actividad hemolítica se vio reducida poco más del 90% con respecto la actividad hemolítica de SPC13, rango mucho menor al de la actividad hemolítica reportada en otros péptidos de esta clase. SPC13-DIC es el primer AAMP reportado de la clase quilopoda, considerando que, de acuerdo con los datos anteriormente mostrados este AAMP es susceptible a modificaciones en su secuencia o probarlo en presencia de coadyuvantes como  $Zn^{+2}$ , o bien, poder utilizarlo en presencia de antibióticos conocidos, para ver su efecto de sinergismo, todo lo anterior con el fin de mejorar su actividad antimicrobiana y conservar su actividad baja actividad hemolítica.

## 11.CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos se determinó la actividad antimicrobiana SPC13 frente a bacterias Gram-negativas, siendo bactericida frente a *P. aeruginosa* y bacteriostática frente a *E. coli*.

Los resultados obtenidos aceptan la hipótesis propuesta para este proyecto, ya que de la digestión trípica de SPC13 se obtuvieron ocho fragmentos derivados con actividad antimicrobiana, de los cuales se obtuvo a SPC13-DIC, este AAMP mantuvo la actividad antimicrobiana, con espectro limitado frente a *S. aureus*, además de que este péptido disminuyó un 91.7% su actividad hemolítica con respecto a SPC13. Además, se determinó que la actividad antimicrobiana de SPC13 tanto como de SPC13-DIC es dosis-dependiente frente a las bacterias probadas. Debido a sus características, SPC13-DIC es susceptible a modificaciones con la intención de mejorar su actividad antimicrobiana.

## 12. PERSPECTIVAS

- ⌘ Realizar pruebas de actividad antimicrobiana de SPC13-DIC con cepas multirresistentes.
- ⌘ Determinar la actividad antimicrobiana de SPC13-DIC en presencia de Buffer catiónicos ( $Zn^+$ ).
- ⌘ Determinar actividad antibiofilm.
- ⌘ Determinar mecanismo de acción de SPC13 y SPC13-DIC.
- ⌘ Modificar a SPC13- DIC para mejorar su actividad antimicrobiana, manteniendo la actividad hemolítica.

### 13. REFERENCIAS

- Agilent Technologies, (2013). Claves para conseguir caracterizaciones de péptido óptimas: una guía práctica de mapa de péptidos, 1-24.
- Alonso. C., González-Barrio. D., Tenorio. C., Ruiz-Fons. F. y Torres. C., (2016). Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from red deer and wild small mammals. Detection of multiresistance *E. coli* producing extended-spectrum beta- lactamase, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases Elsevier*, 45:34-39.
- Arnold. R., Brewer. M. y Gauthier JJ., (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 28(3):893e8.
- Becerra. G, Plasencia. A, Luévanos.A, Domínguez. M y Hernández I, (2009). Antimicrobial resistance mechanism in bacteria, *Enf Inf Microbial*, 29 (2): 70-76.
- Bechinger. B. y Gorr. S., (2016). Review: Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance, *Critical Reviews in oral biology and medicine*, 1-7.
- Blair. J., Webber. M., Baylay. A., Ogbulu. D. y Piddock. L., (2015). Review: Molecular mechanism of antibiotic resistance, *Nature: microbiology*, 13: 42-51.
- Brogden. K., De Lucca. A., Bland. J. and Elliott. S., (1996). Isolation of a pulmonary surfactant-associated anionic peptide bacterial for *Pasteurella haemolytica*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:412-416.
- Bustos-Martínez. J., Hamdan-Partida. A. y Gutiérrez-Cárdenas. M., (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad, *Medigraphic Artemisa*, 17: 287-305.
- Cardenas-Perea. M., Cruz y López. O., Gándara-Ramírez. J. y Pérez-Hernández. A., (2014), Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias, *Rev. elementos-BUAP*, 94:35-43.
- Castañeda-Casimiro. J., Ortega-Roque. J., Venegas-Medina. A., Aquino - Andrade. A., Serafín-López. J., Estrada-Parra. S. y Estrada. I., (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones, *Medigraphic*, 18(1): 16-29.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27rd informational supplement. CLSI document M100-S27 Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cho. J., Park. I., Kim. H., Lee. W. and Kim. S., (2002). Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from Histone H2A in the skin mucosa of fish, *FASEB Journal*, 16: 429- 431.

- Cho. J., Sung. B. and Kim. S., (2009). Buforins: Histone H2A - derived antimicrobial peptides from toad stomach, *Biochim Biophys Acta*, 1788: 1564-1569.
- Cúpul-Magaña.F., (2007). *Scolopendra viridis* Say, CHILOPODA: SCOLOPENDROMORPHA: SCOLOPENDRIDAE, *Dugesiana*, 14(2): 53-57.
- Cupul-Magaña. F., (2013). La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México, *Dugesiana*, 20(1):17-41.
- Cupul-Magaña. F., (2014), Registro de las especies de ciempiés (Chilopoda) y milpiés (Diplopoda) de Sinaloa, México, *Actualidades Biológicas*, 36(100):73-76.
- Daza. P. R., (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria, *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3): 57-67.
- Deresinski. S., (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey, *Clinical Infectious Diseases*, 40: 562-573.
- Dresser. A., Wirtz. V., Corbett. K. y Echániz G., (2008). Uso de antibióticos en México: Revisión de problemas y políticas, *Salud Pública de México*, 50:480-487.
- Edman. P. and Begg. G.,(1967)., "A protein sequenator". *Eur J Biochem*, 1(1): 80-91.
- Fariñas. M. y Martínez-Martínez. L., (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multiresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y otros bacilos gramnegativos no fermentadores, *Enferm Infecc Microbil Clin, El Silver España*, 31(6): 402-409.
- Fratini. F., Cilia. G., Turchi. B. y Felicioli., (2017). Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapo against bacteria. A literature review, *Toxicon*, 130: 91-103.
- Fuch. Y., (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana, *Salud Pública México*, 36: 428-438.
- Garza-Ramos. U., Silva- Sánchez. J. y Martínez-Romero. E., (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública*, 51 (3): 439-446.
- González. L., (2010). Caracterización Bioquímica y Molecular de los componentes del veneno del ciempiés *Scolopendra viridis* Say, Tesis de Doctor en Biotecnología, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

- González. M., San Juan. J., Morales. F. y Otero.A., (2017). Review: Antimicrobial peptides: their therapeutic potential, *Rev. Cubana de Medicina Tropical*, 69(2): 1-13.
- Hamad. B., (2010). The antibiotics market. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 9: 675-676.
- Haney. E., Mansour. S. y Hancoch. R., (2016). Antimicrobial peptides: an introducción, In: Hansen P. (eds) *Antimicrobial Peptides. Methods in Molecular Biology*, 1548: 3-22.
- Harris. F., Dennison. S. y Phoenix. D. (2009). Review: Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms, *Current Protein and peptide*, 10:585-606.
- Hirsh. J., (1958). Bactericidal action of histone, *Journal Experiment Medicine*, 108: 925-944.
- Imura. Y., Choda. N. y Matsuzaki. K., (2008). Magainin 2 in action: Distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells, *Biophysical journal*, 95: 5757-5765.
- Kinter, M., y Sherman, N. E., (2000). Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. *JohnWiley & Sons, Inc.*, 161-163.
- Kong. Y., Huang. S., Shao. Y. y Wei. J., (2012). Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*, *Journal of Ethnopharmacology*, 145:182-186.
- Kong. Y., Hui. J., Huang. S., Chen. H. y Wei. J., 2013, Cytotoxic and anticoagulant peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans* venom, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(31):2238-2245.
- Lai. R., Hui. W. y Zhang. Y., (2002). An anionic antimicrobial peptide from toad *Bambina maxima*, *Biochemical and Biophysical Research*, 295: 796-799.
- Lee. D., Huang. C., Teruaki. N., Thiboutot. D., Kang. S., Monestier. M. y Gallo. R., (2009) Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes, *NIH public Access*, 129 (10): 2489-2496.
- Lee. H., Hwang. J-S., Lee. J., Kim. J. y Lee. D., (2015). Scolopendin 2, a cationic antimicrobial peptide from centipede, and its membrane-active mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848: 634-642.
- Levay. P. y Vilojoen. M., (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*; 80:252-267.
- Madigan. M.T., Martinko. J. y Parker. J., (2004). *Brok Biología de los Microorganismos*, Editorial Pearson, pp: 56,58,59,74,108, 160,353-398, 399-418.

- Miller. B., Abrams. R., Dofman. A. y Klein. M., (1942) Antibacterial properties of protamine and histone., *Science*, 96 (2497): 428-430.
- Miranda. M., 2011, Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 68(4): 262-270.
- Mehraj. J., Witte. W., Akmatov. M., Ñayer. F., Werner. G. y Krause G., (2016). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. In: Stadler M., Dersch P. (eds) How to Overcome the Antibiotic Crisis. *Current Topics in Microbiology y Immunology*, 398:3-33.
- Miranda. P. (6 diciembre 2017). Resistencia de bacterias a fármacos, una amenaza en México, El Universal, recuperado de <http://www.eluniversal.com.mx/nacion/sociedad/resistencia-de-bacterias-farmacos-una-amenaza-en-mexico>.
- Merrifield. B., (1963). Solid phase Péptide Synthesis 1 Sinthesis of a tetrapeptide, *Journal of the American chemical society*, 85: 2149-5.
- Miller. B., Abrams. R., Dofman. A. y Klein. M., (1942). Antibacterial properties of protamine and histone., *Science*, 96: 428-430.
- Midura-Nowaczek. K. y Markowska. A., (2014). Review: Antimicrobial peptides and their analogd: searching for new potential therapeutics, *Perspectives in medicinal chemistry*, 6: 73-80.
- Miyoshi-Akiyama. T., Tada. T., Hung. N., Tharavichitkul. P., Pokhrel. B., Gniadkowski. M., Shimojima. M. y Kirikae. T., (2017) Emergence and Srpead of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Genome Biol.Evol.*, 9(12): 3238-3245.
- Mohri. S., Sugiyama. A., Saito. K. y Nakajima H., (1991). Centipede bites in Japan. *Cutis*, 47: 189-190.
- Montaña-Pérez. K. y Vargas-Albores. F., 2002, Péptidos Antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho future, 27 (1): 21-27.
- Mukherjee. S. y Hooper. L., (2015). Antimicrobial defense of the intestine, *CellPress Immunity*,42:28-39.
- Newman. J., Sharp. J., Enjapoori. A., Bentley. J., Nicholas. K., Adams. T. y Peat. T., (2017). Structural characterization of a novel monotreme-specific protein with antimicrobial activity from the mil of platypus, *Structural biology communications*, F74: 39-45.
- Nikapitiya. C., Dorrington. T. y Gomez-Chiarri. M., (2013). Review: The role of histone in the inmune responses of acuatic invetrebrates, *ISSN*, 10:94-101.
- Organización Panamericana de la Salud, (2004). Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, Oficina Regional de la OMS, 1-306.

- Organización Mundial de la Salud, 2013, Resistencia a los antimicrobianos, NOTA DESCRIPTIVA: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
- Padhi. A., Sengupta. M., Sengupta. S., Roehm. K. y Sonawane. A., (2014). Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects, *Tuberculosis Elsevier*, 94: 363-373.
- Paniagua. G., Moroy. E., Vaca. S. y González S., (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Rev. Médica del hospital General de México*, 66(1): 13-21.
- Park. C., Kim. M. y Kim. S., (1998). Parasin I an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish *Parasilurus asotus*, *FEBS letters*, 434: 258-262.
- Pavia. K., Spinella. S. y Elmore. D., (2012). Novel histone-derived antimicrobial peptides use different antimicrobial mechanism, *NIH Access Biochim Biophys*, 1818(3): 869-876.
- Pemberton. R., (1999). Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine, *Journal Ethnopharmacol*, 65: 207-216.
- Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Peng J., Liu, J. y Yu, H., (2009). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms, *Toxicon*, 30: 1-6.
- Relf. J., Chisholm. J., Kemp. G. y Smith V., (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular hemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur.J. Biochem*, 264: 350-357.
- Rivas-Santiago. B., Sada. E., Hernández-Pando. R. y Tsutsumi. V., (2006) Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases, *Salud Pública*, México, 48: 62-71.
- Rodríguez. A., (2012). Comparación biológica y estructural entre antibióticos peptídicos tipo alfa lineales y beta defensinas, Tesis de Doctorado en Ciencia Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma Nacional.
- Rodríguez-Alejandro. C., (2014). Identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos provenientes en el veneno de *Scolopendra polymorpha*, tesis de Maestría en Biotecnología.
- Rodríguez. C., Álvarez L., Álvarez. S. y Oltra. C., Barcenilla. G., Cereijjo. M., Cuñat. H. y Martínez. P., (2014). Utilización de antibióticos en el tratamiento de infecciones por cocos grampositivos multirresistentes en pacientes críticos, *Med Intensiva*, 32(6):263-71.
- Rodríguez-Angeles. G., (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Pública México*, 44: 464-475.



- Secretaría de Economía, 2013, Industria farmacéutica, Disponible en: [http://mim.promexico.gob.mx/work/sites/mim/resources/LocalContent/319/2/FC\\_farma\\_esp.pdf](http://mim.promexico.gob.mx/work/sites/mim/resources/LocalContent/319/2/FC_farma_esp.pdf).
- Shafer. W., Martin. L. y Spitznagel. J., (1986). Late intraphagosomal hydrogen ion concentration favors the in vitro antimicrobial capacity of a 37-kilodalton cationic granule protein of human neutrophil granulocytes, *Infect Immun*, 53(3):65-155.
- Sierra. Jo., Fusté. E., Rabanal. F., Vinuesa. T. y Viñas. M., (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 1-40.
- Smith. V., Desbois. A. y Dyrinda. E., (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish marine invertebrates and microalgae, *Marine drugs*, 8: 1213-1262.
- Smith. V. y Dyrinda. E., (2015). Antimicrobial proteins: From old proteins, new ticks, *Molecular Immunology Elsevier*, 68:383-398.
- Sussmann. O, Mattos. L, y Restrepo. A., (2009). Resistencia bacteriana, Inédito.
- Tafur. J., Torres. J. y Villegas. M.V., (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram- negativas, *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3): 217-226.
- Tagai. C., Morita. S., Takayuki. S., Miyaji. K. y Iwamuro. S., (2011). Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions, *Elsevier Peptides*, 2003-2009.
- Téllez. G. y Castaño. J., (2010). Péptidos Antimicrobianos, *Infectio*, 14(1): 55-67.
- Walsh. C., (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature*, 406: 775-781.
- Wenhua. R., Shuangquan. Z., Daxiang S, Kaiya Z. y Guang Y., (2006). Induction, purification and characterization of an antimicrobial peptide scolopendrin I from the venom of centipede Scolopendra subspinipes mutilans, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 43: 88-93.
- Winstel V, Kühner P, Salomon F, Larsen J, Skov R, Hoffmann W, Peschel A, Weidenmaier C., (2015). Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization, *MBio* 6:e00632
- Wise. R., (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 585-586.
- World Health Organization, (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014, WHO Geneva, 1-10. Recuperado de

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf).

- World Health Organization, (2018). Fact sheets: Antimicrobial Resistance, WHO, Consulta: 06 diciembre 2018. recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Yildiz, A., Biceroglu, S., Yakut, N., Bilir, C., Akdemir, R. y Akilli, A., (2006). Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. *Emerg. Med. J.* 23 (4), e30.
- Zhang. Y., Liu. S., Li. S., Cheng. Y., Nie. L., Wang. G., Wei. W., Cheng. C., Hou. F. y Hao. L., (2017). Novel short antimicrobial peptide isolated from *Xenopus laevis* skin, *Journal of Peptide Science*. 23(5):403-409.
- Zasloff. M., (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms Review Article, *Nature*, 415: 389-395.
- Zeng. X., Wang. S., Zhu. Y., Zhu. S. y Li. W., (2004). Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch, *Peptides Elsevier*, 25:143-150.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 enero, 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15. enero, 2019.

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 enero, 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JESÚS SILVA SANCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 enero, 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 Enero, 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

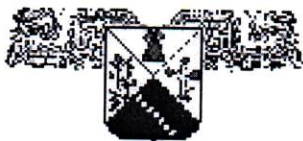
Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 enero, 2019.

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 15 enero, 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)  
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Jesús Silva Sánchez  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dra. María del Refugio Trejo Hernández  
Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Tesis: "Caracterización de péptidos antimicrobianos derivados de SPC13 presente en el veneno de *Scolopendra polymorpha*"

Alumno que la presenta a revisión: CARMEN ITZAMATUL RODRIGUEZ ALEJANDRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luis Caspeta Guadarrama', written over a circular stamp.

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA