



Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Maestría en Biotecnología

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana de la
proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis*
Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés
clínico”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

L. en F. Perla Abundes Recilla

Directora: Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Cuernavaca Morelos, Noviembre 2020.



A Dios, porque de Él es la sabiduría.

A mi esposo Edgar, por lograr nuestros sueños y metas juntos.

A mis padres y hermana, por su amor incondicional.

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por permitirme llegar a este día, con la gente que amo y por este logro; porque nunca me ha dejado, y aún en los momentos mas difíciles siempre me da la fuerza para seguir adelante.

Quiero agradecer también a la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, por haberme aceptado en su laboratorio y en este proyecto, por depositar su confianza en mí; gracias a su guía y enseñanza.

A mi comité tutotal le agradezco por cada detalle y momento dedicado a este trabajo.

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Dra. Susana Valencia Díaz

Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay

Al Laboratorio de Neurofarmacología; especialmente a la TL. Lucero Valladares Cisneros, por todo lo que me enseñó, apoyó y convivimos juntas. A cada uno de mis compañeros de laboratorio Adriana, Edgar, Ana y Arturo; por cada trabajo en equipo que hacíamos, incluyendo los días prósperos y austeros de colectas. Gracias a la Maestra Carolina Abarca, que siempre me alentó con sus palabras después de terminar cada tutorial.

Agradezco a la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero y a el Dr. Gerardo Corzo Burguete por prestarnos su laboratorio para el uso del Cromatógrafo de HPLC.

También agradezco a todos los doctores profesores que en cada materia que tomé formaron parte de mi aprendizaje; a Víctor Martínez por su apoyo en todo los tramites y equipo de cómputo.

Al Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la oportunidad que me dieron para seguir en mi formación académica y profesional.

Por último, pero no menos importante, a mi esposo Edgar Rodríguez, mis padres Olivia Recilla y Roberto Abundes y mi hermana Alma; gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí. Sobre todo, por su amor, que fue mi impulso cada día.

ÍNDICE

	Página
I. Abreviaturas	V
II. Índice de figuras	VI
III. Índice de gráficas	VI
IV. Índice de tablas	VI
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1 Estructura bacteriana.	4
2.1.1 Pared celular bacteriana.	5
2.1.1.1 Pared celular bacteriana Gram positiva.	6
2.1.1.2 Pared celular bacteriana Gram negativa.	6
2.2 Bacterias Gram positivas	7
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.3 Bacterias Gram negativas	8
2.3.1 <i>Salmonella sp.</i>	8
2.3.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	9
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	9
2.3.4 <i>Klepsiella pneumoniae</i>	10
2.4 Antibióticos.	10
2.4.1 Clasificación según el efecto de su acción.	10
2.4.2 Clasificación por su espectro de actividad.	11
2.4.3 Clasificación según su estructura química.	11
2.4.4 Clasificación según su mecanismo de acción.	12
2.5 Péptidos/proteínas antimicrobianos (PAMs).	13
2.5.1 Mecanismos de acción propuestos de los PAMs.	15
2.5.1.1 Interacción de los PAMs con la membrana.	15
2.5.1.1.1 Mecanismo de barril.	15
2.5.1.1.2 Mecanismo toroidal.	16
2.5.1.1.3 Mecanismo de alfombra.	16
2.5.1.1.4 Mecanismo de agregado.	16
2.5.1.2 Interacción intracelular de los PAMs.	16
2.5.1.2.1 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.	16
2.5.1.2.2 Inhibición de enzimas dependientes de ATP por interacción con ATP.	17
2.6 Resistencia bacteriana.	18
2.6.1 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.	18
2.6.2 Mecanismos de resistencia bacteriana a PAMs.	19
2.7 Estrategias para evadir la degradación de los PAMs.	20
2.8 PAMs obtenidos de venenos.	21
2.9 Veneno de Escolopendra.	22
2.10 Antecedentes directos.	24
2.10.1 <i>Scolopendra viridis</i> Say.	24
2.10.2 PAMs encontrados en veneno de Escolopendra.	27
2.10.2.1 PAMs identificados en el veneno de Escolopendra del Laboratorio de Neurofarmacología.	28

3. Justificación	30
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general.	31
5.2 Objetivos específicos.	31
6. Estrategia experimental	31
7. Materiales y métodos	32
7.1 Colecta del organismo de estudio.	32
7.2 Mantenimiento del organismo de estudio.	32
7.3 Extracción del veneno de ciempiés.	32
7.4 Cuantificación de la parte proteica del veneno total extraído.	33
7.4.1 Método colorimétrico de Lowry.	33
7.5 Separación de la proteína de 40kDa del veneno total.	33
7.5.1 Electroforesis SDS-PAGE 12%.	33
7.6 Purificación de la proteína.	34
7.6.1 Electroelución.	34
7.6.2 Diálisis.	34
7.6.3 Liofilización.	34
7.6.4 Purificación de la muestra por HPLC y su identificación.	35
7.7 Ensayo antimicrobiano, método por difusión en gota.	35
7.7.1 Efecto de acción de la proteína de 40kDa sobre las bacterias.	36
8. Resultados	37
8.1 Perfil proteico del veneno total de <i>Scolopendra viridis</i> .	37
8.2 Perfil cromatográfico del veneno total de <i>Scolopendra viridis</i> .	38
8.2.1 Perfil cromatográfico de la fracción de la proteína de 40kDa.	38
8.3 Ensayos antimicrobianos con <i>S. aureus</i> .	40
8.4 Ensayos antimicrobianos y efecto de acción con más cepas bacterianas.	42
9. Discusión	45
10. Conclusiones	49
11. Perspectivas	49
Bibliografía	50
Anexos	56
Anexo 1. Investigación bibliográfica de PAMs extraídos de venenos	56
Anexo 2. Curva estándar de BSA, para el método de Lowry.	58
Anexo 3. Soluciones utilizadas en el método de Lowry.	58
Anexo 4. Componentes y proporciones del gel concentrador y separador de poliacrilamida al 12% con SDS.	58
Anexo 5. Componentes del buffer de corrida pH 8.6.	58
Anexo 6. Componentes para 100ml de solución desteñidora.	59
Anexo 7. Buffer de electroelución TRIS-HCl pH 8.6.	59
Anexo 8. Cálculos para obtener el peso molecular del perfil proteico del veneno total.	59

I. Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APS	Ammonium persulfate (persulfato de amonio)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BLEE	Beta Lactamasas de Espectro Extendido
BSA	Bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)
CEIB	Centro de Investigación en Biotecnología
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO₂	Dióxido de Carbono
Da	Daltons
D.O.	Densidad óptica
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
IBT	Instituto de Biotecnología
kDa	kiloDaltons
L	Litro
LB	Luria Bertani
LNC	Lipid Nanocapsules (nanocápsulas lipídicas)
LPS	Lipopolisacáridos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRSA	Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina)
MSSA	Methicillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina)
NO	Óxido nítrico
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMs	Péptidos/proteínas antimicrobianos
PBS	Phosphate Buffered Saline (Amortiguador de fosfatos salino)
pH	Potencial Hidrógeno
PLA2	Fosfolipasa A2
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
RP-HPLC	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
TEMED	Tetrametilen-diamina
TNFα	Tumor Necrosis Factor α (factor de necrosis tumoral α)
TRIS	Trisamina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Volts
VT	Veneno total
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
°C	Centígrados

II. Índice de figuras

	Pág.
Fig. 1	Estructura de célula procariota. 5
Fig. 2	Diferencia entre una pared celular de bacteria Gram positiva (a) y una de bacteria Gram negativa (b). 7
Fig. 3	Mecanismos de acción de los PAMs. 17
Fig. 4	Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos. 19
Fig. 5	<i>Scolopendra viridis</i> Say en estadio adulto. 25
Fig. 6	<i>Scolopendra viridis</i> hembra adulta. 26
Fig. 7	Perfil proteico del veneno de <i>Scolopendra viridis</i> . 37
Fig. 8	Cromatograma del veneno total de <i>Scolopendra viridis</i> . 38
Fig. 9	Cromatograma de la fracción proteica de 40kDa purificada por electroforesis. 38
Fig. 10	Gel SDS-PAGE 12% de los tiempos de retención de RP-HPLC con actividad antimicrobiana. 39
Fig. 11	Ensayo antimicrobiano de la proteína de 40kDa purificada por electroelución y diálisis. 40
Fig. 12	Ensayo antimicrobiano de los componentes del veneno total separados por RP-HPLC. 41
Fig. 13	Ensayo antimicrobiano de los componentes de la fracción proteica de 40kDa separados por RP-HPLC. 41

III. Índice de gráficas

	Pág.
Gráfica 1.	Curva de calibración de los marcadores de peso molecular. 59

IV. Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1.	Lista de bacterias resistentes a antibióticos. 4
Tabla 2.	Mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia bacteriana. 12
Tabla 3.	Clasificación de los PAMs. 13
Tabla 4.	Características químicas y espectro de actividad de los péptidos/ proteínas antimicrobianos. 14
Tabla 5.	PAMs de diferentes venenos de animales e insectos. 22
Tabla 6.	Péptidos aislados del veneno de <i>Escolopendra</i> con actividad antimicrobiana. 28
Tabla 7.	Ensayos antimicrobianos con diferentes proteínas del veneno de <i>Escolopendra</i> contra <i>S. aureus</i> . 29
Tabla 8.	Halos de inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> por la proteína de 40kDa. 40
Tabla 9.	Halos de inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> . 42
Tabla 10.	Curva de calibración de los marcadores de peso molecular. 59
Tabla 11.	Cálculo de pesos moleculares de las proteínas 60

Resumen

Como se ha visto en los últimos años la resistencia bacteriana a diversos antibióticos ha ido en aumento a nivel mundial. La OMS ha hecho pública una lista de cepas resistentes con el fin de buscar nuevas moléculas activas en contra de estos organismos patógenos. En la actualidad se sabe que las proteínas y péptidos antimicrobianos derivados de diferentes fuentes (animales, insectos y plantas) han sido alternativas prometedoras para futuros fármacos antimicrobianos. En el Laboratorio de Neurofarmacología se ha estudiado el veneno de ciempiés de *Scolopendra viridis* y *Scolopendra polymorpha*; llegando a identificar actividad antimicrobiana, proteasa, esterasa, hialuronidasa, fosfolipasa y anticancerígena. Una de las proteínas identificadas con actividad antimicrobiana es la proteína de 40kDa proveniente del veneno de *Scolopendra viridis*; anteriormente se había probado su actividad contra *S. aureus*, aislados clínicos de MRSA y *E. coli* siendo muy efectivo a dosis bajas ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para las bacterias Gram positivas. Más tarde se encontró que para *S. aureus* la proteína tenía una CMI de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Partiendo de la información anterior, en este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana con alguna otra cepa bacteriana Gram positiva como *L. monocytogenes* y bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* de las cuales se sabe que son de interés clínico y últimamente han ido adquiriendo resistencia. A pesar de que las cepas utilizadas solo son de colección, sin ninguna resistencia a antibióticos; mostraron que efectivamente la proteína de 40kDa inhibe a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) así como a algunas bacterias Gram negativas, entre ellas *Salmonella sp.* y *P. aeruginosa*; todas a una baja concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína; cuyo efecto de acción es bacteriostático. Aunque no se determinó que tipo de interacción puede tener la proteína con estas bacterias es posible que sea de forma externa, ya que por su gran tamaño es difícil que pueda atravesar la membrana plasmática bacteriana.

1. Introducción

La resistencia bacteriana es un problema a nivel mundial y con el paso del tiempo las bacterias han adquirido nuevas formas de inhibir la acción de los antibióticos comúnmente utilizados. Por lo que, cada vez ha tomado más relevancia buscar alternativas terapéuticas que ayuden a combatir infecciones comunes, las cuales con antibióticos convencionales ya no es posible tratar, debido a su uso irracional tanto en humanos como en animales y plantas.

Muchas de las moléculas nuevas que se están estudiando como antimicrobianos derivan de venenos de diversos animales, insectos y plantas; conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs); estas moléculas pueden ayudarlos a protegerlos de infecciones.

Un ejemplo de estas moléculas son los péptidos y proteínas presentes en el veneno del ciempiés *Scolopendra subspinipes* (originario de China); en el cual se han identificado péptidos con actividad antimicrobiana (Scolopendrasin), antifúngica, antiinflamatoria y anticancerígenos.

En Morelos las especies de ciempiés que más abundan son la *Scolopendra viridis* y *Scolopendra polymorpha*; la primera especie se encuentra en regiones tropicales de Morelos como el norte de Cuernavaca, sur de Huitzilac y Tepoztlán; mientras que los segundos son de regiones más cálidas como Yautepec, Temixco, Jiutepec y Cuautla.

Se ha encontrado que el veneno de estos dos miriápodos contiene péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana, anticancerígena, esterasa, proteasa, fosfolipasa y antiinflamatoria. En el presente trabajo se evaluará la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis* Say contra bacterias Gram negativas; y se confirmará la actividad antibacteriana sobre la cepa de *S. aureus*.

2. Antecedentes

Los microorganismos resistentes a antimicrobianos son un problema que afecta a humanos, animales y medio ambiente; ya que influyen multitud de factores que alteran los mecanismos de defensa de los microorganismos. Este hecho fue confirmado en el 2018 por la OMS reportando que nuevos mecanismos de resistencia se propagan a nivel mundial y ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, lo que aumenta la discapacidad, muertes, y prolongación de la enfermedad (OMS, 2018a).

Un año antes la OMS publicó una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos, en la que se incluyen 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana; basándose en el grado de letalidad que provocan las infecciones; si el tratamiento requiere o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes en una infección; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan.

Esta lista se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media (**tabla 1**).

***Prioridad crítica:** Incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, asilos y pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos.

*** Prioridad alta y media:** Contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por *Salmonella*.

Tabla 1. Lista de bacterias resistentes a antibióticos.

Prioridad 1: Crítica
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenémicos
Enterobacteriaceae , resistentes a los carbapenémicos, productoras de BLEE
Prioridad 2: Alta
<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas
<i>Salmonellae</i> , resistentes a las fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
Prioridad 3: Media
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin sensibilidad a la penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina
<i>Shigella spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas

(Tomado de: OMS, 2017)

2.1 Estructura bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pertenecen al reino procariota, se reproducen por fisión binaria y pueden medir de 0.5 a 3 μm , en algunos tipos pueden llegar a los 10 μm . Las bacterias no poseen núcleo, mitocondrias, sistema de retículo endoplásmico, ni aparato de Golgi. Solo cuentan con su ADN que almacenan en forma circular y que se encuentra enrollado sobre sí mismo. También poseen un material genético extracromosómico llamado plásmido, el cual es una secuencia corta de ADN circular bicatenario que se replica independientemente del ADN cromosómico, y son heredados por las células hijas (Madigan *et al.*, 2009).

Los ribosomas se encuentran presentes en el citoplasma y están compuestos por proteínas y moléculas de ARN que forman dos subunidades importantes para el ribosoma; la subunidad 50S y la subunidad 30S. Los ribosomas son indispensables para la síntesis de proteínas necesarias para la bacteria. Algunas bacterias poseen una cápsula, la cual es una capa de consistencia mucosa, que contiene antígenos que confieren a las bacterias propiedades inmunológicas, así como la capacidad de resistir la fagocitosis y el ataque de otros elementos de defensa del organismo (Madigan *et al.*, 2009) (**figura 1**).

Por otro lado, la membrana celular representa una barrera que separa el interior del exterior celular. Es una bicapa lipídica formada por fosfolípidos anfipáticos y no posee esteroides. La membrana se halla estabilizada por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y cationes como el calcio y el magnesio, que se combinan con los fosfolípidos cargados negativamente. Posee varias proteínas transmembrana, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas a través de ésta. Dentro de sus funciones están: actuar como barrera osmótica, tener permeabilidad selectiva y permitir el ingreso de nutrientes y la salida de desechos por mecanismos de transporte activo y pasivo (Strahl *et al*, 2017).

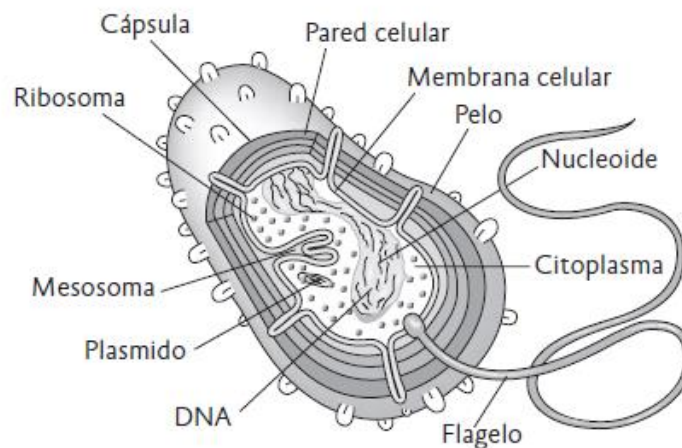


Figura 1. Estructura de célula procariota. (Aristil, 2012)

2.1.1 Pared celular bacteriana

La pared bacteriana se encuentra afuera de la membrana celular bacteriana, lo que le ayuda a proteger a la bacteria de sustancias tóxicas como los antibióticos. Está constituida de manera esencial por un elemento llamado peptidoglucano, que consiste en un polímero con dos aminoazúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico; unidos entre sí en la posición β 1-4. Una cadena peptídica de cuatro aminoácidos D- y L- alternantes, está conectada a un grupo carboxilo del ácido N-acetilmurámico. Estos tetrapéptidos de una y otra cadena de peptidoglucano se unen entre sí por puentes peptídicos (Gelambi, 2019).

De acuerdo al tipo de pared se pueden distinguir dos grupos de bacterias: Gram-positivas y Gram-negativas. Dependiendo de la capacidad para retener el colorante básico (cristal

violeta) después de su fijación con yodo y decoloración con alcohol (reacción de Gram); las bacterias Gram-positivas conservan el colorante, a causa de la capa gruesa de peptidoglucano que contienen en sus paredes celulares, en tanto que las bacterias Gram-negativas se decoloran con el alcohol, debido a que poseen una capa delgada de peptidoglucano y una capa gruesa externa adicional que contiene lípidos (**figura 2**). La pared bacteriana contiene elementos patógenos propios de cada especie y además confiere la forma característica de cada bacteria (Gelambi, 2019).

2.1.1.1 Pared celular bacteriana Gram positiva.

Poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglucano. Estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico: polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática (ácido lipoteicoico); la función de estos ácidos es de estabilizar la pared celular. En el caso de los ácidos teicoicos tienen un papel como factores de virulencia, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped (Silhavy *et al.*, 2010).

2.1.1.2 Pared celular bacteriana Gram negativa.

La pared de estas bacterias observada al microscopio electrónico muestra tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglucano y la membrana externa. En la membrana externa se encuentran los fosfolípidos, proteínas de unión a peptidoglucano y una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. El LPS está constituido por tres partes: el lípido A, el polisacárido central o del core y la cadena lateral O (Silhavy *et al.*, 2010).

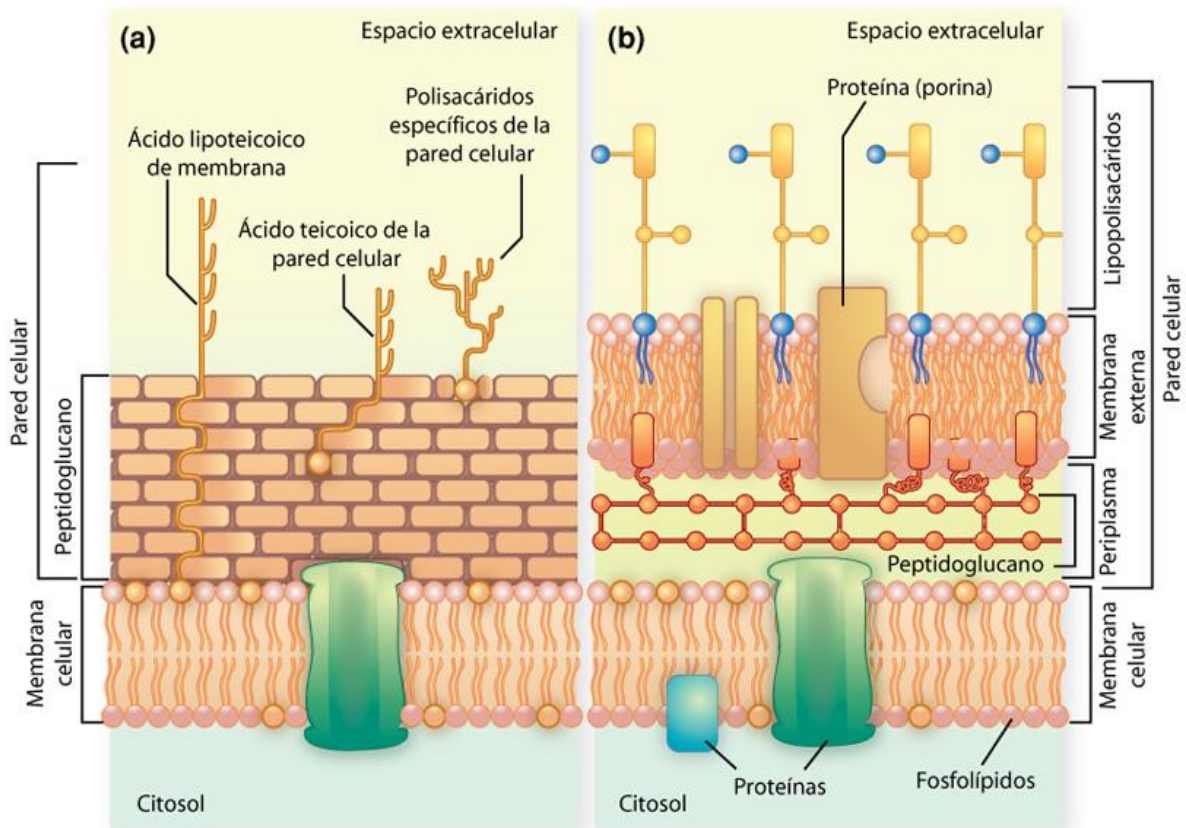


Figura 2. Diferencia entre una pared celular de bacteria Gram positiva(a) y una de bacteria Gram negativa (b) (BIOTECHMIND, 2015).

El conocimiento de la composición bioquímica de las diferentes estructuras bacterianas, junto al conocimiento del metabolismo bacteriano, permite la comprensión del mecanismo de acción de los diferentes antibióticos.

2.2 Bacterias Gram positivas

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram positiva con forma de cocos dispuestos en forma de racimos de uvas o tétradas; no es móvil, no encapsulada, ni esporulada, es anaerobia facultativa. Esta cepa es considerada patógena y con alto potencial infeccioso en el humano y animales. En su superficie contiene adhesinas que median la adherencia y colonización de las células blanco (Cervantes-García et al., 2014). *S. aureus* puede ser flora comensal del cuerpo humano, en

sitios como piel, faringe y tracto digestivo; pero puede llegar a ser patógeno, y frecuentemente causar una infección adquirida en el hospital o en la comunidad. La infección por esta bacteria puede afectar la piel, tejidos blandos, hueso, articulaciones, además de aquellas que se presentan en pacientes con prótesis o catéteres (Castañeda-Méndez et al., 2018).

Un estudio hecho en un hospital privado de tercer nivel en la Ciudad de México, analizó 128 muestras a partir de: secreción de herida de piel (25%), lavado bronquial (17.9%), hemocultivos (8.5%), expectoración (7.8%), tejido óseo (7.8%), orina (3.9%) y otros (21%). De las cuales se logró aislar MSSA en 104 casos (81.3%) y 24 casos (18.8%) de MRSA. De éstos, 79 (61.7%) casos se reportaron como adquiridos en la comunidad, 4 (26.6%) nosocomiales y 15 (11.7%) casos asociados a cuidados de la salud (Castañeda-Méndez *et al.*, 2018).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo móvil, beta hemolítico, no esporulado, ni encapsulada. Se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de los animales, verduras o alimentos mal cocidos o contaminados, derivados de lácteos no pasteurizados, pescados o mariscos y suelo. Su infección se da por alimentos contaminados causando diarrea, náuseas y vómitos en casos leves, y desde una cefalea hasta una meningitis o encefalitis en casos graves (De la Calle, 2019; Granda, 2018).

2.3 Bacterias Gram negativas

2.3.1 *Salmonella sp.*

Es un bacillo Gram negativo entérico y móvil, no produce esporas. *Salmonella* es anaerobia facultativa y sus especies se clasifican en serotipos con base a lipopolisacáridos (O), proteínas flagelares (H) y, en ocasiones, antígenos capsulares (Vi). Dentro de una serovariedad, puede haber distintas cepas que difieren en el grado de virulencia. Esta cepa es mundialmente conocida como el principal agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos y

agua contaminados con heces de animales (OMS, 2018b). Las salmonelas no tifoideas son una de las principales causas de diarrea bacteriana y se estima que causan aproximadamente 153 millones de casos de gastroenteritis y 57 000 muertes en todo el mundo cada año (Healy & Bruce, 2019).

La enfermedad se manifiesta como diarrea aguda, dolor abdominal, fiebre y vómitos y suele durar de 4 a 7 días; la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento. Sin embargo, se debe considerar la terapia antimicrobiana para pacientes que están gravemente enfermos (diarrea severa, fiebre alta o infección extraintestinal) y para personas con mayor riesgo de enfermedad invasiva (bebés, adultos mayores y personas debilitadas o inmunodeprimidas) (Healy & Bruce, 2019).

2.3.2 *Pseudomona aeruginosa*

Es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo, aerobia, no forma esporas, móvil debido a la presencia de uno o más flagelos polares. La *Pseudomona aeruginosa*, está presente en el suelo y el agua en todo el planeta. Puede ser mucoide la cual se ve frecuentemente en secreciones respiratorias de pacientes con EPOC o enfermedad fibroquística (FQ) (Lloria, 2009; Ruíz, 2007) . Es uno de los microorganismos de mayor impacto en las infecciones hospitalarias. Su frecuencia oscila según los países, España y Estados Unidos en un 10% y 25%, respectivamente. Estas variaciones están asociadas al tipo de hospital, área geográfica, tipo de servicio, tipo de pacientes y patrón de uso de antibióticos, cambiante según la epidemiología de cada hospital (Hernández *et al.*, 2018).

2.3.3 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, entérico. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. Su patogenicidad es debida a algunos antígenos superficiales y toxinas que generan. Así, las fimbrias actúan aportando su capacidad de adherencia, los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero, y son

responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuya síntesis está codificada por genes que se encuentran en plásmidos de elevado peso molecular (Canet, 2016; Rodriguez, 2005). El informe de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos estima que más de 300 millones de enfermedades y casi 200.000 muertes son causadas por *E. coli* diarreogénica globalmente cada año (Winstead et al., 2019).

2.3.4 *Klepsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un bacilo Gram negativo, no móvil, entérico. Es de importancia clínica. Usualmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, y de acuerdo con sus determinantes antigénicos se puede clasificar en 77 serotipos diferentes. La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos (Lopez *et al*, 2010).

2.4 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias de origen animal, vegetal, microorganismos (hongos, bacterias) o sintetizados químicamente (sulfas, quinolonas) con capacidad de destruir, impedir o retardar la multiplicación de los microorganismos.

Existen diferentes familias de antibióticos, que son clasificadas de acuerdo con: el efecto de su acción, su espectro de actividad, su estructura química y su mecanismo de acción (Aristil, 2012; Esparza, 2008).

2.4.1 Clasificación según el efecto de su acción

Hay antibióticos bacteriostáticos y bactericidas, dependiendo de su capacidad para inhibir el crecimiento o lisar las bacterias, respectivamente. Esta clasificación es relativa, ya que en muchos antibióticos el efecto bactericida depende de la concentración; es decir, que a niveles bajos del antibacteriano pueden comportarse como bacteriostáticos, mientras que cantidades elevadas conllevan a la muerte del microorganismo (Esparza, 2008).

2.4.2 Clasificación por su espectro de actividad

La acción de un antibiótico se mide en términos de espectro bacteriano en amplio, medio y corto. Algunos antibióticos como las tetraciclinas y cloranfenicol actúan en múltiples sectores y por eso se les adjudica el nombre de amplio espectro. Otros antibióticos, como la penicilina, que actúa en un sector restringido como: cocos gramnegativos y grampositivos, espiroquetas, son denominados de mediano espectro. Hay otros antibióticos con acción limitada, por ejemplo la dicloxacilina que actúa contra *Staphylococcus epidermidis* sensibles, por lo que se consideran de corto espectro (Esparza, 2008).

2.4.3 Clasificación según su estructura química

Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, en dependencia también de las adiciones de grupos químicos que posean en dichos núcleos base (Esparza, 2008).

2.4.4 Clasificación según su mecanismo de acción

Desde este punto de vista se clasifica a los antibióticos en cinco grandes grupos (**tabla 2**).

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia bacteriana.

Mecanismo de acción	Familias de antibióticos		Mecanismo de resistencia
Inhiben la síntesis de la pared bacteriana y afectan la formación del peptidoglucano que conforma la estructura de la pared bacteriana.	Penicilinas Cefalosporinas		Inactivación del fármaco. Producción de β -lactamasas. Falta de sensibilidad del objetivo. Reducción de permeabilidad.
Inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal (subunidad 30S y 50S).	Sobre 30S:	Aminoglucósidos	Inactivación del fármaco a través de adenilasas, fosforilasas y acetilasas. Transferencia de ADN en forma de plásmidos. Permeabilidad reducida a través de la membrana externa. Carencia de sistema de transporte necesario en bacterias anaerobias.
		Tetraciclinas	Acumulación reducida del fármaco intracelular. Falta de sensibilidad del objetivo. Inactivación enzimática.
	Sobre 50S:	Macrólidos	Mutación ribosomal en el 23S rRNA. Reducción de permeabilidad de la pared celular. Emisión activa.
		Cloranfenicol	Inactivación del fármaco a través de la enzima acetiltransferasa y glucoronil transferasa.
Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.	Quinolonas Rifampicinas		Mutación de los genes de girasa. Acumulación reducida del fármaco intracelular.
Antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico.	Sulfonamidas Trimetoprim		Producción de objetivos insensibles a través de la dihidropteroato sintasa.
Actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo (unión a esteroides de la pared celular).	Nistatina Anfotericina B		Impedir la entrada del antimicrobiano al alterar los sitios blanco. Alterar la permeabilidad de la membrana bacteriana limitando el ingreso del antibiótico.

(Aristil, 2012; Girón, 2008)

2.5 Péptidos/proteínas antimicrobianos (PAMs)

Actualmente existen antibióticos de origen peptídico utilizados como estrategias diferentes para combatir infecciones de bacterias comunes y resistentes. Estos PAMs provienen de plantas, insectos, invertebrados y vertebrados; son producidos por diferentes tipos de células que se expresan de forma constitutiva dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes durante la infección (Téllez, 2010). Además de constituir un mayor porcentaje de la respuesta inmune innata del hospedero contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus, hongos, parásitos y células tumorales (Lecaille *et al.*, 2016). Los péptidos antimicrobianos pueden clasificarse según su estructura lineal, carga neta, presencia de puentes disulfuro o si son fragmentos de proteínas (**tabla 3**).

Tabla 3: Clasificación de los PAMs

Tipos de PAM	Ejemplos y origen
Péptidos aniónicos	Maximin de anfibios (1) Pequeños péptidos aniónicos ricos en ácido glutámico y aspártico, provenientes de ovejas, ganado y humanos
Péptidos catiónicos lineales de hélice alfa	Cecropinas (A), andropín (2), moricín, ceratotoxina y mellitin de insectos Cecropín P1 de nematodos <i>Ascaris</i> spp. (3) Magainín (4), dermaseptín, bombinín (5), brevinín-1, esculentinas y buforín II de anfibios Pleurocidín de la secreción mucosa de la piel de peces Plasmina seminal, BMAP, SMAP (SMAP29, ovispirín), PMAP del ganado, ovejas y cerdos (6) LL37 de humanos (7)
Péptidos catiónicos enriquecidos para aminoácidos específicos	Péptidos que contienen prolina, incluyendo la abaecina de las abejas (8) Péptidos que contienen prolina y arginina, incluyendo apidaecinas de las abejas, drosocín de <i>Drosophila</i> sp., pirocoricín del chupasavia europeo, bactenicinas del ganado (Bac7), ovejas y cabras, y PR-39 de cerdos (9) Péptidos que contiene prolina y fenilalanina, incluyendo profenina del cerdo (10) Péptidos que contienen glicina, incluyendo a himenoptaecina de las abejas (11) Péptidos que contienen glicina y prolina, incluyendo coleopterín y holotripcina de escarabajos (12) Polipéptidos salivales pequeños ricos en histidina, incluyendo histatinas del hombre y algunos primates mayores (13)
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	Péptidos que contienen un puente disulfuro, incluyendo brevinina (14) Péptidos con dos puentes disulfuro, incluyendo protegrinas del cerdo y taquiplesinas del cangrejo cacerola (15) Péptidos con 3 puentes disulfuro incluyendo alfa defensinas de humanos (HBD1, DEFB118), ganado, ratón, rata, cabra y aves de corral; y la 0-defensina rhesus del mono rhesus (16)
Péptidos aniónicos catiónicos que son fragmentos de proteínas mayores	Lactoferricina de la lactoferrina I (17) Casodicina I de la caseína humana Dominios antimicrobianos de la alfa lactoalbúmina bovina, hemoglobina humana, lisosima y ovoalbúmina

(Tomado de Téllez, 2010)

Algunos ejemplos de proteínas antimicrobianas son las lectinas, que se caracterizan por su selectividad para unirse a los carbohidratos de las glicoproteínas en la superficie celular bacteriana (Santos *et al.*, 2019). Por otro lado, las lactoferrinas son proteínas de unión a hierro y forman parte de los fluidos corporales tales como: lagrimas, leche, mucosa vaginal, semen y saliva. Mientras que algunos de los péptidos antimicrobianos reportados son: las elafinas, defensinas, catelicidinas (Lecaille *et al.*, 2016). Estas últimas, tienen capacidad quimiotáctica sobre monocitos, neutrófilos y células CD4, son capaces de unirse a LPS e inhibir la respuesta celular inducida por los LPS y liberar TNF α , NO, entre otros factores tisulares (Téllez *et al.*, 2010). En la **tabla 4** se muestran algunas características químicas y sus espectros de acción de los péptidos/proteínas antimicrobianos.

Tabla 4. Características químicas y espectro de actividad de los péptidos/proteínas antimicrobianos.

Proteína antimicrobiana	Peso molecular (kDa)	No. aminoácidos	pI y carga neta	Puentes disulfuro	Actividad contra:
Lisozimas	14.3	---	10.5, +8	4	G+, G-, F
Lactoferrinas	78.2	---	8.5, +11	---	G+, G-, F, V, P
Elafinas	6	---	8.5, +3	4	G+, G-, F, V
Defensinas	~4	α : 29-35 β : 36-50	α : 8.3 a 8.7, +2 a +3 β : 8.9 a 10.1, +4 a +11	3	α : G+, G-, F, V, P β : G+, G-, F, V
Catelicidinas	(18 precursor), 4.5	37	10.6, +6	----	G+, G-, F, V, P

Bacterias Gram positivas (G+), bacterias Gram negativas (G-), fúngicos (F), virus (V) y parásitos (P).

(Modificado de Lecaille *et al.*, 2016)

Las bacteriocinas son otro ejemplo de péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana, sintetizados por los propios ribosomas de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, para sobrevivir en un entorno altamente competitivo. Son clasificadas de acuerdo con el tipo de bacteria productora (bacterias Gram positivas o Gram negativas), y a su vez de acuerdo con características particulares como: si tienen o no modificaciones postraduccionales, masa molecular y mecanismo de acción. Ejemplos de bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas son: las colicinas, microcinas; mientras que los lantibióticos son producidos por bacterias Gram positivas (Simons *et al.*, 2020).

La mayoría de los péptidos/proteínas antimicrobianos están dirigidos principalmente a la bicapa lipídica de la membrana bacteriana (Lee *et al.*, 2017a). Por lo que pueden proporcionar algunas ventajas sobre los antibióticos de uso convencional como:

- Bajos niveles de resistencia.
- Varios sitios blanco con la menor toxicidad para el huésped.
- Pueden ejercer sinergismo sobre la actividad antimicrobiana de los antibióticos convencionales.
- Provocan una muerte rápida (Moravej *et al.*, 2018).

2.5.1 Mecanismos de acción propuestos de los PAMs

2.5.1.1 Interacción de los PAMs con la membrana

Se ha propuesto que la primera interacción entre los PAMs con las bacterias es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram-positivas o los lipopolisacáridos en las bacterias Gram-negativas. Posteriormente, los PAMs generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo su translocación a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o a nivel interno (**figura 3**) (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.1.1 Mecanismo de barril

Los PAMs forman una interacción con los lípidos de la membrana y se orientan en forma perpendicular con sus cadenas laterales hidrofóbicas hacia el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares hacia el centro del poro hidrofílico creado por varias unidades de péptidos. La formación de este tipo de poros es irregular en tamaño y duración, lo que genera, finalmente, una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.1.2 Mecanismo toroidal

Los PAMs 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 (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.1.3 Mecanismo de alfombra

Los PAMs permanecen asociados con la cara externa de la membrana hasta llegar a formar una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.1.4 Mecanismo de agregado

El PAM funciona como detergente, ya que se une a la membrana; cuando llega a una concentración suficiente, se reorienta, permitiendo la formación de estructuras parecidas a los micelios que se extienden en la bicapa en un complejo PAM- lípido. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido- PAM 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 PAMs hacia el citoplasma, donde pueden afectar blancos de acción interna (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.2 Interacción intracelular de los PAMs

2.5.1.2.1 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas

Algunos PAMs como la Buforina II, la Indolicidina y la Microcina B17 pueden atravesar la membrana celular bacteriana transversal con o sin permeabilidad, bloqueando los componentes intracelulares. El péptido Buforina II (derivado del sapo *Bufo bufo gargarizans*) (Téllez *et al.*, 2010) atraviesa la membrana de *E. coli* sin formación de poros, una vez dentro

se acumula en el citoplasma donde se une a moléculas de ADN y ARN bloqueando sus actividades (Moravej *et al.*, 2018).

En el caso de la Indolicidina (derivada de neutrófilos bovinos) y la Microcina B17, pueden alterar la permeabilidad de la membrana e internalizarse para unirse al ADN y enzimas asociadas a este (topoisomerasa I y la ARN polimerasa), inhibiendo así el crecimiento bacteriano por la interacción con los ácidos nucleicos (**figura 3**) (Téllez *et al.*, 2010).

2.5.1.2.2 Inhibición de enzimas dependientes de ATP por interacción con ATP

La mayoría de los PAMs citoplasmáticos efectivos se dirigen a procesos dependientes de ATP, generalmente son de naturaleza catiónica, los cuales se unen con el ATP cargado negativamente. Debido a que el ATP interviene en diversos mecanismos celulares, estos péptidos anfífilicos de unión a ATP (luciferasa y ADN polimerasa) poseen varias dianas, por lo que son denominados “medicamentos sucios” (Moravej *et al.*, 2018; Téllez *et al.*, 2010).

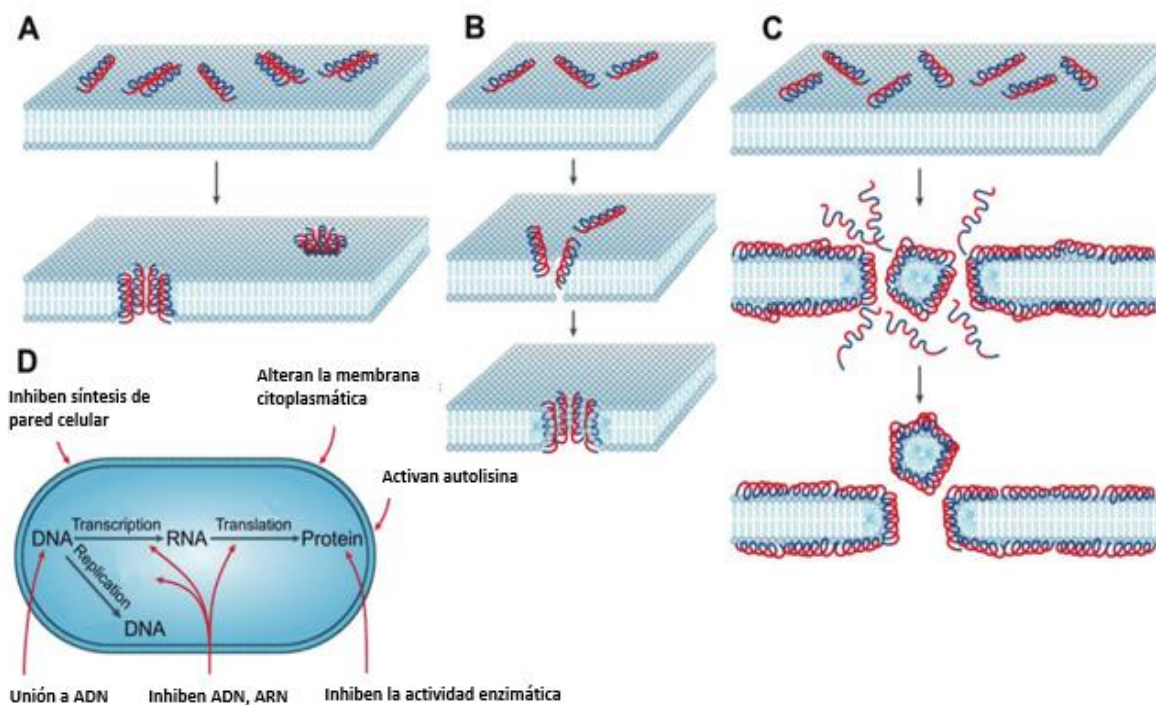


Figura 3. Mecanismos de acción de los PAMs. A) Mecanismo de barril, B) Mecanismo toroidal, C) Mecanismo de alfombra y de agregado, D) Mecanismos intracelulares de los PAMs (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

2.6 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es el mecanismo por el cual, la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los antibacterianos. Esta resistencia a antibióticos puede ser de tipo natural y/o adquirida. En el primer tipo, el mecanismo involucra la pérdida de los sitios blanco o la posesión de barreras naturales que hacen que el antibiótico no actúe. Mientras que, en la resistencia a antibióticos adquirida, el mecanismo implica un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria. El resultado final es que los gérmenes que inicialmente son sensibles a un antibiótico, ya no lo son (Khardori, 2006).

2.6.1 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos

Existen cuatro mecanismos de acción de resistencia bacteriana más frecuentes mediante los cuales las bacterias desarrollan resistencia como **(figura 4)** (Khardori, 2006):

- Limitar la concentración de antibiótico a nivel interno mediante el sistema de bombas de eflujo.
- Neutralizar el medicamento mediante la producción de enzimas.
- Impedir la entrada del antimicrobiano al alterar los sitios blanco o al crear nuevas vías metabólicas.
- Alterar la permeabilidad de la membrana bacteriana limitando el ingreso del antibiótico.

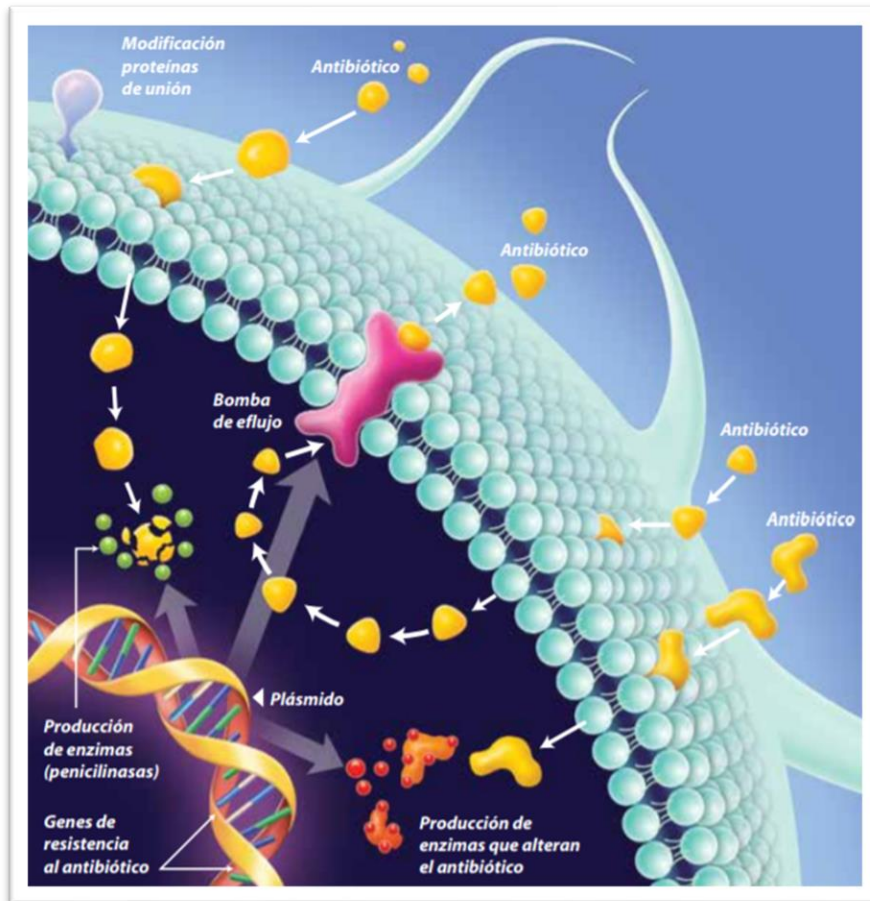


Figura 4. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos. Tomado de (GlaxoSmithKline, n.d.).

2.6.2 Mecanismos de resistencia bacteriana a PAMs

Cuando los PAMs poseen carga neta positiva son atraídos por la carga de la membrana externa bacteriana (carga negativa). Por lo tanto, uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana a PAMs es la modificación de la carga de la superficie bacteriana, mediante la reducción de su carga superficial y el aumento de su densidad superficial, lo que limita la adhesión del péptido. En bacterias Gram positivas se lleva a cabo mediante la D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la membrana externa bacteriana, que reducen la carga neta negativa y confiere una relativa protección contra los PAMs. Mientras que en las bacterias Gram negativas la regulación de la carga superficial es mediante la modificación de los lipopolisacáridos; por fosforilación reducida, sustitución de un azúcar o adición de lípidos (Bechinger *et al.*, 2017).

Algunas especies de *Salmonella* reducen la fluidez de la membrana externa aumentando las interacciones hidrofóbicas, este incremento retarda o suprime la inserción de los PAMs en la membrana y la formación de poros en ella (Téllez *et al.*, 2010).

Las bombas de eflujo presentes en las membranas externas bacterianas actúan contra los PAMs intracelulares, los cuales son susceptibles de su salida activa de la bacteria. Cuando los PAMs intracelulares no son movilizados al exterior por las bombas de eflujo, pueden usarse para detectar a aquellos PAMs activos que no son susceptibles a las bombas de eflujo y con ello poder diseñar PAMs contenidos en nano y micropartículas, evitando así su salida del interior de la bacteria (Bechinger *et al.*, 2017).

Por otro lado, hay bacterias que han sido capaces de degradar a los PAMs mediante la producción de enzimas proteolíticas como; las elastasas, gelatinasas, metaloproteasas, proteasas de cisteína y proteasas de superficie, estos microorganismos son: *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* (Téllez *et al.*, 2010).

La neutralización de PAMs por producción de moléculas unidas a la membrana o secretadas es otro mecanismo de resistencia bacteriana. *Staphylococcus aureus* produce estafilocinasa, la cual es una proteína capaz de unirse a α -defensinas humanas, lo que inhibe su efecto bactericida (Téllez *et al.*, 2010).

2.7 Estrategias para evadir la degradación de los PAMs

Una forma de proteger a los péptidos de la acción de proteasas es mediante la encapsulación de estos en nanopartículas, tal como lo hicieron Groo y colaboradores mediante nanocápsulas lipídicas (LNC), mejorando la eficiencia y estabilidad de su PAM AP138 para ejercer su acción antimicrobiana. Ellos analizaron el efecto del ataque enzimático de AP138 solo y con LNC después de incubarlas con tripsina. Al final AP138 se encapsuló eficazmente en las LNC (97.8% de eficiencia) y ayudó a preservar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y MRSA (Groo *et al.*, 2018). De esta forma evadieron algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana como: el cambio de la permeabilidad y carga de la membrana, la actividad de las proteasas y proteínas neutralizantes; así como de proteasas y proteínas de

unión del propio huésped. Debido a esto último, se ha propuesto como una alternativa de aplicación de los PAMs la vía tópica.

Por otro lado, se han desarrollado análogos sintéticos (peptoides) de los PAMs, que les confieren características fisicoquímicas que los hacen más resistentes a las proteasas (Téllez *et al.*, 2010).

2.8 PAMs obtenidos de venenos

En la naturaleza hay diferentes fuentes de antimicrobianos, entre ellos los venenos de animales y extractos de algas y plantas. Existen muchos animales e insectos venenosos, los cuales poseen un aparato especial para aplicar su veneno, ya sea como defensa o como arma depredadora para inmovilizar a sus presas. Si bien, el veneno de estos animales puede estar compuesto por sales, péptidos, enzimas, nucleótidos, aminas, lípidos, entre otros componentes; los péptidos antimicrobianos son moléculas adyuvantes en el sistema inmune innato de algunos seres vivos (**tabla 5**) (Yacoub *et al.*, 2020).

Tabla 5. PAMs de diferentes venenos de animales e insectos

Péptido	Especie	Actividad	PM (kDa)	CMI	% Hemólisis	Referencia
Licotoxina I	<i>Lycosa carolinensis</i> (araña)	Antibacteriano, antifúngico.	2.84	<i>E. coli</i> 227.44- 426.45µg/ml <i>C. albicans</i> 113.72µg/ml	A 200µM hay 55%	(Yan & Adams, 1998)
Pandin 1	<i>Pandinus imperator</i> (escorpión)	Antibacteriano	4.79	<i>S. aureus</i> 12.47µg/ml <i>E. coli</i> 99.81µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> >99.81µg/ml, <i>C. albicans</i> >99.81µg/ml	A 106.53µg/ml hay 1.1%	(Corzo et al., 2001)
Dominulin-A	<i>Polistes dominulus</i> (avispa)	Antibacteriano	1.85	<i>E. coli</i> 8µg/ml	---	(Turillazzi et al., 2006)
Metilin	<i>Apis mellifera</i> (abeja)	Antibacteriano	2.84	<i>S. aureus</i> 8.3µg/ml, <i>MRSA</i> 3.12µg/ml	≥1µg/ml hay hemólisis	(Choi et al., 2015; Dempsey, 1990)
Pilosulina-1	<i>Myrmecia pilosula</i> (hormiga)	Antibacteriano, antifúngico	6.05	<i>S. aureus</i> 24.20µg/ml, <i>MRSA</i> 18.15µg/ml, <i>E. coli</i> 12.10µg/ml, <i>K. pneumonie</i> 12.10µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 48.41µg/ml, <i>C. albicans</i> 24.20µg/ml	A 60.52µg/ml hay 20%	(Zelezetsky et al., 2005)
Catelicidina BF	<i>Bungarus fasciatus</i> (serpiente)	Antibacteriano, antifúngico	3.63	<i>S. aureus</i> 4.7µg/ml, <i>MRSA</i> >100µg/ml, <i>E. coli</i> 2.3µg/ml, <i>K. pneumonie</i> 4.7µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 1.2µg/ml, <i>C. albicans</i> 4.7µg/ml	Sin hemólisis hasta 400µg/ml	(Wang et al., 2008)
Temporina-A	<i>Rana temporaria</i> (rana)	Antibacteriano, antifúngico	1.39	<i>S. aureus</i> 3.19µg/ml, <i>E. coli</i> 3.19µg/ml, <i>K. pneumonie</i> 13.34µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 500.4µg/ml, <i>C. albicans</i> 4.72µg/ml	Hemólisis >166.8µg/ml	(Simmaco et al., 1996)
Megin 1	<i>Megophrys minor</i> (sapo)	Antibacteriano, antifúngico	2.22	<i>S. aureus</i> 6.25 µg/ml, <i>E. coli</i> 25µg/ml, <i>C. albicans</i> 50µg/ml	A 50µg/ml hay 5.6%	(Yang et al., 2016)

Versión extendida en **Anexo 1**.

2.9 Veneno de Escolopendra

Con el tiempo se ha ido estudiando la composición del veneno de Escolopendra, encontrando que tiene componentes no peptídicos como: la 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) e histamina (Mohamed *et al.*, 1983; Undheim *et al.*, 2011), así como lípidos, polisacáridos y polipéptidos obtenidos a partir de extractos crudos de glándulas de veneno de ciempiés (Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, la gran mayoría de los componentes protéicos del veneno permanecieron sin describir. La novedad de los venenos de ciempiés fue evidente a partir de estudios iniciales sobre sus propiedades cardiotóxicas y neurotóxicas, donde los

componentes responsables de dichas actividades en el veneno eran de elevado peso molecular (Stankiewicz *et al.*, 1999; Undheim *et al.*, 2015).

Mientras tanto, Mohamed y sus colaboradores (Mohamed *et al.*, 1983), fueron los primeros en mostrar actividad enzimática en el veneno de ciempiés de *Scolopendra morsitans*, con la presencia de fosfatasa y esterasas. Estudios proteómicos demuestran que son abundantes componentes del veneno, lo que indica que las enzimas son componentes importantes de los venenos de ciempiés (Liu *et al.*, 2012; Undheim *et al.*, 2011).

Rates y colaboradores encontraron 62 y 65 proteínas mediante análisis cromatográfico bidimensional de los venenos de *Scolopendra viridicornis nigra* y *S. angulata*, respectivamente (Rates *et al.*, 2007). Los pesos moleculares de estas proteínas varían de 1.3 a 22.6 kDa. La secuenciación N-terminal de 24 de estas proteínas produjo un total de 10 familias de proteínas, de las cuales 9 familias no mostraron similitudes significativas con las familias de proteínas conocidas, lo que refleja que la composición del veneno y la estructura de los ciempiés son en gran parte desconocidas (Liu *et al.*, 2012).

También se han encontrado fracciones de veneno con actividad fosfolipasa A2 (PLA2) por HPLC del veneno de *S. viridis* y se ha clonado el gen que codifica esta enzima (González *et al.*, 2009). La PLA2 de *S. viridis* madura tiene 119 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 13752 Da. Los análisis filogenéticos mostraron que es más similar a las fosfolipasas de serpiente que a las secuencias de PLA2 de insectos o arácnidos. En *S. subspinipes mutilans* se identificaron 2 péptidos antimicrobianos de amplio espectro, con hemólisis moderada en eritrocitos humanos y de conejo. Mientras que también se ha encontrado en ese mismo veneno de *S. subspinipes mutilans* una serina proteasa (Liu *et al.*, 2012).

2.10 Antecedentes directos

2.10.1 *Scolopendra viridis* Say

Los ciempiés son de importancia significativa en salud pública porque tienen la capacidad de infligir inyecciones venenosas (Cupul, 2013; Shelley, 2002) que paralizan a su presa para poder comerla. Mientras que en humanos puede causar alteraciones locales como: dolor, inflamación, ulceración o necrosis; en casos más graves puede haber aturdimiento, cefalea, ansiedad, problemas respiratorios, crisis convulsivas y muerte (Cupul, 2010; Zavala *et al*, 1999).

Los ciempiés pertenecen al subfilo *Myriapoda*, clase *Chilopoda*, orden *Scolopendromorpha* (Ruppert & Barnes, 2007).

Taxonomía

- ↳ Animales (Reino Animalia)
- ↳ Artrópodos (Filo Arthropoda)
- ↳ Milpiés, Ciempiés Y Parientes (Subfilo Myriapoda)
- ↳ Ciempiés (clase Chilopoda)
- ↳ Ciempiés Tropicales (Orden Scolopendromorpha)
- ↳ Escolopendras (Familia Scolopendridae)
- ↳ Escolopendras (Género *Scolopendra*)
- ↳ Escolopendra (*Scolopendra viridis*)

El factor más importante que influye en su distribución es la humedad, por lo que se les observa con mayor frecuencia durante la temporada de lluvias, por la noche y en lugares húmedos (Cupul, 2013). Por lo que, los escolopendromorfos se encuentran generalmente en regiones templadas y tropicales, (Giribet, 2015). Especialmente, *Scolopendra viridis* Say 1821, se distribuye en Costa Rica, El Salvador, Estados Unidos, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá (Cupul, 2014b; Shelley, 2002). En época de sequía los ciempiés migran a zonas húmedas como cuevas, musgos e incluso se llegan a enterrar aún más en la tierra para mantener su humedad (Ruppert & Barnes, 2007).

Se caracteriza por tener 21 o 23 pares de patas, el cuerpo deprimido dorsoventralmente y moderadamente alargado, las antenas relativamente largas con al menos 17 segmentos, con o sin la presencia de cuatro ocelos de cada lado de la cabeza o placa cefálica (Cupul, 2014a;

Lewis, 1981). Pueden alcanzar hasta 20cm de longitud (**figura 5**); su cuerpo está conformado por:

- Una *cabeza* con dos apéndices o ganchos llamados forcípulas, los cuales tiene en su interior dos pequeños conductos unidos a glándulas productoras de veneno con características neurotóxicas (Zavala *et al.*, 1999). También sobresale de su cabeza un par de antenas alargadas y en cuya base se localiza el órgano de Tömösváry, el cual detecta CO₂ que exhala la presa y le ayuda a dirigirse a ella.

-Un *tronco multisegmentado* (21-23 segmentos), con un par de patas laterales en cada segmento.

-Un *segmento terminal* con un último par de patas modificadas, cuya función puede ser locomotora, sensorial o para sujetar (Cupul, 2013).



Figura 5. *Scolopendra viridis* Say en estadio adulto. (Tomado de: Laboratorio de Neurofarmacología)

Los ciempiés son depredadores de insectos pequeños, roedores, pájaros pequeños e incluso de otros ciempiés. Suelen ser de hábitos nocturnos, por lo que emergen en la noche para alimentarse. Los *Scolopendromorphos* construyen sus madrigueras en el suelo o debajo de piedras o troncos. Con respecto a su reproducción, los sexos están separados. Las hembras tienen un solo ovario tubular arriba del intestino. Su oviducto se abre a través de una aurícula genital mediana y gonoporos en la superficie ventral del segmento genital. Un par de receptáculos seminales también se abre hacia la aurícula genital. En el macho, uno o muchos testículos se encuentran por encima del intestino medio. Los testículos están conectados a un par de conductos de esperma que se abren a través de un gonoporo mediano en el lado ventral del segmento genital. La fertilización es interna y la transmisión de esperma es indirecta en ciempiés, como lo es en otros miriápodos; los cuales han evolucionado de forma independiente como adaptaciones para la vida en la tierra. (Ruppert & Barnes, 2007).

La hembra puede tener entre 15 o más huevos, ella excava un hoyo no muy profundo en la tierra y se coloca ahí rodeando a sus pequeños huevos con todo su cuerpo, incubándolos hasta que estos maduren y salgan de los huevos y se dispersen en el entorno para seguir creciendo por su parte (Ruppert & Barnes, 2007). Por observación propia, se sabe que el tiempo de incubación de los huevos de ciempiés son de aproximadamente un mes. El desarrollo completo de sus segmentos en los *Scolopendromorphos* es directo durante su incubación y su tiempo de vida de muchos ciempiés es alrededor de 4 a 6 años, aunque a veces pueden durar más (Ruppert & Barnes, 2007).



Figura 6. *Scolopendra viridis* hembra adulta. A) Incubando a sus huevos, B) Ciempiés jóvenes después de un mes de incubación. (Tomado por: Abundes, 2020).

2.10.2 PAMs encontrados en veneno de Escolopendra.

Se ha encontrado que el veneno de ciempiés posee diferentes propiedades terapéuticas; desde la antigüedad en la cultura China se ha utilizado al ciempiés para tratar el dolor y la inflamación, mientras que en Korea el veneno de las Escolopendras es utilizado para tratar la artritis, problemas de articulaciones, convulsiones, tétanos, carbunco, mordedura de serpiente y la alopecia areata (Fratini *et al*, 2017). En China la distribución de *Scolopendra subspinipes mutilans* es abundante; es por ello que es la especie de ciempiés más estudiada, y se ha encontrado que en su veneno hay moléculas con actividades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias, anticancerígenas y analgésicas (Cupul, 2010, 2013).

El veneno del ciempiés *Scolopendra subspinipes mutilans* es rico en péptidos antimicrobianos y se ha observado que poseen bajas concentraciones mínimas inhibitorias y hemólisis; lo que los hace buenos candidatos para antibióticos y antifúngicos. Sin embargo, en algunos de ellos falta descubrir el mecanismo por el cual ejercen su acción antimicrobiana. Por otro lado, también se ha probado obtener PAMs de la cutícula del ciempiés, tal es el caso de Pinipessin y Lacrain, los cuales son derivados de *Scolopendra subspinipes subspinipes* y *Scolopendra viridicornis*, respectivamente (Chaparro-Aguirre *et al.*, 2019; Chaparro & da Silva, 2016). Lo anterior nos muestra que aún hay más por explorar en el ciempiés para la búsqueda de nuevos PAMs. En la **tabla 6** se muestran algunos de los PAMs encontrados en el veneno de *Scolopendra*.

Tabla 6: Péptidos aislados del veneno de Scolopendra con actividad antimicrobiana.

Péptido	Especie	Actividad	PM (kDa)	CMI	% Hemólisis	Referencia
Scolopin I	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano, antifúngico.	2.59	<i>S. aureus</i> 1.2µg/ml <i>E. coli</i> 12.5µg/ml	A 50µg/ml hay 25%	(Hou et al., 2013; Peng et al., 2010)
Scolopin II	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano	3.01	<i>S. aureus</i> 0.5µg/ml <i>E. coli</i> 5µg/ml	A 50µg/ml hay 32%	(Peng et al., 2010)
Scolopendin I	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano, antifúngico.	4.49	<i>S. aureus</i> 26.35µg/ml, <i>E. coli</i> 26.35µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 26.35µg/ml, <i>C. albicans</i> 52.71µg/ml	Sin hemólisis	(H. Choi et al., 2014)
Scolopendrasin I	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano, anticancerígeno	---	---	---	(Fratini et al., 2017)
Scolopendrasin II	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano	2.47	* <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. acnes</i>	Sin hemólisis hasta 320µg/ml	(Kwon et al., 2013)
Scolopendrasin V	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano, antifúngico.	1.73	* <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	Sin hemólisis hasta 100µg/ml	(Lee, Kim, et al., 2017b)
Scolopendrasin VII	<i>S. subspinipes mutilans</i>	Antibacteriano, anticancerígeno	2.27	---	--	(Park et al., 2015)
Lacrain	<i>Scolopendra viridicornis</i>	Antibacteriano	0.92	<i>S. aureus</i> ND, <i>E. coli</i> 5.8µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 5.8µg/ml	Sin hemólisis	(Chaparro & da Silva, 2016)
Pinipesin	<i>S. subspinipes subspinipes</i>	Antibacteriano	1.21	<i>S. aureus</i> 7.58 µg/ml, <i>E. coli</i> 15.16µg/ml, <i>P. aeruginosa</i> 15.16µg/ml, <i>C. albicans</i> 30.33 µg/ml	Baja hemólisis a 30.33µg/ml	(Chaparro-Aguirre et al., 2019)

*Solo se realizó prueba de difusión radial, sin CMI

PM: peso molecular

ND: no detectado a las concentraciones probadas

2.10.2.1 PAMs identificados en el veneno de Scolopendra del Laboratorio de Neurofarmacología.

En el Laboratorio de Neurofarmacología del CEIB de la UAEM, se han estudiado los componentes peptídicos de veneno de *Scolopendra viridis* y *Scolopendra polymorpha*; gracias a que se encuentran ampliamente distribuidas en el estado de Morelos es posible identificar y analizar nuevos péptidos activos que puedan mejorar la actividad de algunos medicamentos y bioinsecticidas comerciales; valorando que la relación riesgo-beneficio sea favorable para estos péptidos/ proteínas propuestos.

Anteriormente, Cruz en el 2014 encontró que la proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis*, era una de 7 proteínas (220, 153, 90, 40, 31, 23, 20kDa) y un péptido

(8kDa) que tenían actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC29213 y aislados clínicos de MRSA (Cruz, 2014). Estas proteínas y péptido antimicrobianos se probaron a una concentración de 2µg/µl cada uno; también se les hizo la prueba de hemólisis en donde la proteína de 220kDa fue la que tuvo menor actividad hemolítica en eritrocitos humanos (0.093%), mientras que la proteína de 40kDa presentó un 1.86% de hemólisis a una concentración de 1µg/µl (**tabla 7**).

Por otro lado, Valladares en el 2016 encontró que la proteína de 40kDa tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.5µg/µl. No se han descrito las concentraciones mínimas inhibitorias de las demás proteínas/péptidos antimicrobianos encontrados en el veneno de *Scolopendra viridis*. Sin embargo, en el 2014 Rodríguez determinó la CMI del péptido antimicrobiano SPC13 y que este PAM es un fragmento de una proteína del veneno de *Scolopendra polymorpha*. Su concentración mínima inhibitoria fue de 9µg/µl y una hemólisis del 20.5% (Rodríguez, 2014).

Tabla 7: Ensayos antimicrobianos con diferentes proteínas del veneno de *Escolopendra* contra *S. aureus*.

	Proteína (kDa)	Halo inhibición <i>S. aureus</i> ATCC29213 (mm)*	Halo de inhibición de aislados clínicos MRSA (mm)	% Hemólisis ^a	Referencia
<i>S. viridis</i>	220	6	≥ 4	0.093	(Cruz, 2014)
	153	5	< 4	0.186	
	90	6	< 4	0.653	
	40	6	≥ 4	1.860	
	31	5	SH	2.050	
	23	5	≥ 4	2.140	
	20	3	SH	6.340	
	8	4	SH	14.830	
	Proteína (kDa)	Halo inhibición <i>S. aureus</i> ATCC29213 (mm)**	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (µg/µl)		Referencia
	40	4.82	0.5		(Valladares et al, 2016)
<i>S. Polymorpha</i>	Proteína (kDa)	Halo inhibición <i>S. aureus</i> ATCC29213 (mm)***	CMI (µg/µl)	% Hemólisis	Referencia
	13 (SPC13)	7	9	20.5	(C. Rodríguez, 2014)

* [Proteína]= 2µg/µl, ^a= [Proteína]= 1µg/µl

** [Proteína]= 1.3µg/µl

*** [Proteína]= 3µg/µl

SH → Sin halo

3. Justificación

El uso irracional de antibióticos ha sido un factor importante en la resistencia bacteriana a múltiples fármacos a nivel global, llegando a ser una grave amenaza para la salud pública. Por lo que se pretende buscar una nueva alternativa farmacoterapéutica con antimicrobianos de origen natural, tales como los péptidos y proteínas presentes en el veneno de *Scolopendra viridis*; que ayuden a combatir no solo infecciones por microorganismos comunes, sino que también pueda combatir bacterias resistentes a fármacos.

En estudios previos en el Laboratorio de Neurofarmacología se encontró que la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* presenta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y algunos aislados clínicos de MRSA; lo que hace a esta proteína un posible candidato como fármaco para tratar infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, también hay infecciones asociadas a cepas bacterias Gram negativas; es por ello que se pretende evaluar la actividad antimicrobiana frente a algunas cepas Gram negativas de interés clínico, tomando como referencia la concentración mínima inhibitoria reportada para *S. aureus*. Con ello se podrá determinar si la proteína de 40kDa es de espectro corto o amplio y si tiene un efecto de acción bacteriostático o bactericida a una determinada concentración.

4. Hipótesis

La proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis* Say presentará actividad antimicrobiana en al menos una bacteria Gram negativa y una Gram positiva de interés clínico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico.

5.2 Objetivos específicos

- ❖ Purificar la proteína antimicrobiana de 40kDa presente en el veneno de *Scolopendra viridis* Say.
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis* Say en la cepa modelo (*S. aureus*).
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis* Say en diferentes cepas bacterianas Gram negativas y una Gram positiva diferente a *S. aureus*.
- ❖ Determinar el efecto de acción de la proteína de 40kDa en las diferentes cepas a una determinada concentración.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Colecta del organismo de estudio

Se colectaron ciempiés *Scolopendra viridis* Say en la zona boscosa del Norte de Cuernavaca dentro del campus Chamilpa de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (18°59'13.2"N 99°14'06.7"W), se buscó especialmente en terreno con tierra suelta y pedregoso, en un horario de 7:40 a 9:30am, para evitar que el sol calentara más la superficie donde se encontraban los ciempiés y se enterrasen aún más.

Se hallaron principalmente bajo piedras y trocos en estado de descomposición, en época de lluvias (Junio-Octubre) y en clima húmedo y templado. Los terrenos donde se encontraron los ciempiés, eran terrenos dedicados a la siembra de milpas, pastura de ganado vacuno y equino; sin embargo, la colección se llevó a cabo en las partes donde no había milpas, por la gran cantidad de piedras que había distribuidas ahí. Por lo menos en 6 de cada 10 piedras que se alzaban para ver si había ciempiés, se colectaba un ciempiés por cada piedra.

7.2 Mantenimiento del organismo de estudio

Las Escolopendras colectadas se cuidaron para su posterior ordeña de veneno en el Laboratorio de Neurofarmacología del CEIB en la UAEM. En pequeños contenedores de plástico se colocó tierra húmeda del lugar de su colección hasta el 50% de su capacidad y suficiente ventilación (con 10 a 15 orificios pequeños en la tapa del recipiente). Se les dio de comer cada tercer día la mitad de un tenebrio, se ordeñaron inicialmente cada quince días y posteriormente una vez al mes.

7.3 Extracción del veneno de ciempiés

Se ordeñó a los ciempiés para poder extraer su veneno de las glándulas, mediante la estimulación de sus forcípulas. Para ello, se adormecieron exponiéndolos a una temperatura de 4°C por 5 minutos; posteriormente se estimuló manualmente la base de las forcípulas. Con ayuda de una punta de micropipeta, por capilaridad se colectaron las gotas de veneno que salieron de las forcípulas y se colocaron en un tubo eppendorf con 20µl de agua bidestilada.

Al término de la ordeña, el veneno fue liofilizado (Labconco a 0.2 atmosferas, temperatura de -110°C), para que al día siguiente se cuantificara la proteína del veneno total (Laboratorio de Neurofarmacología, CEIB).

7.4 Cuantificación de la parte proteica de veneno total extraído

7.4.1 Método colorimétrico de Lowry

Por el método colorimétrico de Lowry se cuantificó la proteína del veneno total de *Scolopendra viridis*. Donde primero se hizo una curva estándar (**Anexo 2**) a una concentración de 3mg/ml de BSA (seroalbumina bovina-proteína estándar) (Lowry et al., 1977).

Posteriormente se agregaron 2ml de una mezcla de solución 1, tartrato de sodio y potasio más CuSO_4 (**Anexo 3**); tomando 250 μl de tartrato de sodio y potasio, y CuSO_4 para 25ml de solución 1.

Se agregaron 100 μl de reactivo de Folin puro a cada tubo e inmediatamente se agitó en el bortex No. 8 y se dejó corriendo la reacción por 15 minutos. Después se leyó a una longitud de onda de 560nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific.

El procedimiento fue el mismo para la muestra, solo cambiando el volumen de agua con respecto al volumen de muestra para obtener 1ml.

7.5 Separación de la proteína de 40kDa del veneno total

7.5.1 Electroforesis SDS-PAGE 12%

Se separó la proteína de 40kDa mediante una electroforesis SDS-PAGE al 12% (**Anexo 4**). Se cargaron los marcadores de peso molecular y las muestras añadiéndoles buffer de carga. Se corrió a 75V dentro de un buffer de corrida (**Anexo 5**) durante dos horas.

Al terminar la electroforesis, se cortaron los carriles del gel con el marcador de peso molecular y el carril con veneno total juntos y se tiñeron con azul de Coomassie por 30

minutos. Después se lavó con solución desteñidora (**Anexo 6**) que eliminó el exceso de colorante y se visualizaron así a las bandas de interés.

El resto del gel sin teñir se colocó en una cámara húmeda a 4°C, se cortó la banda de interés y se colocó en un tubo eppendorf. Se guardó en el refrigerador para su posterior electroelución.

7.6 Purificación de la proteína

7.6.1 Electroelución

El trozo cortado del gel de electroforesis se colocó en un tubo sellado con una membrana de diálisis, donde las proteínas con un peso molecular superior a 8,000 Da son retenidas. Posterior a esto, se colocó en la cámara de electroelución y se corrió en frío a un flujo constante de 75V por 2 horas para así extraer la proteína del gel con ayuda de un buffer de Tris- HCl 50mM pH 6.8 (**Anexo 7**).

7.6.2 Diálisis

En la diálisis se colocaron en las membranas de poro de 8-14kDa las muestras selladas con pinzas y ligas para evitar la pérdida de muestra. Posteriormente las membranas se colocaron en un vaso de precipitados de plástico de 5L lleno de agua fría miliQ y un agitador; se llevó al cuarto frío con una temperatura de 4°C y se dejó en agitación constante durante los 3 lavados con agua miliQ de una hora cada uno de ellos. La diálisis ayudó a extraer las sales existentes en la muestra y a retener las proteínas dentro de la membrana.

7.6.3 Liofilización

Se llevó a cabo un proceso de secado de la muestra, donde se eliminó completamente el agua de esta, con ayuda de una liofilizadora Labconco a 0.2 atmosferas de presión y a una temperatura de -110°C.

7.6.4 Purificación de la muestra por HPLC y su identificación

Una vez liofilizada la proteína se resuspendió en 20µl de agua HPLC, y se cuantificó por el método de Lowry, colocando solo 0.3µl de la proteína.

Posteriormente, una muestra de veneno total y de la proteína de 40kDa se corrieron por separado por RP-HPLC en un gradiente de 0 a 60% acetonitrilo y un flujo de 1ml/min por 60 minutos (columna C18 y cromatógrafo Agilent 1100 Seves en el Laboratorio del Dr. Gerardo Corzo; IBT, UNAM). Las fracciones se colectaron en tubos eppendorf y falcón, en seguida se colocaron en la campana de extracción para evaporar el disolvente, y en la liofilizadora para eliminar el exceso de agua.

Se volvió a cuantificar la proteína de cada pico obtenido de HPLC por el método de Lowry. De cada pico se tomaron 10µg para correrlos en un gel SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie, con el fin de corroborar el tamaño de la proteína en cada pico.

Así mismo, se hizo un ensayo antimicrobiano directo en gota, colocando una concentración de muestra de cada tiempo de retención colectado de 0.5µg/µl en un volumen de 2.5µl, en medio de cultivo Mueller Hinton con *S. aureus* previamente inoculada. Y teniendo como control positivo ampicilina a la misma concentración y volumen que las muestras, y como control negativo solución salina estéril al 0.9% y agua HPLC.

Se corrió de igual forma 1mg de veneno total y se colectaron los diferentes tiempos de retención para hacerles un ensayo antimicrobiano e identificar la proteína de 40kDa.

Una vez purificada e identificada la proteína antimicrobiana de 40kDa, se ocupó para los diferentes ensayos de caracterización.

7.7 Ensayo antimicrobiano, método por difusión en gota

Se estandarizó la suspensión del inóculo en medio LB tomando 1 ml de la cepa y se le adicionó a 5ml de caldo LB, se incubó a 37°C por 16 horas. Posteriormente se tomó una alícuota de 100µl de la cepa incubada y se adicionó a 3ml de solución salina estéril al 0.9%. Se midió su absorbancia a 600nm, y se ajustó a una D.O. de 0.056.

En medios de cultivo de agar Mueller Hinton (39g/L) se realizó un estriado masivo de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Posteriormente se colocó una alícuota de 2.5µl de la proteína de 40kDa antimicrobiana y de ampicilina (control positivo) a una concentración de 0.5 µg/µl, así como 2.5µl de solución salina 0.9% estéril y buffer de electroelución como controles negativos (en el caso de la proteína obtenida por HPLC se colocó agua HPLC como control negativo).

Se incubó por 24h a temperatura ambiente. La actividad antimicrobiana se determinó mediante la medida del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en el lugar donde fueron colocadas las alícuotas de la proteína (Cavalieri *et al.*, 2005).

7.7.1 Efecto de acción de la proteína de 40kDa sobre las bacterias

Una vez observado el halo de inhibición de crecimiento causado por la proteína de 40kDa en las diferentes cepas, se tomó cuidadosamente una asada de ese halo y se sembró de nuevo en un medio Mueller Hinton, posteriormente se incubó 18h a temperatura ambiente, con el fin de observar si volvía o no a crecer la bacteria; con ello determinaríamos si la proteína a la concentración de 0.5µg/µl es capaz de tener un efecto bacteriostático o bactericida sobre cada cepa bacteriana ensayada.

8. Resultados

En promedio para correr un gel de electroforesis se necesitan entre 418 a 500 μ g de veneno total, que son obtenidos de la ordeña de unos 150 a 200 ejemplares; dando un rendimiento aproximado del 12.45% de proteína de 40kDa purificada.

8.1 Perfil proteico del veneno total de *Scolopendra viridis*

El perfil proteico del veneno de ciempiés se obtuvo mediante un gel SDS-PAGE al 12% y con ayuda del marcador de peso molecular de Bio-Rad Cat. #161-0318, y se calcularon los pesos moleculares de las 18 bandas observadas (**Anexo 8**). Este gel ayudó a separar e identificar las proteínas presentes en el veneno, para posteriormente purificarlas y cuantificarlas.

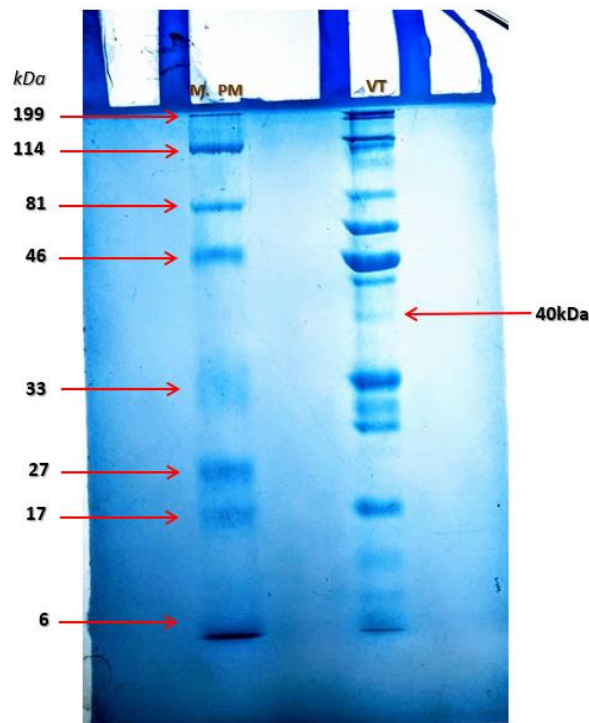


Figura 7. Perfil proteico del veneno de *Scolopendra viridis* corrido en un gel de SDS-PAGE al 12%. En el carril M PM se encuentran los marcadores de peso molecular, y en el carril VT está el veneno total del ciempiés. En este último carril se señala una tenue banda, que es la proteína de 40kDa.

8.2 Perfil cromatográfico del veneno total de *Scolopendra viridis*

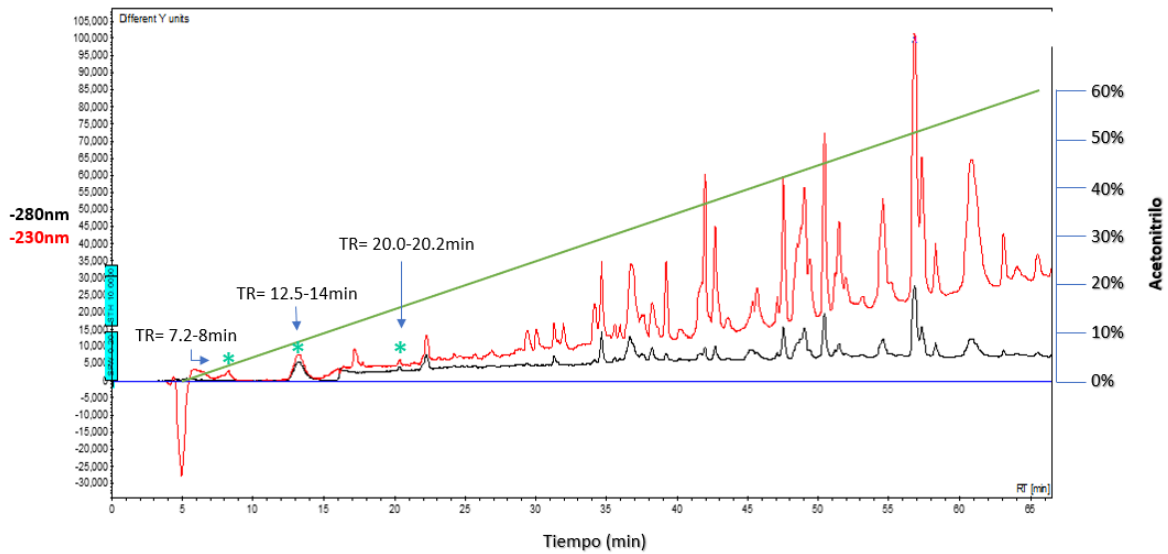


Figura 8. Cromatograma del veneno total de *Scolopendra viridis*. 212 μ g de la muestra de veneno total se corrieron por HPLC fase reversa, en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo por 60 minutos y un flujo de 1ml/min; se colectó cada pico observado en el cromatograma y se les hizo un ensayo de actividad antimicrobiana directo en gota con una concentración proteica de 0.5 μ g/ μ l, siendo solo los tiempos de retención de 7.2-8min, 12.5-14min, 20-20.2min los que tuvieron actividad antimicrobiana.

8.2.1 Perfil cromatográfico de la fracción de la proteína de 40kDa

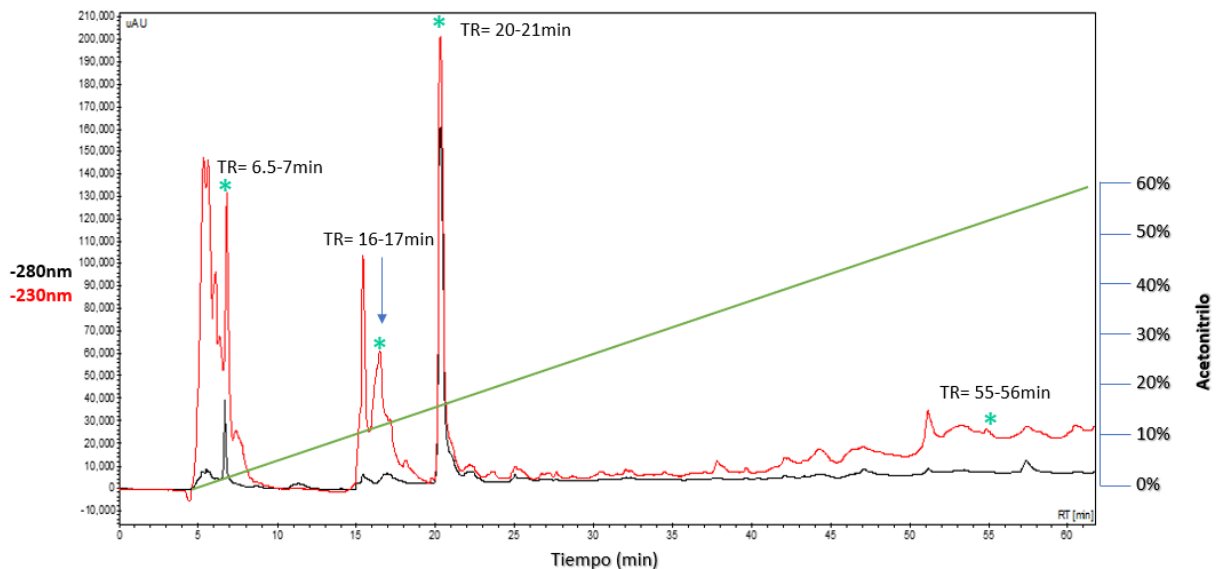


Figura 9. Cromatograma de la fracción proteica de 40kDa purificada por electroforesis. La muestra de la proteína de 40kDa (32.8µg) previamente purificada por electroelución y diálisis se corrió por HPLC en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo y un flujo de 1ml/min; se colectó cada pico observado en el cromatograma y se les hizo un ensayo de actividad antimicrobiana directo en gota con una concentración proteica de 0.5µg/µl, siendo solo los tiempos de retención de 6.5-7min, 16-17min, 20-21min y 55-56min los que tuvieron actividad antimicrobiana.

Se corrió un gel SDS-PAGE 12% con los tiempos de retención que tuvieron actividad antimicrobiana, para poder identificar el tamaño de las proteínas que estaban ejerciendo la actividad antimicrobiana, obteniendo que en el tiempo de retención 55-56min fue donde se encontró una banda de 43kDa acompañada de otras dos bandas más, una de 55kDa y otra de 22kDa.

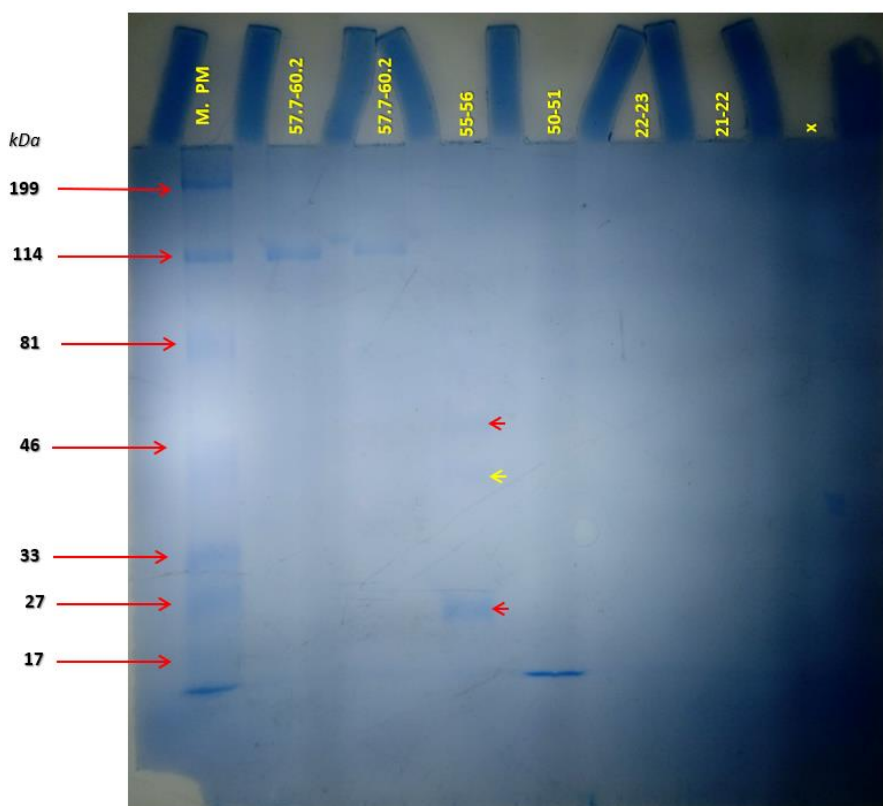


Figura 10. Gel SDS-PAGE 12% de los tiempos de retención de RP-HPLC con actividad antimicrobiana. En los carriles de tiempo de retención de 57.7-60.2min se observa una banda a la misma altura de 125kDa, en el carril de 55-56min se observan tres bandas (55, 43, 22kDa), en el carril de 50-51min hay una banda de 71kDa y en los carriles de 22-23min y 21-22min no se observaron bandas.

8.3 Ensayos antimicrobianos con *S. aureus*

Los ensayos antimicrobianos se realizaron con la cepa de *S. aureus*, en muestras purificadas de la proteína de 40kDa mediante electroelución y diálisis, así como las obtenidas por purificación con HPLC fase reversa.

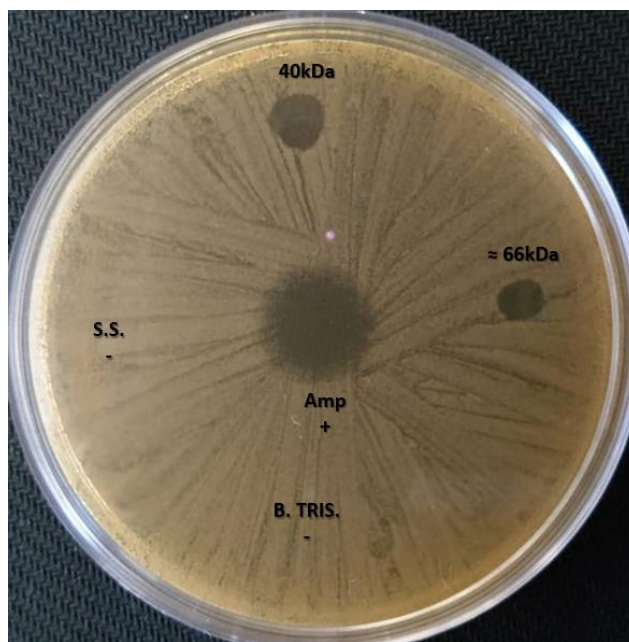


Figura 11. Ensayo antimicrobiano de la proteína de 40kDa purificada por electroelución y diálisis. La actividad de la proteína contra *S. aureus* se realizó a una concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La ampicilina fue el control positivo, mientras que el buffer TRIS-HCl 50Mm pH 6.8 utilizado en la electroelución y la solución salina 0.9% estéril, fueron los controles negativos.

Tabla 8. Halos de inhibición de crecimiento de *S. aureus* por la proteína de 40kDa. Promedio de 5 experimentos independientes

Muestra	Halo (mm)
Proteína 40kDa	5.2 ± 1.09
Ampicilina	12.4 ± 1.51
NaCl 0.9%	0
Buffer TRIS-HCl	0

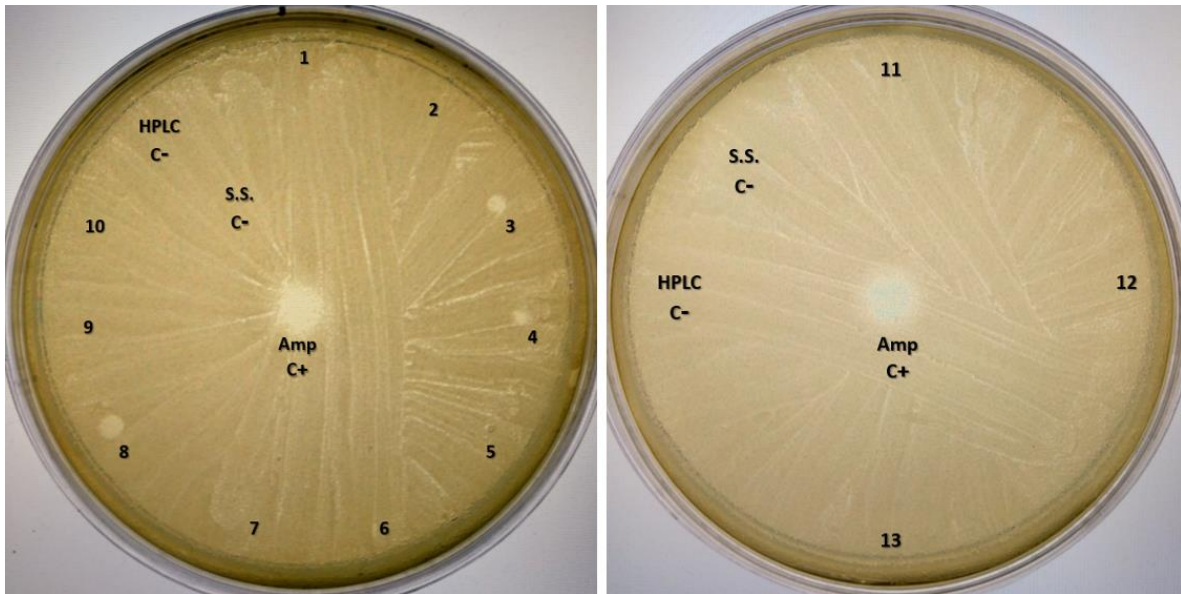


Figura 12. Ensayo antimicrobiano de las fracciones del veneno total separados por RP-HPLC. La actividad de las fracciones del veneno total contra *S. aureus* se realizó a una concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La ampicilina fue el control positivo, mientras que el agua HPLC y la solución salina 0.9% estéril, fueron los controles negativos. Para el ensayo antimicrobiano se tomaron en cuenta los componentes comunes entre el perfil cromatográfico del veneno total y los de la fracción proteica de 40kDa.

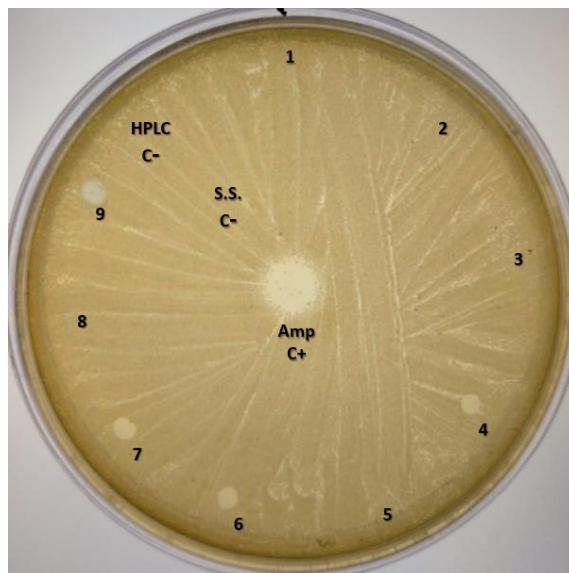


Figura 13. Ensayo antimicrobiano de la fracción proteica de 40kDa separados por RP-HPLC fase reversa. La actividad de la fracción proteica de 40kDa contra *S. aureus* se realizó a una concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen de $2.5\mu\text{l}$. La ampicilina fue el control positivo, mientras que el agua HPLC y la solución salina 0.9% estéril, fueron los controles negativos.

Tabla 9. Halos de inhibición de crecimiento de *S. aureus*. Se muestra que los tiempos de retención donde hubo actividad antimicrobiana son similares en ambos casos, excepto en el tiempo de retención de 55.2min, que no tuvo actividad entre los tiempos observados en el veneno total.

Fracciones analizadas a partir del veneno total			Fracción de la proteína de 40kDa		
Fracción	RT (min)	Halo (mm)	Fracción	RT (min)	Halo (mm)
1	6.5-7	0	1	4.6-5.3	0
2	7-7.2	0	2	5.3-5.7	0
3	7.2-8	2	3	6.0-6.5	0
4	12.5-14	1.5	4	6.5-7.0	3
5	16-16.2	0	5	7.0	0
6	16.2-17	0	6	16-17	3
7	17-17.5	0	7	20-21	4
8	20-20.2	3	8	21.0	0
9	20.2	0	9	55.2	4
10	21.8-22.4	0	Amp.	--	8
11	50.2-51	0	NaCl 0.9%	--	0
12	51-52	0	Agua HPLC	--	0
13	54-55	0	Agua HPLC	--	0
Amp.	--	6			
NaCl 0.9%	--	0			
Agua HPLC	--	0			

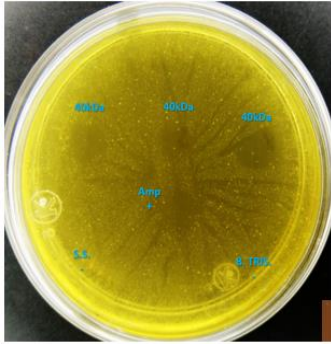
8.4 Ensayos antimicrobianos y efecto de acción con más cepas bacterianas.

La proteína fue probada con otras cepas bacterianas a una concentración de 0.5µg/µl, las cepas inhibidas fueron *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.* y *P. aeruginosa*; solo sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* no tuvo efecto inhibitorio. La concentración de los controles positivos fue igual que la concentración de la proteína.

Se tomó un poco de cepa del halo de inhibición que causó la proteína y se sembró. Se observó que en todos los casos las cepas vuelven a crecer; lo que indica que la proteína tiene un efecto de acción bacteriostático a una concentración de 0.5µg/µl.

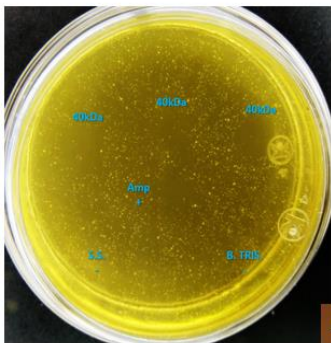
Lista de tablas y figuras de las diferentes cepas probadas con la proteína de 40kDa obtenida del veneno de *Scolopendra viridis* Say a una concentración de 0.5µg/µl. Para todas las cepas el promedio y desviación estándar de los halos de inhibición son de 4 ensayos independientes.

Resiembra de halos



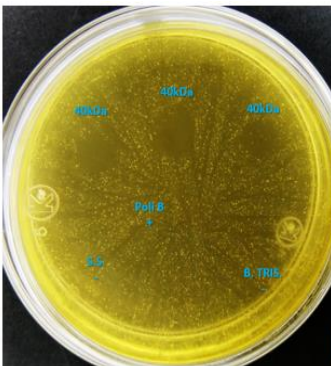
S. aureus

Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>S. aureus</i>	5.25±0.50	Si	Bacteriostático
Ampicilina	7.0±1.41	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---



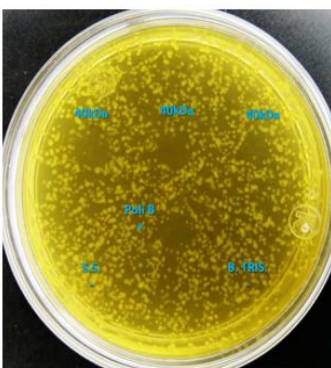
L. monocytogenes

Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>L. monocytogenes</i>	5.75±1.50	Si	Bacteriostático
Ampicilina	8.0±2.82	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---



Salmonella sp.

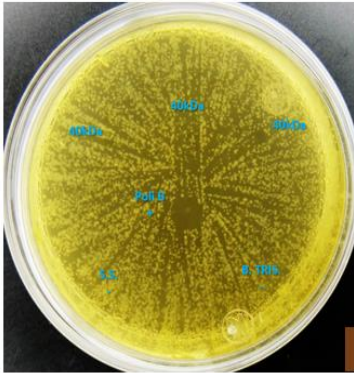
Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>Salmonella sp.</i>	6.25±0.95	Si	Bacteriostático
Polimixina B	0	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---



P. aeruginosa

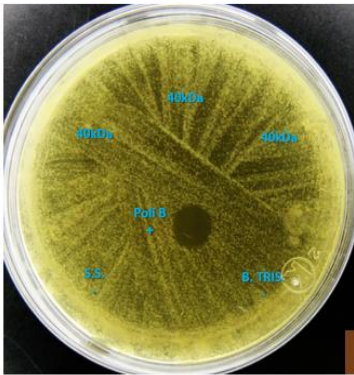
Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>P. aeruginosa</i>	5.50±1.0	Si	Bacteriostático
Polimixina B	6.0±0	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---





E. coli

Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>E. coli</i>	0	NO	---
Polimixina B	5.50±0.70	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---



K. pneumoniae

Muestra	Halo (mm)	Resiembra	Efecto de acción
<i>K. pneumoniae</i>	0	NO	---
Polimixina B	5.50±0.70	NA	---
NaCl 0.9%	0	NA	---
Buffer TRIS-HCl	0	NA	---

9. Discusión

Este trabajo se enfocó en una proteína de 40kDa que está presente en el veneno de *Scolopendra viridis*, originaria de Morelos. Mediante la experiencia de ordeña y perfiles de este ciempiés, se observó que la cantidad de veneno obtenido depende de la cantidad de especímenes; sin embargo, es necesario tomar en cuenta que no todos los ciempiés dan veneno y otros llegan a dar más del esperado.

El halo promedio de inhibición que causa la proteína de 40kDa en *S. aureus* es de 5.2mm a una concentración de 0.5µg/µl, que comparado con el péptido SPC13 de *Scolopendra polymorpha* con un halo de 7mm a 3µg/µl (Rodríguez, 2014), nos sugiere que la proteína de 40kDa presenta un efecto inhibitorio de interés.

Los cromatogramas de la fracción de la proteína de 40kDa purificada y del veneno total muestran tiempos de retención con actividad antibacteriana similares; para poder identificar que proteínas fueron las involucradas en esta actividad, se realizaron geles SDS-PAGE 12%; observando que en el tiempo de retención de 55-56min, al menos en dos ensayos independientes se encuentran 3 bandas de peso molecular de 55, 43 y 22kDa. Esto coincide con lo reportado por Cruz en el 2014, donde entre las proteínas antimicrobianas que identifica se encuentra una de 20kDa y una de 40kDa, y sus tiempos de retención son de 50 y 55min respectivamente; esta diferencia en el tiempo de retención de la proteína de 20kDa puede deberse a la diferencia de flujos a la que se corrieron; ya que Cruz reporta haberla corrido a un flujo de 0.8ml/min, mientras que en este trabajo se corrió a 1ml/min, lo que pudo haber alterado el tiempo de retención de estas dos proteínas. Sin embargo, no se descarta la idea de que la proteína de 20kDa pueda formar parte de alguna subunidad de la proteína de 40kDa, por lo que se pretende analizar detenidamente en un futuro trabajo.

Se sabe que el acetonitrilo es apolar (LogP=-0.34)(*Banco de Datos de Sustancias Peligrosas (HSDB): 42 - PubChem*, 2020) y en el cromatograma de la fracción proteica de 40kDa se observa que la proteína de 40kDa es eluida cuando el gradiente de acetonitrilo es de ≈56%, lo que sugiere que podría ser apolar. Sin embargo, siempre que se utilizaba la proteína para trabajar se resuspendía en agua grado HPLC, solubilizándose completamente; indicando que pudiera tener una naturaleza química anfipática. Esta característica de la proteína podría

contribuir es su mecanismo de acción antimicrobiano; para tener certeza de que es anfipática es necesario conocer la secuencia de aminoácidos y estructura de la proteína.

Anteriormente se reportó que la proteína de 40kDa era solo efectiva contra bacterias Gram positivas (ensayando solo con *S. aureus*), y que no podía ejercer efecto en bacterias Gram negativas (ensayado solo con *E. coli*) (Cruz, 2014); sin embargo, se observó en este trabajo que al probar esta proteína con más cepas tanto Gram positivas y negativas, si presenta actividad antimicrobiana, entre ellas contra *L. monocytogenes*, la cual es causante de muchas infecciones alimenticias (Granda, 2018). Por otro lado, se confirmó que la proteína de 40kDa no tiene efecto antibacteriano contra *E. coli*, pero al probar la proteína con más cepas Gram negativas como *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, se observó un efecto inhibitorio en las primeras dos cepas mencionadas, lo que descartó la idea de generalizar que la proteína no tenía actividad contra bacterias Gram negativas; sino que había algo en ciertas bacterias Gram negativas que las podía hacer más resistentes o susceptibles a la acción de la proteína de 40kDa.

Las diferencias buscadas entre las bacterias fueron principalmente en la estructura y componentes de su superficie bacteriana; ya que es el primer contacto que tiene la proteína y la bacteria. Como ya se mencionó al inicio de este trabajo las bacterias Gram negativas cuentan con dos membranas una externa y una interna, en medio de ellas se encuentra el espacio periplásmico, donde hay una delgada capa de peptidoglicano (Madigan et al., 2009; Silhavy et al., 2010). Al poseer esta doble membrana se puede pensar que tiene una mayor protección de los agentes externos como los antibióticos; sin embargo, algunos antibióticos van enfocados a las porinas presentes en esas membranas, por ser canales de transporte pasivo y permitir el paso de moléculas pequeñas, hidrofílicas e inespecíficas. Lo que permite la entrada de los antibióticos con estas características hasta el citoplasma de la bacteria. En el caso de *P. aeruginosa*, su baja permeabilidad se debe a una serie de porinas con débil efectividad; siendo una característica limitante para su susceptibilidad a los antibióticos que van enfocados a porinas (Ruíz, 2007), es por ello que dentro del tratamiento contra infecciones de *P. aeruginosa* se administran antibióticos como la polimixina, la cual aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana cuando se une a los fosfolípidos de la bacteria (Medscape, 2019), su uso puede ser de forma concomitante con ceftazidima o

carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem) los cuales van enfocados a la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana; en otros casos también se llega a administrar junto con quinolonas como levofloxacin o ciprofloxacino (Lloria, 2009; Medscape, 2019). Siguiendo en este sentido los diferentes mecanismos de acción, se propone que la proteína de 40kDa vaya enfocada a aumentar la permeabilidad de la membrana al unirse a los fosfolípidos, como lo hace la polimixina, tenido como antecedente que tiene la característica de ser anfipática.

Por otro lado, *Salmonella sp.* es caracterizada por poseer sus antígenos “H” u “O”, siendo este último parte de la estructura de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana exterior, los cuales actúan como barrera de protección hacia agentes externos. Cuando existe una infección por *Salmonella* se administran antibióticos como amoxicilina y ceftriaxona, que inhiben la síntesis de pared celular; la azitromicina y el cloranfenicol, inhibiendo la subunidad 50S ribosomal; ciprofloxacino, que afecta el metabolismo de los ácidos nucleicos y el trimetoprim con sulfametoxazol, inhibiendo la síntesis del ácido fólico (Calva, n.d.; Medscape, 2019). Con ello se observa que el tratamiento va enfocado a todos los blancos vulnerables de la bacteria.

En este caso por el tamaño que tiene la proteína de 40kDa, es imposible que entre a la bacteria y ejerza algún mecanismo de acción interno; pero a nivel extracelular pudiera actuar de forma similar a la lactoferrina, la cual se une a la pared celular bacteriana causando la liberación del lipopolisacárido y alterando su permeabilidad. Cabe mencionar que la lactoferrina es una glicoproteína de 80kDa producida por las células epiteliales de las mucosas de mamíferos. Cuando está en el organismo la lactoferrina es digerida por la pepsina gástrica de forma natural, lo que da origen a la lactoferricina, la cual ayuda en el mecanismo de acción de la lactoferrina contra las bacterias; ya que al desestabilizarse la membrana bacteriana, la lactoferricina penetra junto con otras inmunoglobulinas hasta la membrana interna, provocando un mayor daño en el microorganismo (Franco et al., 2005). Aunque no se sabe si la proteína de 40kDa pueda ser digerida o se disocie de sus subunidades de forma in vitro, para tener ayuda de algún péptido más pequeño que pueda ejercer su efecto antimicrobiano de forma interna en la bacteria; puede haber posibilidad de que de forma in vivo, con ayuda de algunas proteasas, sea fragmentada y actúe como la lactoferricina y la lactoferrina.

E. coli y *K. pneumoniae* fueron las cepas con resistencia a la proteína de 40kDa, esto puede deberse a sus antígenos “O” y “K” presentes en *E. coli* y la capsula en *K. pneumoniae*, los cuales aparte de tener propiedades antifagocíticas, también inhiben sustancias bactericidas (Canet, 2016; Lopez et al, 2010).

En el caso de las bacterias Gram positivas, las cuales poseen una gruesa capa de peptidoglicano y ácidos teicoicos y lipoteicoicos que sobresalen de su pared con actividad endotóxica, también generan una biopelícula mucoide para adherirse a las células y evitar su fagocitosis (Cervantes-García et al., 2014; Pérez et al, n.d.; Torres et al., 2005). Las infecciones por *S. aureus* y *L. monocytogenes* son tratadas por antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, meropenem y vancomicina, que van dirigidos a la inhibición de la biosíntesis de la pared bacteriana; el trimetoprim con sulfametoxazol, inhibe la síntesis de folatos; la rifampicina, moxifloxacino, levofloxacino, que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos; dicloxacilina y gentamicina, inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal de 30S; linezolid y clindamicina, inhiben la subunidad 50S ribosomal; mientras que la daptomicina desestabiliza la membrana e inhibe la síntesis de proteínas, ADN, ARN, causando la muerte celular (Bush et al, 2019; Medscape, 2019; Mensa et al., 2013). Al igual que con *Salmonella*, *S. aureus* es atacada en varias dianas indispensables para su supervivencia; pero la principal vía es la interacción con la pared de peptidoglucano y sus ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

Con base a lo analizado anteriormente, y observando que las cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *P. aeruginosa* tienen sensibilidad a la proteína de 40kDa a una concentración de 0.5µg/µl, con un efecto de acción bacteriostático, no se excluye la idea de que sea dosis dependiente y pueda llegar a ejercer un efecto bactericida a mayores concentraciones.

10. Conclusiones

- ❖ Se purificó la proteína de 40kDa por el método de electroelución y diálisis, así como RP-HPLC.
- ❖ El halo promedio de inhibición del crecimiento de *S. aureus* causado por la proteína de 40kDa fue de 5.2mm.
- ❖ Las muestras con tiempos de retención de 6.5-7min, 16-17min, 20-21min y 55-56min tuvieron actividad antimicrobiana a una concentración de 0.5µg/µl contra *S. aureus*.
- ❖ El tiempo de retención de la proteína de 40kDa por RP-HPLC es de 55-56min, la cual se encuentra muy cerca del tiempo de retención de la proteína de 20kDa; lo que propone que pueden ser proteínas distintas o que la proteína de 20kDa sea parte de alguna subunidad de la proteína de 40kDa.
- ❖ La proteína de 40kDa tiene actividad antimicrobiana hacia *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp* y *P. aeruginosa*. a una concentración de 0.5µg/µl; con un efecto de acción bacteriostático.

11. Perspectivas

- ❖ Realizar los ensayos de actividad hemolítica, concentración mínima inhibitoria, secuenciación e interacción membrana- proteína.
- ❖ Realizar una digestión de la proteína de 40kDa para determinar si tiene actividad antimicrobiana en alguno de los fragmentos y si en ellos se encuentra la proteína de 20kDa.
- ❖ Determinar la interacción superficie bacteriana-proteína de 40kDa y/o su péptido antimicrobiano derivado de la digestión enzimática de la proteína de 40kDa.

Bibliografía

- Aristil, P. (2012). *Manual de Farmacología Básica y clínica* (5th ed., p. 573). Mc Graw Hill.
- Banco de datos de sustancias peligrosas (HSDB): 42 - PubChem. (2020). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/42#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>
- Bechinger, B., & Gorr, S.-U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- BIOTECHMIND. (2015). *Gram positivo*. <https://biotechmind.wordpress.com/tag/gram-positivo/>
- Bush, L., & Pérez, M. (2019). *Listeriosis - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales*. <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-grampositivos/listeriosis>
- Canet, J. (2016). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I)*. <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Castañeda-Méndez, P., Hernández-Juarez, D., Muñoz-Lopez, M., & Soto-Ramírez, L. (2018). *Frecuencia de infecciones por S. aureus en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2018/md184i.pdf>
- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40. www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chaparro-Aguirre, E., Segura-Ramírez, P. J., Alves, F. L., Riske, K. A., Miranda, A., & Silva Júnior, P. I. (2019). Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel peptide present in the ecdysis process of centipede Scolopendra subspinipes subspinipes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50061-y>
- Chaparro, E., & da Silva, P. I. (2016). Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede Scolopendra viridicornis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(3), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.05.015>
- Choi, H., Hwang, J. S., & Lee, D. G. (2014). Identification of a novel antimicrobial peptide, scolopendin 1, derived from centipede Scolopendra subspinipes mutilans and its antifungal mechanism. *Insect Molecular Biology*, 23(6), 788–799. <https://doi.org/10.1111/imb.12124>
- Choi, J. H., Jang, A. Y., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park, K., Han, S. M., Yeo, J. H., & Seo, H. S. (2015). Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 6483–6490. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4275>
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion

- Pandinus imperator. *Biochemical Journal*, 359(1), 35–45. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590035>
- Cruz, L. E. (2014). *Determinación de la actividad antimicrobiana de proteínas del veneno de Scolopendra viridis Say en bacterias multirresistentes*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cupul, F. (2010). *El ciempiés: un bicho que se parece al borde de un petate viejo*. 8–11.
- Cupul, F. (2013). *La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México Mexican Diversity of Centipedes (Chilopoda)*. 20, 17–41.
- Cupul, F. (2014a). *Los ciempiés escolopendromorfos (Chilopoda : Scolopendromorpha) de México : clave para géneros*. 40(203), 286–291.
- Cupul, F. (2014b). Records of centipedes (Chilopoda) and millipedes (Diplopoda) species from Sinaloa, Mexico. *Actualidades Biológicas*, 36(100), 73–76. <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v36n100/v36n100a9.pdf>
- De la Calle, C. (2019). *Listeria monocytogenes: epidemiología, clínica y tratamiento*. *Pediatría Integral*, 8. <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2019-12/listeria-monocytogenes-epidemiologia-clinica-y-tratamiento/>
- Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90006-X)
- Esparza, M. J. (2008). *Guía-ABE. Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos antibióticos*. Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria. <https://guia-abe.es/generalidades-descripcion-general-de-los-principales-grupos-de-farmacos-antimicrobianos-antibioticos->
- Franco, D., Vazquez-Moreno, L., & Ramos-Clamont, G. (2005). *Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales (Vol. 47)*. [http://www.calostart.com/articulos/Inmunostart Actividad antimicrobiana de la lactoferrina mecanismos y aplicaciones clinicas potenciales.pdf](http://www.calostart.com/articulos/Inmunostart%20Actividad%20antimicrobiana%20de%20la%20lactoferrina%20mecanismos%20y%20aplicaciones%20clinicas%20potenciales.pdf)
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2017). Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon*, 130, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.020>
- Gelambi, M. (2019). *Pared celular bacteriana: características, biosíntesis, funciones - Lifeder*. <https://www.lifeder.com/pared-celular-bacteriana/>
- Giribet, G. (2015). Orden Scolopendromorpha. *Revista IDE@ - SEA*, 30, 1–9.
- Girón, W. I. (2008). *Antimicrobianos*. <http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMV015-2-2008-11.pdf>
- GlaxoSmithKline. (n.d.). *ANTIBIÓTICOS: Historia y resistencia bacteriana*. *GlaxoSmithKline*. www.salud.gsk.com
- González, L., Diego, E., Segovia, L., Carmen Gutiérrez, M. del, & Possani, L. D. (2009). Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say: Purification, gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2. *Toxicon*, 54(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.003>
- Granda, F. (2018). *Listeria monocytogenes: transmisión, formas y tratamientos efectivos*. *ELSEVIER*.

<https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/listeria-monocytogenes-listeriosis-transmission-tratamiento>

- Groo, A.-C., Matougui, N., Umerska, A., & Saulnier, P. (2018). Reverse micelle-lipid nanocapsules: a novel strategy for drug delivery of the plectasin derivate AP138 antimicrobial peptide. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 13*, 7565–7574. <https://doi.org/10.2147/IJN.S180040>
- Healy, J., & Bruce, B. (2019). Salmonellosis (no tifoidea). In *Libro amarillo*. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>
- Hernández, A., Yagüe, G., Vázquez, E. G., Simón, M., Parrado, L. M., Canteras, M., & Gómez, J. (2018). Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* (Carbapenems included): Predictive and prognostic factors. A prospective study (2016-2017). *Revista Española de Quimioterapia*, *31*(2), 123–130. [/pmc/articles/PMC6159385/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3159385/)
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1778, Issue 2, pp. 357–375). Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
- Hou, H., Yan, W., Du, K., Ye, Y., Cao, Q., & Ren, W. (2013). Construction and expression of an antimicrobial peptide scolopin 1 from the centipede venoms of *Scolopendra subspinipes mutilans* in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. *Protein Expression and Purification*, *92*(2), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.004>
- Khardori, N. (2006). Antibiotics—Past, Present, and Future. *Medical Clinics of North America*, *90*(6), 1049–1076. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.06.007>
- Kwon, Y., Lee, J. H., Kim, I., Kim, S., Yun, E., Nam, S., Ahn, M., Jeong, M., Kang, D., Lee, I. H., & Hwang, J. S. (2013). Antimicrobial activity of the synthetic peptide *Scolopendrasin II* from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *23*(10), 1381–1382.
- Lecaille, F., Lalmanach, G., & Andrault, P. M. (2016). Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases. *Biochimie*, *122*, 151–168. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.014>
- Lee, Hwang, & Lee. (2017). Scolopendin, an antimicrobial peptide from centipede, attenuates mitochondrial functions and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochemical Journal*, *474*(5), 635–645. <https://doi.org/10.1042/BCJ20161039>
- Lee, Kim, Kim, Ahn, Yun, & Hwang. (2017). Antimicrobial activity of the scolopendrasin V peptide identified from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(1), 43–48. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09057>
- Lewis, J. G. E. (1981). *The biology of centipedes* (C. U. Press (Ed.)).
- Liu, Z. C., Zhang, R., Zhao, F., Chen, Z. M., Liu, H. W., Wang, Y. J., Jiang, P., Zhang, Y., Wu, Y., Ding, J. P., Lee, W. H., & Zhang, Y. (2012). Venomic and transcriptomic analysis of centipede *scolopendra subspinipes dehaani*. *Journal of Proteome Research*, *11*(12), 6197–6212. <https://doi.org/10.1021/pr300881d>
- Lloria, M. (2009). *Manejo de las Infecciones por Organismos Multirresistentes*. <https://www.sati.org.ar/files/infectologia/2009-Infecciones-por-P-aeruginosa-en-UTI-Revision.pdf>

- Lopez, J., & Echeverri, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿The new “superbacteria”? Pathogenicity, epidemiology and resistance mechanisms. *SciELO*, 23(2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200007
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1977). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1977/A1977DM02300001.pdf>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2009). Principios de microbiología. In S. A. PEARSON EDUCACIÓN (Ed.), *Brock Biología de los microorganismos* (12° Edición, pp. 31, 86–92).
- Medscape. (2019). *Drogas, OTCs & Herbals | Referencia de Medscape*. <https://reference.medscape.com/drugs>
- Mensa, J., Soriano, A., Linares, P., Barberán, J., Montejo, M., & Salavert, M. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 26(1), 1–84. <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
- Mohamed, A. H., Abu-Sinna, G., El-Shabaka, H. A., & El-Aal, A. A. (1983). Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterizations of the venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 21(3), 371–377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6623485>
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh, M., Mirnejad, R., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>
- OMS. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Ginebra. <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2018a). *Resistencia a los antimicrobianos*. 15 Febrero. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- OMS. (2018b). *Salmonella (no tifoidea)*. OMS. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Park, Y. J., Lee, H. Y., Jung, Y. S., Park, J. S., Hwang, J. S., & Bae, Y. S. (2015). Antimicrobial peptide scolopendrasin VII, derived from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*, stimulates macrophage chemotaxis via formyl peptide receptor 1. *BMB Reports*, 48(8), 479–484. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.8.115>
- Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Yu, H. (2010). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*, 55(2–3), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.040>
- Rates, B., Bemquerer, M. P., Richardson, M., Borges, M. H., Morales, R. A. V., De Lima, M. E., & Pimenta, A. M. C. (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): Shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*, 49(6), 810–826. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.12.001>
- Rodríguez, C. (2014). *Identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de Scolopendra polymorpha*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Rodríguez, C. I. (2014). *Identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos provenientes*

del veneno de Scolopendra polymorpha. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- Rodriguez, G. (2005). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de México*, 44(5). <http://www.insp.mx/salud/index.html>
- Ruíz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS* [Universidad de Barcelona]. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ruppert, E. E., & Barnes, R. D. (2007). Tracheata and Myriapoda. In Mc Graw Hill Interamericana (Ed.), *Invertebrate zoology* (6° Edition, pp. 703–711).
- Santos, V. F., Costa, M. S., Campina, F. F., Rodrigues, R. R., Santos, A. L. E., Pereira, F. M., Batista, K. L. R., Silva, R. C., Pereira, R. O., Rocha, B. A. M., Coutinho, H. D. M., & Teixeira, C. S. (2019). The Galactose-Binding Lectin Isolated from *Vatairea macrocarpa* Seeds Enhances the Effect of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus*-Resistant Strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9526-z>
- Shelley. (2002). *A synopsis of the North American centipedes of the order Scolopendromorpha (Chilopoda)*.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 5, p. a000414). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L., & Barra, D. (1996). Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 788–792. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0788r.x>
- Simons, A., Alhanout, K., & Raphael, D. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Stankiewicz, M., Hamon, A., Benkhalifa, R., Kadziela, W., Hue, B., Lucas, S., Mebs, D., & Pelhate, M. (1999). Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor. *Toxicon*, 37(10), 1431–1445. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00089-6)
- Strahl, H., & Errington, J. (2017). Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annual Review of Microbiology*, 71, 519–538. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630>
- Téllez, G., & Castaño, J. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., & Mercado, M. (2005). PATHOGENESIS OF *Listeria monocytogenes*, MICROORGANISM ZOONOTIC EMERGENT. *SciELO*, 10(1). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682005000100003
- Turillazzi, S., Mastrobuoni, G., Dani, F. R., Moneti, G., Pieraccini, G., La Marca, G., Bartolucci, G., Perito, B., Lambardi, D., Cavallini, V., & Dapporto, L. (2006). Dominulin A and B: Two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(3), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.11.017>

- Undheim, E. A. B., Fry, B. G., & King, G. F. (2015). Centipede venom: Recent discoveries and current state of knowledge. *Toxins*, 7(3), 679–704. <https://doi.org/10.3390/toxins7030679>
- Undheim, E. A. B., & King, G. F. (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*, 57(4), 512–524. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.004>
- Valladares, L., & Gutiérrez, M. D. C. (2016). *Purification and isolation of peptides and protein with antimicrobial activity in the Scolopendra viridis venom.*
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., & Lai, R. (2008). Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE*, 3(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003217>
- Winstead, A., Hunter, J., & Griffin, P. (2019). Escherichia coli, Diarrheagenic. In *Libro amarillo*. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/escherichia-coli-diarrheagenic>
- Yacoub, T., Rima, M., Karam, M., Sabatier, J.-M., & Fajloun, Z. (2020). Antimicrobials from Venomous Animals : An overview. *Molecules*, 25, 1–19.
- Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2059–2066. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>
- Yang, H. L., Shen, Z. Q., Liu, X., & Kong, Y. (2016). Two novel antimicrobial peptides from skin venoms of spadefoot toad *Megophrys minor*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(4), 294–298. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30030-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30030-9)
- Zavala, J., Alarcón, L., Sánchez, J. T., & Romero, R. (1999). Insectos venenosos de importancia médica. *Revista Mexicana de Pediatría*, 66(6), 260–265. <http://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-1999/sp996h.pdf>
- Zelezetsky, I., Pag, U., Antcheva, N., Sahl, H. G., & Tossi, A. (2005). Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(2), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.006>

ANEXOS

Anexo 1. Investigación bibliográfica de PAMs extraídos de venenos.

Nombre PAM	Animal	Nombre científico	PM (KDa)	Carga	PI	Puentes disulfuro	Estructura secundaria	No. Aa	Secuencia de aa	Similitud
Licotoxina-I	Araña	<i>Lycosa carolinensis</i>	2.84	5+	10.6	0	Hélice alfa anfipática, estable	25	N IWLTKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-NH2 C	Magainina B (60%), adenoregulina
Licotoxina-II	Araña	<i>Lycosa carolinensis</i>	3.2	6+	10.22	0	Hélice alfa anfipática, hidrofóbico, estable	27	N KIKWFKTKMSIAFKIAEKQMKKHLGGE-OH C	Magainina B (45%), adenoregulina
Oh-defensina	Araña	<i>Ornithoctonus hainana</i>	5.43	4+	8.88	3	Estable	52	N MLCKLSMFGAVLGVACAI DCLPMGTGGSGCEGVGCRKLTFKILWDKFG C	esinas artrópodos (avispa, garrapata y
LyeTx I	Araña	<i>Lycosa eritraghata</i>	2.83	5+	10.6	0	Hélice alfa, alifático, estable	25	N IWLTKFLGKHLGKHLAKQQLSKL C	Licotoxina I (84%)
Androctonina	Escorpión	<i>Androctonus australis</i>	3.07	8+	10.2	2	lativamente hidrófila y no anfip	25	N RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY C	taquilesina I (65%), polifemulina I (60%)
Defensina	Escorpión	<i>Leiurus quinquestriatus</i>	4.32	7+	9.5	3	Inestable	38	N GFGCPLNQGACHRCRIRRRGGYCAFGFKQTCTCYRN C	Defensina de <i>Odonata</i>
Hadrurina	Escorpión	<i>Hadrurus aztecus</i>	4.43	5+	11.08	0	ntos alfa-helicoidales, anfipática	41	N GILDTIKSIASKVWNSKTVDLKRKGINWVANKLGVSPQAA C	4 (38%), brevinina 2e (39%), cecropin
Pandinin 1	Escorpión	<i>Pandinus imperator</i>	4.79	4+	10.28	0	or una región de la bobina de m	44	N GKVDWIKSAAKKIVSSEPVSLQKQVLAANKVYAEKIGATPT C	6 (63.1%), brevinina 2e (55.7%), gaegurin
Pandinin 2	Escorpión	<i>Pandinus imperator</i>	2.61	3+	10.52	0	lice alfa, hidrofóbo, alifática, est	24	N FWGALAKGALKLPSLFFSSFKKD C	de Rana rugosa, las pipininas de <i>Rana pipi</i>
Escorpina	Escorpión	<i>Pandinus imperator</i>	8.35	3+	8.58	3	Alifático, hidrofóbico, estable	75	N GWINNEEKIKKIDRMGNNTVLGGMAKAIHVHMKNFEQFCMANMDLGNCEKHCQTSGEYKCHGTCKCKGTPLSY C	Habrado de cecropina y defensina
Mucroporina	Escorpión	<i>Lychas mucronatus</i>	1.73/ 4.45	4+	10.14	0	Inestable	74 prec, 35 pro	N GRRKRQMEARFEPRNRRYKRELDLEKLFANMPDY C	BmkB1 y BmkB2 (50.6%)
Dominulin-A	Avispa	<i>Polistes dominulus</i>	1.85	2+	9.7	0	Alifático, estable	17	N INWKKIAEYVGGKLSL C	Mastopranos
Dominulin-B	Avispa	<i>Polistes dominulus</i>	1.9	2+	9.7	0	Alifático, estable	17	N INWKKIAEIGKQVLSAL C	Mastopranos
Mastoparano	Avispa	<i>Polybia paulista</i>	1.65	1+	8.5	0	Alifático, estable	14	N IDWKKLLDAAKQL C	Mastopranos
Melitin	Abeja	<i>Apis mellifera</i>	2.84	5+	12.02	0	s alfa en 30% de TFE, alifática, ir	26	N GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ C	
Ponericina-L1	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.59	5+	10.3	0	alfa-helicoidal anfipática en ent	24	N LLKELWTKMGAGKAVLKGKIGLL C	Dermaseptinas
Ponericina-L2	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.57	5+	10.3	0	entornos polares, como las me	24	N LLKELWTKMGAGKAVLKGKIGLL C	Dermaseptinas
Ponericina-G1	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3.21	7+	10.48	0	entornos polares, como las me	30	N GWKDWAKKAGWGLKKGPGMAKAAKAAAMQ C	Cecropinas
Ponericina-G2	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3.3	5+	10.13	0	entornos polares, como las me	30	N GWKDWLKKGEWLKAKGPGIVKAAALQAAATQ C	Cecropinas
Ponericina-G3	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3.38	6+	10.22	0	entornos polares, como las me	30	N GWKDWLKNKGEWLKKGPGIMKAAALQAAATQ C	Cecropinas
Ponericina-G4	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3.16	3+	9.7	0	entornos polares, como las me	29	N DFKDWMKTAGEWLKKGPGILKAAAMAAT C	Cecropinas
Ponericina-G5	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3.1	5+	10.3	0	entornos polares, como las me	30	N GLKDWVVIAGWGLKKGPGILKAAAMAATQ C	Cecropinas
Ponericina-G6	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	1.81	2+	9.7	0	entornos polares, como las me	18	N GLVDVKGKGGVLLKPLG C	Cecropinas
Ponericina-G7	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	1.87	2+	9.7	0	entornos polares, como las me	19	N GLVDVKGKGGVLLKPLG C	Cecropinas
Ponericina-W1	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.71	6+	10.7	0	entornos polares, como las me	25	N WLSGALKGAKLPSVVLGFKKKQ C	Gaegurinas y melitina
Ponericina-W2	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.71	6+	10.7	0	entornos polares, como las me	25	N WLSGALKGAKLPSVVLGFKKKQ C	Gaegurinas y melitina
Ponericina-W3	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.86	7+	11.43	0	entornos polares, como las me	26	N GIWGLAKIGIAVPRVIMLKKKQ C	Gaegurinas y melitina
Ponericina-W4	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.85	5+	10.6	0	entornos polares, como las me	26	N GIWGLAKIGIAVPRVIMLKKKQ C	Gaegurinas y melitina
Ponericina-W5	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.6	5+	10.6	0	entornos polares, como las me	24	N FWGALIKGAALKPSVVLGFKKKQ C	Gaegurinas y melitina
Ponericina-W6	Hormiga	<i>Pachycondyla goeldii</i>	2.03	2+	10	0	entornos polares, como las me	20	N FIGTALGIAVAIVLFLK C	Gaegurinas y melitina
Pilosulina-1	Hormiga	<i>Myrmecia pilosula</i>	6.05	7+	10.45	0	élice, anfipática e hidrofóbico, e	56 (112prec)	N GLGSVFGRLARILGRVIPKVAKLLGPKVAKLKVPMKEAIPMAVEMAKSQEEQQPQ-OH C	Sin similitud
Bicarinalina	Hormiga	<i>Tetramorium bicarinatum</i>	2.21	5+	10.18	0	Helicoidal α , parcialmente anfip	20 (79prec)	N KIKPVGKVKDFLVGGMKAV-NH2 C	Sin similitud
Crotamina	Serpiente	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	4.82	8+	9.54	3	Anfipático, inestable	42 (65prec)	N GNAGQCHKGGGCFPEKICLPPSDFGKMDCRWRWCKCKG C	HBD-2, β -defensivos
L-AAO (L- aminoácido ox	Serpiente	<i>Bothrops marajoensis</i>	4.4	5-	4.44	0	Inestable	39	N AHGNDPLEECFREDDEEFLEIAKNGLTATSNPKRVVIV C	MOJ, LAO, CROAD, LAO, BONEW, LA
Cateclidina BF	Serpiente	<i>Bungarus fasciatus</i>	3.63	11+	11.79	0	Alfa-helicoidal anfipática, esta	30 (191 prec.)	N KFRRLKSKVKKRAKFFKPRVIGVSIPI C	Cateclidina de ornitorrinco 47%
Omwaprin	Serpiente	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	5.61	4+	8.69	4	Bobina aleatoria (48%), hélice α	50	N KDRPKPKGLCPPRPQKCVKCEKNDSDCPGQKCCNYGCKDECRDPIVFG C	o de serpiente y otras proteínas del dom
Crotalicidina	Serpiente	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	4.15	15+	12.09	0	anfipática, índice hidrofóbico 0.7	34 (194 prec)	N KRPFKFKKVKKSKRKLKIFKPKMIVGVTIP C	Lachesidina, batroxidina y lutzidina
Ascafina-1	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.36	3+	10.29	0	Alfa hélice, anfipática, estable	23	N GFRDLKGAAGAFVKTVAIGHIAN-NH2 C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-2	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.53	3+	10.29	0	Alfa hélice, anfipática, inestable	24	N GFRDLKGAAGAFVKTVAIGHIAN C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-3	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.48	3+	10.29	0	Alfa hélice, anfipática, estable	24	N GFRDLKGAAGAFVKTVAIGHIAN C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-4	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.58	4+	10.18	0	Alfa hélice, anfipática, estable	24	N GFKDWIKGAALKIKTVAAIANQ C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-5	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.58	4+	10.18	0	Alfa hélice, anfipática, estable	24	N GIKDWIKGAALKIKTVASHIANQ C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-6	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.57	3+	9.83	0	Alfa hélice, anfipática, estable	24	N GFKDWIKGAALKIKTVASHIANQ C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-7	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.57	4+	10.18	0	Alfa hélice, anfipática, estable	24	N GFKDWIKGAALKIKTVASHIANQ C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Ascafina-8	Rana	<i>Ascaphus truei</i>	2.01	3+	10	0	Alfa hélice, anfipática, estable	19	N GFKDLKGAALKIKTVL-NH2 C	tud limitada con pandinina 1 y opistopo
Syphaxin	Rana	<i>Leptodactylus syphax</i>	2.54	2+	9.53	0	Alifática, estable	25	N GLVDILKGAADLAGHVATKVINIKI-CONH2 C	cellatina-3 57%,pentadactilina 56%, oca
LFB (Limnonectes fujian	Rana	<i>Limnonectes fujianensis</i>	3.27	4+	9.6	1	Hélice α , lámina β y bobina alea	33	N GLFSVGVKLVGKGVGNVSGSLDLQLKCKISGG C	Brevinins
Temporina-A	Rana	<i>Rana temporaria</i>	1.39	1+	9.75	0	Helicoidal α , alifático, estable	13	N FLPLIGRVLGSL-CONH2 C	Melitina
Temporina-B	Rana	<i>Rana temporaria</i>	1.39	1+	8.75	0	Helicoidal α , alifático, estable	13	N LPLVIGNLLKSL-CONH2 C	Melitina
Magainina 2	Rana	<i>Xenopus laevis</i>	2.46	3+	10	0	α -hélice anfipático en ambiente	23	N GIGKFLHSAKFGKAFVGEIMNS-NH2 C	Cecropinas, bombolitinas,
Maximina-1	Sapo	<i>Bombina maxima</i>	2.67	3+	9.83	0	Una hélice α en las bobinas me	27 (144prec)	N GIGTKLGGVTKALKGALKELASTYAN-NH2 C	Bombinina (BLP)
Maximina-2	Sapo	<i>Bombina maxima</i>	2.7	3+	9.83	0	Una hélice α en las bobinas me	27 (144prec)	N GIGTKLGGVTKALKGALKELASTYAN-NH2 C	Bombinina (BLP)
Maximina-3	Sapo	<i>Bombina maxima</i>	2.69	3+	9.83	0	Una hélice α en las bobinas me	27 (144prec)	N GIGTKLGGVTKALKGALKELASTYAN-NH2 C	Bombinina (BLP)
Maximina-4	Sapo	<i>Bombina maxima</i>	2.61	3+	9.83	0	Una hélice α en las bobinas me	27 (144prec)	N GIGTKLGGVTKALKGALKELASTYAN-NH2 C	Bombinina (BLP)
Maximina-5	Sapo	<i>Bombina maxima</i>	2.84	3+	9.82	0	Una hélice α en las bobinas me	27 (145prec)	N SIGAKLGGVTKFFKALKELASTYAN-NH2 C	Bombinina (BLP)
Buforin II	Sapo	<i>Bufo bufo gargarizans</i>	2.43	6+	12.6	0	Inestable	21	N TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK C	Buforina I es fuertemente homóloga a
Megin 1	Sapo	<i>Megophrys minor</i>	2.22	4+	9.6	1	Estable	18	N FLKGCWTKWYSLKPCPF-NH2 C	amilia de péptidos tirosina Arginina o rar
Megin 2	Sapo	<i>Megophrys minor</i>	3.22	4+	9.6	1	Alifático, estable	27	N FVLKFLKLLWAGVGLLEHACKFKFNWC C	a familia de péptidos esculentin-2 o amc
Scolopin I	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	2.59	5+	10.55	0	Inestable	21	N FLPMKSTLRVPRRGTQDYH C	Sin similitud
Scolopin II	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	3.01	8+	11.76	0	Estable	25	N GILKFLMHLRGTQVYKMRSLKRSR C	Sin similitud
Scolopendin I	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	5.27	2+	9.1	0	Estable	48	N MDSFQKIEKIGETGVVYKAKDKVSGRLVALKIRILENESEGVPSA-NH2 C	Cecropina A (37%), palustrin-3 (48%)
Scolopendrasin I	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>				0	Helicoidal α			
Scolopendrasin II	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	2.47	5+	10.3	0	Helicoidal α , alifático, estable	21	N KYALMKKIAELINLRSRQVK-NH2 C	o de reconocimiento de señal de protein
Scolopendrasin V	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	1.73	3+	9.43	0	Helicoidal α , hidrofóbico, estable	14	N YGGGKYKHWGCR-NH2 C	
Scolopendrasin VII	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	2.27	4+	9.7	1	Helicoidal α , inestable	20	N FCTCNVKGFNKRNKRIIYIP-NH2 C	
Scolopendrasin IX	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	1.77	5+	10.03	0	Hidrofóbico, estable	15	N MCKYFKIVSKSAKK-CONH2 C	
Scolopendrasin X	Ciempies	<i>S. subsinipes mutilans</i>	2.09	6+	9.82	1 + 1 cis	Estable	18	N MKKFKLKKICKGLCAKL-CONH2 C	
Pinipetin	Ciempies	<i>S. subsinipes subsinipes</i>	1.21	0	5.97	0	Estructura desordenada, estable	11	N VAEARQGSFSY C	Sin similitud
Lacraín	Ciempies	<i>Scolopendra viridicornis</i>	0.92	1+	8.59	0	Hidrofílico, estable	8	N RYPAVGYT C	Sin similitud

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Nombre PAM	Actividad	CMI (µg/ml)						% Hemólisis	Mecanismo de acción	No. Acceso	Referencia
		<i>S. aureus</i>	<i>MSRA</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>				
Licetoxina-I	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	150 µM (227.44µg/ml)	NH	NH	40 µM (113.72µg/ml)	A 200 µM hay 55%	Forma poros para aumentar la permeabilidad de la membrana y efectuar	P61507_1	Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimic...
Licetoxina-II	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	DH5 40 µM (128.16µg/ml)	NH	NH	40 µM (128.16µg/ml)	NH	Forma poros para aumentar la permeabilidad de la membrana y efectuar	P61508_1	Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimic...
Oh-defensina	Antibacteriano, antimicótico	1.25	NH	1.25	NH	NH	5	7%		Sin acceso	Zhao, H., Kong, Y., Wang, H., Yan, T., Feng, F., Bian, J., Santos, D. M., Verly, R. M., Pilió-Veloso, D., de Mar...
LyeTx I	Antibacteriano	3.79µM (10.73µg/ml)	NH	7.8µM (22.08µg/ml)	NH	NH	NH	tica a dosis mayores a la DE50 (0.00C	La afinidad de LyeTx I por las bicapas de membrana (POPC)no se vio afect	6CL3_A	Santos, D. M., Verly, R. M., Pilió-Veloso, D., de Mar...
Androctonina	Antibacteriano, antimicótico	M- 30µM (46.14-92.28µg/ml)	NH	31.3µM- 6µM (9.2-18.4µg/ml)	ND	NH	NH	mólisis hasta una [I] = 150 µM (461.4µg/ml)	Se une solo a las vesículas lipídicas cargadas negativamente e induce la fu	P56684_1	Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum...
Defensina	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH		P41965_1	Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J.
Hadrurina	Antibacteriano	NH	NH	<10µM (44.35µg/ml)	40µM (177.41µg/ml)	NH	NH	80% a 20 µM (88.70µg/ml)	Desestabilización de la membrana. Puede lisar preferentemente fosfol	P82656_1	Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J.
Pandinin 1	Antibacteriano	2.6µM (12.47µg/ml)	NH	20.8µM (99.81µg/ml)	NH	>20.8µM (>99.81µg/ml)	>20.8µM (>99.81µg/ml)	-1.1%, (11.1µM) 53.26µg/ml->0.9%	Interrupción de la membrana y lisis celular	P83239_1	Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J.
Pandinin 2	Antibacteriano, antimicótico	2.4µM (6.26µg/ml)	NH	19.2µM (50.15µg/ml)	NH	38.2µM (99.77µg/ml)	19.2µM (50.15µg/ml)	51.4%, (11.1µM) 53.26µg/ml->17.5%	Causa hemólisis de eritrocitos de oveja en menos de 60 min,demostrando	P83240_1	Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J.
Escorpina	Antibacteriano, antipalúdico	NH	NH	NH	10µM (83.5µg/ml)	NH	NH	NH		P56972_1	Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Pos...
Mucroporina	Antibacteriano	25	NH	>100	NH	>100	NH	NH	Destrucción rápida al alterar la membrana celular de las bacterias.	ACF93401_1	Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Zhao, R., Wang, Q., Wu, Y.
Dominulin-A	Antibacteriano	NH	NH	8	NH	NH	NH	NH		POC1M6_1	Tunillazzi, S., Mastrobuoni, G., Dani, F. R., Moneti, G.
Dominulin-B	Antibacteriano	NH	NH	8	NH	NH	NH	NH		POC1M7_1	Tunillazzi, S., Mastrobuoni, G., Dani, F. R., Moneti, G.
Mastoparano	Antibacteriano, antiparasitario	15	NH	8	NH	8	NH	NH	Sin acción hemolítica	POC1Q4_1	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16129513/
Melitin	Antibacteriano, antiparasitario, antiviral	8.3	3.12	NH	NH	NH	NH	NH	≥1µg/ml hay hemólisis	AF40556_1	Choi, J. H., Jang, A. Y., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park...
Ponericina-L1	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82421_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-L2	Antibacteriano	- 4µM (5.14 -10.28µg/ml)	NH	4µM (5.14 -10.28µg/ml)	2 - 4µM (5.14 -10.28µg/ml)	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82422_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G1	Antibacteriano, antimicótico	32µM (51.36- 102.72µg/ml)	NH	4µM (6.42- 12.84µg/ml)	2-4µM (6.42- 12.84µg/ml)	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82414_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G2	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82415_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G3	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82416_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G4	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82417_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G5	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82418_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G6	Antibacteriano, antimicótico	ND	NH	6µM (14.48 - 28.96µg/6 - 32µM (28.96 - 57.92µg/ml)	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82419_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-G7	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Sin acción hemolítica	P82420_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W1	Antibacteriano, antimicótico	- 4µM (5.42 - 10.84 µg/ml)	NH	µM (10.84 - 21.68µg/ 4- 8µM (10.84- 21.68µg/ml)	NH	NH	NH	100%	La adopción de una estructura anfipática a-helicoidal en un entorno polar	P82423_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W2	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Con acción hemolítica	P82424_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W3	Antibacteriano, antimicótico, antiparasitario	2-4µM (5.42 - 10.84µg/ml)	NH	8µM (10.84- 21.68µg/8-16µM (21.68- 43.36µg/ml)	NH	NH	NH	NH	Con acción hemolítica	P82425_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W4	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Con acción hemolítica	P82426_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W5	Antibacteriano, antimicótico	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	100%	P82427_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Ponericina-W6	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	100%	P82428_1	Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol...
Pilosulina-1	Antibacteriano, antimicótico	4µM (24.20µg/ml)	3µM (18.15µg/ml)	2µM (12.10µg/ml)	2µM (12.10µg/ml)	8µM (48.41µg/ml)	>4µM (24.20µg/ml)	52µg/ml->20%, 100µM (605.2µg/ml)	Rápida cinética de permeabilización tanto con el exterior como con el	W07932_1	Zelezetsky, I., Pag, U., Antcheva, N., Sahl, H. G., & Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Lepince...
Bicarinalina	Antibacteriano, antimicótico, antiparasitario	6.3	NH	NH	NH	NH	NH	A 100 µM (180 µg/ml) hay 10%	Permeabilización de la membrana, disrupción local.	QG8NV3_1	Batista da Cunha, D., Pupo Silvestrini, A. V., Gomes...
Crotamina	Antibacteriano	8.0-16.0	4.0-8.0	2	NH	Resistente	NH	NH	Induce la muerte bacteriana por peroxidación lipídica y oxidación de prot	PAF34911_1	Costa Torres, A. F., Dantas, R. T., Toyama, M. H., D...
L-AAO (L- aminoácido ox)	Antibacteriano, antimicótico, antiparasitario	50	NH	NH	NH	ND (>200 mg/ml)	ND (>200 mg/ml)	NH	Su acción de la LAAO se ve afectada por la catalasa	AO0430_1	Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., & Falcao, C. B., de La Torre, B. G., Pérez-Peinado, C., Zeleze...
Catelicidina BF	Antibacteriano	4.7	>100	2.3	4.7	1.2	4.7	Sin hemólisis hasta 400µg/ml	Especial para Gram negativas	AC12652_1	Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., & Falcao, C. B., de La Torre, B. G., Pérez-Peinado, C., Zeleze...
Omwaprin	Antibacteriano	SA	NH	32	NH	NH	NH	NH	Sin hemólisis hasta 1mM	P83952_1	Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., & Falcao, C. B., de La Torre, B. G., Pérez-Peinado, C., Zeleze...
Crotalacidina	Antiparasitario	52	NH	0.25	NH	1	NH	A 25 y 12.5 µM hay 10%	Interrupción de la membrana, especial para Gram positivas. Gram negati	USKIM4_1	Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., & Falcao, C. B., de La Torre, B. G., Pérez-Peinado, C., Zeleze...
Ascafina-1	Antibacteriano	>50µM (118.4µg/ml)	NH	6µM (14.20µg/ml)	6µM (14.20µg/ml)	25µM (59.2µg/ml)	>100µM (>236.8µg/ml)	>200µM (>473.6µg/ml) para el 50%	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC125_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-2	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC126_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-3	Antibacteriano	>50µM (>124.1µg/ml)	NH	6µM (14.84µg/ml)	NH	NH	NH	>200µM (>496.4µg/ml) para el 50%	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC127_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-4	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC128_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-5	Antibacteriano	50µM (129.45µg/ml)	NH	6µM (15.53µg/ml)	13µM (33.65µg/ml)	13µM (33.65µg/ml)	100µM (258.9µg/ml)	>200µM (>517.8µg/ml) para el 50%	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC129_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-6	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC130_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-7	Antibacteriano	25µM (64.32µg/ml)	NH	3µM (7.71µg/ml)	NH	NH	NH	>200µM (>514.6µg/ml) para el 50%	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC131_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Ascafina-8	Antibacteriano	6µM (12.10µg/ml)	NH	6µM (12.10µg/ml)	6µM (12.10µg/ml)	13µM (26.22µg/ml)	25µM (50.42µg/ml)	50µM (100.85µg/ml) para el 50%	Es probable que la producción de lisis de células bacterianas sea la	POC132_1	Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, Conlon, J. M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith...
Syphaxin	Antibacteriano	14.6µM (37.12µg/ml)	NH	3.6µM (9.15µg/ml)	NH	NH	NH	NH		P85279_1	Dourado, F. S., Leite, J. R., Silva, L. P., Melo, J. A. B., Li, B., Lyu, P., Xie, S., Qin, H., Pu, W., Hu, Chen, T., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Gesell, J., Zasioff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-di...
LFB (Limonectes fujiar	Antibacteriano, antimicótico, anticancerígeno	≥ 16.0	NH	≥ 32.0	NH	NH	≥ 64.0	= 16µg/ml. IC 50 fueron 3,47 µM, 18,99 µM, 2,32 µM y 2,02 µM.		Sin acceso	Li, B., Lyu, P., Xie, S., Qin, H., Pu, W., Hu, Chen, T., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Gesell, J., Zasioff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-di...
Temporina-A	Antibacteriano	2.3µM (3.19µg/ml)	NH	11.9µM (16.54µg/ml)	9.6µM (13.34µg/ml)	>360µM (500.4µg/ml)	3.4µM (4.72µg/ml)	Hemólisis >120µM (>166.8µg/ml)	Especial para Gram positivas, permiten la fuga de moléculas de gran tama	P56917_2	Li, B., Lyu, P., Xie, S., Qin, H., Pu, W., Hu, Chen, T., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Gesell, J., Zasioff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-di...
Temporina-B	Antibacteriano	6.0µM (8.34µg/ml)	NH	21.0µM (29.19µg/ml)	10.0µM (13.9µg/ml)	>360µM (500.4µg/ml)	4.0µM (5.56µg/ml)	Hemólisis >120µM (>166.8µg/ml)	Especial para Gram positivas, permiten la fuga de moléculas de gran tama	GL1_A	Li, B., Lyu, P., Xie, S., Qin, H., Pu, W., Hu, Chen, T., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Gesell, J., Zasioff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-di...
Magainina 2	Antimicrobiana	20.8µM (51.16µg/ml)	NH	41.5µM (>102.09µg/ml)	NH	>41.5µM (>102.09µg/ml)	>41.5µM (>102.09µg/ml)	2.2%, (11.1µM) 27.30µg/ml->1.8%.	Permeabiliza selectivamente las membranas bacterianas, rompiendo su	2MAG_A	Li, B., Lyu, P., Xie, S., Qin, H., Pu, W., Hu, Chen, T., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R. S., Gesell, J., Zasioff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-di...
Maximina-1	Antibacteriano, antimicótico	19.5	NH	19.5	9	NH	3	Baja actividad hemolítica	Adherencia las bacterias, ya sea por medio de una alfombra o mecanis	P83080_1	Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Le...
Maximina-2	Antibacteriano, antimicótico	19.5	NH	19.5	9	NH	3	Baja actividad hemolítica	Adherencia las bacterias, ya sea por medio de una alfombra o mecanis	P83081_1	Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Le...
Maximina-3	Antibacteriano, antimicótico	3.1	NH	0.9	3.1	NH	15	Baja actividad hemolítica	Adherencia las bacterias, ya sea por medio de una alfombra o mecanis	P83082_1	Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Le...
Maximina-4	Antibacteriano, antimicótico	2.7	NH	2.7	15	NH	15	Baja actividad hemolítica	Adherencia las bacterias, ya sea por medio de una alfombra o mecanis	P83083_1	Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Le...
Maximina-5	Antibacteriano, antimicótico	3.6	NH	ND	3.6	NH	1.2	Baja actividad hemolítica	Adherencia las bacterias, ya sea por medio de una alfombra o mecanis	P83084_1	Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Le...
Buforin II	Antimicrobiana	4	NH	4	NH	NH	1	NH	Cruza la bicapa lipídica y se une a ADN y ARN, inhibiendo las funciones	AAB36002_1	Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). A novel...
Megin 1	Antibacteriano, antimicótico	6.25	NH	25	NH	50	50	Eritrocitos humanos: 2.3%, 5.6%,		Sin acceso	Yang, H. L., Shen, Z. Q., Liu, X., & Kong, Y. (2016). Tw...
Megin 2	Antibacteriano, antimicótico	12.5	NH	6.25	NH	12.5	12.5	A [] de 25, 50, 100 y 200 µg/ml.		Sin acceso	Yang, H. L., Shen, Z. Q., Liu, X., & Kong, Y. (2016). Tw...
Scopolin I	Antibacteriano	1.2	5	12.5	NH	NH	15	A 50 µg/ml hay 25%	Los experimentos de SEM indicaron que la escopolina 1 progresivamente	POCH49	Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Choi, H., Hwang, J. S., & Lee, D. G. (2014). Identific...
Scopolin II	Antibacteriano	0.5	1	5	NH	NH	7.5	A 50 µg/ml hay 32%		POCH49	Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Choi, H., Hwang, J. S., & Lee, D. G. (2014). Identific...
Scopolendin I	Antibacteriano	5µM (26.35µg/ml)	NH	5µM (26.35µg/ml)	NH	5µM (26.35µg/ml)	10µM (52.71µg/ml)	Sin hemólisis	Acumulación de ROS inducida en Candida albicans	Sin acceso	Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Yun, E. Y.
Scopolendrasin I	Antibacteriano, anticancerígeno	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	No hay hemólisis hasta 320µg/ml	Sin acceso	Kwon, Y. N., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, S. H., Yun, E. Y.
Scopolendrasin II	Antibacteriano, antimicótico, anticancerígeno	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	No hay hemólisis hasta 100µg/ml	Sin acceso	Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Yun, E. Y.
Scopolendrasin V	Antibacteriano, antimicótico, anticancerígeno	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Unión a la superficie de los microorganismos a través de una interacción	Sin acceso	Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Yun, E. Y.
Scopolendrasin VII	Antibacteriano, anticancerígeno	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH		Sin acceso	Park, Y. J., Lee, H. Y., Jung, Y. S., Park, J. S., Hwang, J.
Scopolendrasin IX	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH		Sin acceso	Park, Y. J., Park, B., Lee, M., Jeong, Y. S., Lee, H. Y.
Scopolendrasin X	Antibacteriano	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH		Sin acceso	Park, Y. J., Kim, H. S., Lee, H. Y., Hwang, J. S., & Ba...
Pinipessin	Antibacteriano	7.58	NH	15.16	NH	15.16	30.33	Hay bajo % de hemólisis hasta 30.33	Podría actuar intracelularmente al interferir con la síntesis de proteínas, p	Sin acceso	Chaparro-Aguirre, E., Segura-Ramirez, P. J., Alves, Chaparro, E., & da Silva, P. I., Junior (2016). Lacra...
Lacrain											

Anexo 2. Curva estándar de BSA, para el método de Lowry.

Tubos	Volumen de H2O	Volumen de BSA a 3mg/ml
Blanco	1000 µl	0 µl
1 µg	999.66 µl	0.33 µl
3 µg	999.00 µl	1.00 µl
7.5 µg	997.50 µl	2.50 µl
15 µg	995.00 µl	5.00 µl

Anexo 3. Soluciones utilizadas en el método de Lowry.

Soluciones
Na ₂ CO ₃ 2%
NaOH 0.1M
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O 1%
CuSO ₄ 1%
Folin puro
BSA 3mg/ml

***Preparación de solución 1:** Pesar juntos 2g de Na₂CO₃ y 0.4g de NaOH, se aforan a 100ml con agua miliQ.

***Preparación de KNaC₄H₄O₆·4H₂O 1%:** Pesar 0.1g de KNaC₄H₄O₆·4H₂O en 10ml de agua miliQ.

***Preparación de CuSO₄ 1%:** Pesar 0.1g de CuSO₄ en 10ml de agua miliQ.

Anexo 4. Componentes y proporciones del gel concentrador y separador de poliacrilamida al 12% con SDS.

Gel de electroforesis			
Gel concentrador 4%		Gel separador 12%	
Agua	850µL	Agua	1.36mL
Acrilamida	208µL	Acrilamida	1.6mL
Tris base 0.5M pH 6.8	156µL	Tris base 1.5M pH 8.8	1.04mL
SDS 10%	12.5µL	SDS 10%	56µL
APS 10%	12.5µL	APS 10%	56µL
TEMED	8µL	TEMED	8µL

Anexo 5. Componentes del buffer de corrida pH 8.6.

Buffer de corrida pH 8.6
Tris 0.025M
Glicina 0.1914M
SDS 0.1%

Anexo 6. Componentes para 100ml de solución desteñidora.

Solución desteñidora Para 100ml
Ácido acético 10%
Metanol 30%
Agua 60%

Anexo 7. Buffer de electroelución TRIS- HCl 50mM pH 6.8.

Pesar 12.114g de TRIS para 2L de solución, ajustando el pH a 6.8 con HCl concentrado.

Anexo 8. Cálculos para obtener el peso molecular del perfil proteico del veneno total.

Tabla 10. Curva de calibración de los marcadores de peso molecular.

Marcador PM (kDa)	Banda de marcador (cm)	Banda marcador/Dist. recorrida	Log marcador PM
199	0.2	0.0384	2.2988
114	0.6	0.1153	2.0569
81	1.1	0.2115	1.9084
46	2.0	0.3846	1.6627
33	2.65	0.5096	1.5185
27	3.1	0.5961	1.4313
17	3.6	0.6923	1.2304
6	4.0	0.7692	0.7781
corrió	5.2		

Gráfica 1. Curva de calibración de los marcadores de peso molecular.

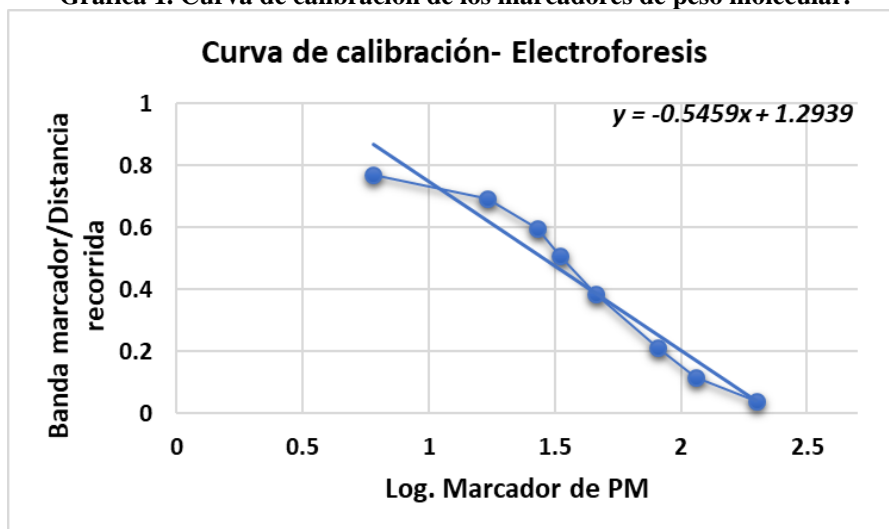


Tabla 11. Cálculo de pesos moleculares de las proteínas.

Bandas proteínas (cm)	Distancia proteína/distancia recorrida	PM proteínas (kDa)
0.1	0.0192	216.41
0.2	0.0384	199.57
0.4	0.0769	169.65
0.6	0.1153	144.28
0.9	0.1730	113.10
1.0	0.1923	104.26
1.2	0.2307	88.67
1.8	0.3461	54.49
2.1	0.4038	42.72
2.2	0.4230	39.39
2.9	0.5576	22.32
3.4	0.6538	14.87
3.6	0.6923	12.64
3.9	0.7500	9.91
4.1	0.7884	8.43
4.5	0.8653	5.99

Ecuación

$$X = \frac{\left(\frac{\text{Banda proteína}}{\text{Dist. recorrida}}\right) - 1.2938}{-0.5458}$$

Antilog X=PM muestra



Cuernavaca, Morelos, a 11 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María Del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC UAEM)

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (ICF UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Perla Abundes Recilla**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2020-11-18 12:15:55 | Firmante
pKbuOY63pZAA8JHjMDkQIFy+MX/Oa2D0f3xgxtQkW7jsZTnlqvtfmEIBMhZhx9+J+3kmWFw4rj6FWXSN5T4qlyfMDGdg5X2nEkgag+hg6p0d41hhZ9rp8xpZ8Tmn5o5qJtdr80xviW
eM77LEgZSP4fZ07Yr6NRdiPT/55Drqo3t2lu5mD2+NTmgGHa27gDOmWYw+5KAoe5sTm021n5/PsLLd7QwEjAP7YutPIa74b02O5gL0VoLZR+PhfCoQmqWrc5vpGFBwNZKAh
9XwiQ7aqcsX1H8BR3daf6TmA8hTZmPgKT3DbCF2u1nz2eiMvsAD7zBk51Buvf68KCXjOFpeQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[g3c4ql](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kYwq4CcEwJvtJGBCVJKL8uAvsyfogVRV>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 11 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María Del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC UAEM)

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (ICF UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Perla Abundes Recilla**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 11 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María Del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC UAEM)

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (ICF UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Perla Abundes Recilla**

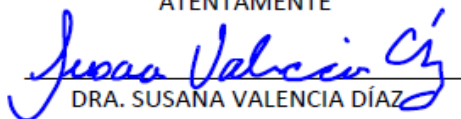
Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE


DRA. SUSANA VALENCIA DÍAZ



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos, a 11 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María Del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC UAEM)

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (ICF UNAM)

Tesis: "Evaluación de la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico"

Alumno que lo presenta a revisión: **Perla Abundes Recilla**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE



DRA. MARÍA EUGENIA NÚÑEZ VALDEZ



Cuernavaca, Morelos, a 11 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María Del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC UAEM)

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay (ICF UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la actividad antimicrobiana de la proteína de 40kDa del veneno de *Scolopendra viridis* Say en cepas bacterianas Gram negativas de interés clínico"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Perla Abundes Recilla**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY