

Evaluación de las propiedades antibacterianas del veneno de una población de *Lachesis
acrochorda* Garcia,1986 (Serpentes:Viperidae) del Carmen del Chucurí, Santander.

David Arturo Sepúlveda González

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Hermisul de Jesús Cano Calle

Doctorado en Química

Codirector

Juan David Bayona Serrano

Doctorado en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Muy pocas personas vieron lo que este trabajo realmente hizo conmigo, y menos aún se quedaron a pesar de eso; a todas ellas, infinitas gracias. Y los que no lo hicieron, les deseo lo mejor.

Agradecimientos

En un primer lugar quiero agradecer a mi familia. Especialmente a mi papá y mamá por apoyarme a su manera; la crianza que me dieron hizo todo lo que soy y poder estar escribiendo estas palabras es gracias a eso. Siempre los voy a llevar en mi corazón. También quiero agradecer a mis nonos por enseñarme a ver el mundo a su manera, fueron unos segundos padres mucho tiempo para mí y me alegra poder entregarles este título como un pequeño paso más.

A mis amigos del colegio, muchos dicen que realmente nunca superamos esa época y aunque la mayoría de mis recuerdos no son los mejores, el hecho de que me hallan acompañado en este trayecto hace que los aprecie mucho. Especialmente quiero agradecerle a Casta, Laura y JD por ayudarme a encontrar un lugar en el mundo. También quiero mencionar especialmente a Lucas y Pato, me enseñaron que la vida está en tonos de gris a pesar de todo.

A mis compañeros de la universidad, quiero agradecerles por mostrarme tantos puntos de vista diferentes a través de las clases, laboratorios y salidas de campo. A Jesús por ser mi compañero de laboratorio fiel; a Julieth por ser la cínica que le ponía orden a los demás; a Camilo y Daniel por mostrarme como se ve la fidelidad y compañía en medio de todo; a Erika por ser un desahogo muchas veces; por último, a Cristina por enseñarme cosas que desconocía de mí mismo y sobre todo a avanzar cuando sentía que estaba en el fondo. Villareal, Ariadna, Víctor, Gustavo y Carina son la definición de ser excéntricos, para algo me servirá en la vida.

Quiero agradecer especialmente a la casualidad más grande del destino que fue Geraldine, que entre tantas noches y madrugadas pude encontrar un refugio para avanzar un día más entre las enredaderas de su campeón.

A Bayona y Jennifer les debo total admiración y agradecimiento por todo el apoyo y compañía, especialmente en semana santa. Gracias por permitir mi descaro en una pasantía de pregrado que probablemente nadie lea; pero que para mí significa tanto.

Estoy inmensamente feliz de haber recibido la ayuda del profesor Jorge Hernández que nos ayudo a encaminar este proyecto y también la del Profesor Francisco, su profundización me permitió acercarme a este tema, además de enseñarme que la biología es más que animales y plantas en un cerro que quieren volver un hotel. Para el profesor Herminsul no tengo palabras, desde explicarme, llevarme y preocuparse por mí al ver que soy una mata de ansiedad; le agradezco profundamente y espero poderle retribuir algún día.

También quiero hacer una mención al grupo GEARS, aunque la ecología no es la mi mayor fuente de interés fue en una reunión que aprendí de venómica, y gracias a ellos esta pasantía se pudo plantear.

Por último, quiero agradecer a mi nena hermosa, la niña de mis ojos que me ayudó desde que entre a la universidad a seguir adelante, a ser fiel, a avanzar a pesar de todo y siempre tratar de encontrar un lugar. Gracias Ana, por todo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	9
1. Objetivos.....	13
1.1. General.....	13
1.2. Específicos.....	13
2. Competencias.....	14
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Obtención del veneno.....	14
3.2. Cepas bacterianas.....	15
3.3. Screening bacteriano.....	15
3.3.1. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida.....	16
3.3.1.1. MIC.....	16
3.3.1.2. MBC.....	17
3.4. Descripción composicional del veneno.....	17
3.4.1. RP-HPLC.....	17
3.4.2. MALDI-TOF.....	18
3.4.3. SDS-PAGE.....	18
3.4.4. SDS-PAGE bidimensional.....	19
3.5. Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura con la actividad encontrada en <i>L. acrochorda</i>	20
4. Resultados.....	22

4.1. Screening bacteriano.....	22
4.1.2. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida.....	25
4.2. Descripción composicional del veneno.....	25
4.2.1. Perfiles electroforéticos.....	27
4.3. Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura.....	29
4.3.1. Veneno completo.....	30
4.3.2. Fosfolipasas A ₂	40
4.3.3. Metaloproteinasas.....	47
4.3.4. L- aminoácido oxidasas.....	48
4.3.5. Péptidos antimicrobianos.....	55
4.3.6. Otros venenos animales.....	58
5. Discusión.....	63
5.1. Screening antibacteriano.....	63
5.2. Descripción composicional del veneno.....	65
5.3. Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura.....	67
6. Conclusiones.....	70
7. Recomendaciones.....	71
Referencias bibliográficas.....	72

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Valores de MIC ₅₀ , MIC ₉₀ y MBC.....	24

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Cinética de inhibición del veneno de <i>L. acrochorda</i> frente a: A) <i>S. aureus</i> ; B) SARM; C) <i>S. enteritidis</i> ; y D) <i>E. coli</i>	23
<i>Figura 2.</i> Separación de proteínas provenientes del veneno de <i>L. acrochorda</i> por A) Electroforesis SDS-PAGE; B) Electroforesis bidimensional SDS-PAGE; y C) Marcador de peso molecular. ...	25
<i>Figura 3.</i> Separación de los componentes del veneno crudo de <i>L. acrochorda</i> por RP-HPLC en una columna Purospher (r) STAR RP-18 (250 X 4.6 mm) a flujo de 1 min/mL. Los números en el cromatograma indican los picos que fueron recuperados.....	26

Resumen

Título: Evaluación de las propiedades antibacterianas del veneno de una población de *Lachesis acrochorda* Garcia,1986 (Serpentes:Viperidae) del Carmen del Chucurí, Santander.*

Autor: Sepúlveda-González, David Arturo**

Palabras Clave: *L. acrochorda*, Viperidae, pruebas antimicrobinas, SARM, *S. aureus*

Descripción:

Las infecciones bacterianas son causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Debido a seis décadas de uso indiscriminado de antibióticos, las bacterias se han vuelto cada vez más resistentes a medida que avanza el tiempo. La resistencia a antibióticos se ha llevado a la OMS a clasificar las infecciones bacterianas dentro de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo. Para combatir esta problemática se han investigado nuevas fuentes de agentes microbianos de origen natural. Entre ellos, los venenos de serpiente destacan por tener una alta cantidad de sustancias farmacológicamente activas debido a su composición proteica inusual y compleja. Entre las serpientes, los miembros de la familia Viperidae son conocidos por su diversidad de componentes del veneno lo que las ha llevado a ser los protagonistas en estos estudios de inhibición bacteriana. En Colombia hay 6 géneros de vipéridos, entre los cuales destaca el género *Lachesis*; entre sus miembros están las víboras más grandes del mundo, habitan en zonas boscosas remotas haciéndolas difícil de encontrar y mantener en cautiverio por lo que solo hay pocos estudios caracterizando la composición de su veneno, así como su perfil de inhibición bacteriano. En Santander se encuentra la especie *L. acrochorda*, la cual no cuenta con estudios de actividad antimicrobiana. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad antimicrobiana del veneno crudo de la serpiente *L. acrochorda*. El veneno liofilizado se evaluó en cuatro cepas bacterianas, dos Gram positivas y dos Gram negativas. Además, se realizó un análisis composicional del veneno mediante las técnicas de RP-HPLC y SDS-PAGE tanto unidimensional como bidimensional. El veneno pudo inhibir exitosamente las bacterias Gram positivas *S. aureus* y SARM. Los resultados encontrados aportan al conocimiento de la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos en el veneno de serpiente

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Herminul de Jesús Cano, Ph.D y Co-Director: Juan David Bayona Serrano, Ph.D.

Abstract

Title: Evaluation of the antibacterial properties of the venom of a population of *Lachesis acrochorda* Garcia, 1986 (Serpentes: Viperidae) from Carmen del Chucurí, Santander *

Author(s): Sepúlveda-González, David Arturo **

Key Words: *L. acrochorda*, Viperidae, antibacterial activities, SARM, *S. aureus*

Description:

Bacterial infections are a cause of mortality and morbidity throughout the world. Due to six decades of indiscriminate use of antibiotics, bacteria have become increasingly resistant as time progresses. Antibiotic resistance has led the WHO to rank bacterial infections among the top 10 causes of death worldwide. To combat this problem, new sources of microbial agents of natural origin have been investigated. Among them, snake venoms stand out for having a high amount of pharmacologically active substances due to their unusual and complex protein composition. Among snakes, members of the Viperidae family are known for their diversity of venom components, which has led them to be the protagonists in these bacterial inhibition studies. In Colombia there are 6 genera of viperids, among which the genus *Lachesis* stands out; among its members are the largest vipers in the world, they inhabit remote forested areas making them difficult to find and keep in captivity, so there are only a few studies characterizing the composition of their venom, as well as their bacterial inhibition profile. In Santander, the species *L. acrochorda* is found, which has no antimicrobial activity studies. The objective of this work was to characterize the antimicrobial activity of the raw venom of the snake *L. acrochorda*. The lyophilized venom was evaluated in four bacterial strains, two Gram-positive and two Gram-negative. In addition, a compositional analysis of the venom was carried out using the RP-HPLC and SDS-PAGE techniques, both one-dimensional and two-dimensional. The venom was able to successfully inhibit the Gram-positive bacteria *S. aureus* and MRSA. The results were found to contribute to the knowledge of the search for new antibacterial agents in snake venom.

* Bachelor Degree Work

** Science Faculty, Department of Biology, Advisor: Herminul de Jesús, Ph.D. and Co-advisor: Juan David Bayona Serrano, Ph.D

Introducción

Las bacterias son patógenos peligrosos que pueden causar enfermedades infecciosas (Medina *et al.*, 2016; Woodford y Livermore, 2009). En la última década, la resistencia de éstas a un gran espectro de antibióticos tradicionales se ha convertido en un problema clínico alarmante (Medina *et al.*, 2016; de Oliveira-Junior *et al.*, 2013). Como respuesta a esta situación la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos de fuentes no convencionales, entre ellas los venenos animales que constituyen una fuente rica de sustancias farmacológicamente activas, se ha convertido en un área bastante explorada (Vargas *et al.*, 2012).

Las serpientes son uno de los grupos de animales vertebrados más reconocidos por la diversidad de toxinas que sus venenos contienen, incluyendo varias moléculas bioprospectables (Bordon *et al.*, 2020; Brogden *et al.*, 1988; Mackessy, 2021). Múltiples trabajos han aislado y probado las propiedades antibacterianas de componentes individuales del veneno de serpiente encontrando que las principales toxinas con efectos antibacterianos suelen ser las L-aminoácido oxidasas (LAAO), las fosfolipasas A2 (PLA2), las hialuronidasas (HYA) y las metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP) (Rheubert *et al.*, 2020; Stiles *et al.* 1991; Vargas *et al.*, 2012). Además, los venenos de diferentes serpientes muestran una actividad diferencial hacia cepas de bacterias específicas lo que los hace candidatos interesantes para buscar posibles moléculas con efectos antibacterianos (Rheubert *et al.*, 2020). Los venenos crudos de varias especies de la familia

Viperidae han mostrado efectividad contra cepas Gram positivas, Gram negativas, bacilos y cocos (Charvart *et al.*, 2018). Dentro de los componentes comunes del veneno de este grupo de serpientes las PLA₂ y los LAAO fueron en gran medida las proteínas con mayores efectos antibacterianos (Charvart *et al.*, 2018).

En Colombia contamos con un total de 20 especies de vipéridos distribuidas en 6 géneros, algunos de los cuales ya han demostrado poseer componentes de sus venenos con actividad antimicrobiana (Boda *et al.*, 2019; Uetz, 2021). Dentro de este grupo se encuentra el género *Lachesis*, conformado por especies comúnmente conocidas como “verrugas”, siendo el género de víboras más grande del mundo (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). En Colombia se registran las especies *L.acrochorda* y *L.muta* que suelen habitar áreas boscosas remotas siendo difíciles de encontrar y mantener en cautiverio (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Debido a la dificultad para obtener muestras de sus venenos se han realizado pocos estudios caracterizando su composición y posibles efectos antibacterianos (Diniz-Sousa *et al.*, 2020). Sin embargo, en la especie *L. muta* fue encontrada una PLA₂ (LmutTX) con capacidades antibacterianas contra cepas Gram negativas y Gram positivas (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Además, péptidos sintéticos diseñados a partir de *LmutTX* demostraron también ser efectivos agentes antimicrobianos y una interesante posibilidad de bioprospección (Diniz-Sousa *et al.*, 2018).

Con todo lo anterior, este estudio analizó las propiedades antibacterianas del veneno crudo de la víbora *L.acrochorda*, para aumentar el estado de conocimiento de la especie. Además, se realizó una revisión de la información disponible en la literatura sobre los efectos antibacterianos reportados en otras especies de serpientes para compararlos con los datos encontrados para *L.acrochorda* en este trabajo.

1.Objetivos

1.1 General

Caracterizar la actividad antibacteriana del veneno crudo de la serpiente *L. acrochorda*

Garcia,1986 (Serpentes:Viperidae).

1.2 Específicos

- Describir la composición proteica del veneno mediante los métodos de SDS-PAGE y HPLC.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del veneno de la serpiente *L. acrochorda* de una población de San Vicente de Chucurí (Santander).
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del veneno de la serpiente *L. acrochorda* de una población de San Vicente de Chucurí (Santander).
- Comparar la CMI y la CMB del veneno de la población estudiada de *L. acrochorda* con la información reportada para otras especies de serpientes en la literatura.
- Recopilar y organizar la información reportada en la literatura sobre los efectos antibacterianos encontrados en venenos de serpientes.

2. Competencias

- Comprende el uso y significado de una prueba de concentración mínima inhibitoria y bactericida.
- Interpreta correctamente los resultados obtenidos en las pruebas dándoles significado biológico.
- Analiza apropiadamente la literatura relacionada para abordar los resultados obtenidos.
- Busca y recopila de forma eficiente la información disponible en la literatura sobre el tema de interés utilizando diferentes bases de datos y argumentos de búsqueda.
- Elabora un informe final en el formato de la biblioteca de la Universidad Industrial de Santander.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención del veneno

Se usó un pool de veneno de los individuos adultos de *L. acrochorda*. Estas muestras de veneno se obtuvieron del banco de tejidos de la colección herpetológica de la Universidad Industrial de Santander. Las muestras estaban liofilizadas y conservadas a -80°C dentro de viales estériles.

3.2 Cepas bacterianas

En este proyecto se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), SARM (CMPUJ), y *Salmonella enteritidis* subsp. *Enterica* serovar. *enteritidis* (ATCC 13076) pertenecientes al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la universidad industrial de Santander. Todas las cepas se mantienen conservadas a -80°C y se reactivan previos a los ensayos correspondientes en medio BHI.

3.3 Screening bacteriano

Las cepas bacterianas Gram negativas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB, DifcoTM, Nueva Jersey, EE.UU) y las cepas Gram positivas se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (MERCK Darmstadt, Germany) durante 12 horas hasta superar la fase exponencial; y luego se ajustaron a una turbidez correspondiente a 0,5 en la escala de McFarland, indicando una concentración de $\sim 1.5 \times 10^6$ UFC/mL.

La actividad antimicrobiana del veneno de *L. acrochorda* fue evaluada usando el método de dilución en caldo (CLSI M07). Las muestras se incubaron en proporción 1:1 a concentraciones de 50, 100, 500 y 1000 ppm las cuales se incubaron en microplacas de 96 pocillos por 8 horas a 37°C a 200 rpm. Las lecturas de densidad óptica se realizaron cada hora a 595 nm para determinar los

cambios en la cinética de crecimiento ocasionada por el veneno. Como control de crecimiento se usó solución salina estéril y como control de la inhibición se usó Ofloxacina.

3.3.1. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida. La evaluación del CMI y el CMB de las bacterias patógenas *E. coli* (ATCC 11775), *Salmonella enteritidis* subsp. *Enterica* serovar. *enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y SARM (CMPUJ); se realizó siguiendo el protocolo del CLSI documento M27-A2 y el protocolo de microdilución en caldo estandarizado en el GIBIM (Cáceres *et al.*, 2020; Espinel-Ingroff *et al.*, 2004). La CMI fue definida como la menor concentración de antibiótico que produce una inhibición en el crecimiento de bacteriano. Los valores de CMI50 y CMI90 corresponden a las dosis capaces de inhibir el 50 y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente. La CMB fue definida como la concentración mínima capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano (Espinel-ingroff *et al.*, 2004). Se realizó evaluación de diferencias significativas utilizando *t-test student* (95% de confianza) y ANOVA de una vía en cada una de las cepas evaluadas.

3.3.1.1. MIC. Se preparó un pre-inóculo a partir de un cultivo en placa fresco de cada una de las cepas. Se utilizó caldo Luria-Bertani (LB; Merck) para *E. coli* (ATCC 11775) y *S. enteritidis* (ATCC 13076); y caldo Mueller-Hinton (MH; Merck) para *S. aureus* (ATCC 29213) y *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (CMPUJ), los pre-inóculos fueron incubados por un periodo de 12 horas a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una concentración bacteria una de 4.6×10^8 Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC/mL), según la escala de Mcfarland. El inóculo se preparó a

partir del pre-inóculo llevándolo a 30 mL con medio estéril, obteniendo una absorbancia entre 0,07 y 0,1 (equivalente a $\sim 5 \times 10^5$ UFC) (Espinel-ingroff *et al.*, 2004).

Posteriormente se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 μ L del inóculo bacteriano en microplacas y se evaluaron concentraciones seriadas del péptido sintetizado libre y nano-encapsulado para las dos cepas. Las placas se incubaron a 37°C con agitación constante y se procedió a medir la absorbancia durante cada hora en un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA (Bio-rad, Imarck) a 595 nm.

3.3.1.2. MBC. Una vez evaluada la cinética de crecimiento de las cepas patógenas, se tomó una alícuota de 100 μ L de cada pozo que contenga las diferentes concentraciones del péptido y se incubó en 900 μ L de medio infusión cerebro corazón (BHI) en tubos eppendorf a 37°C durante 24 horas. Se tomó una alícuota de 10 μ L de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de la CMB se definió como la concentración mínima capaz de inhibir el 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo (sin tratamiento) (Espinel-ingroff *et al.*, 2004).

3.4 Descripción composicional del veneno

3.4.1. RP-HPLC. Se usaron 4 mg del veneno liofilizado de *L. acrochorda* disueltos en 500 μ L de una solución al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua. Seguido a esto, se realizó un quick por un minuto para homogenizar la solución. Posteriormente, la solución con la muestra se aplicó a

una columna Purospher (r) STAR RP-18 endcapped (micro-m) (250 mm x 4,6 mm) y se separó mediante RP-HPLC en un cromatógrafo Shimadzu Prominence. Las proteínas eluyeron en un gradiente de la solución A (0,1% TFA en agua) hacia la solución B (0,1% TFA en acetonitrilo) de la siguiente manera: A durante cinco minutos, 0-24% de B en 14 minutos, 24%-40% B en 44 minutos y 40%-50% de B por 64 minutos a una velocidad de 1,0 mL/min (Fernández *et al.*, 2010). La corrida cromatográfica fue monitoreada a 220 nm, las fracciones fueron recolectadas y liofilizadas en tubos eppendorf.

3.4.2. MALDI-TOF. La masa molecular de los fragmentos obtenidos por RP- HPLC se determinaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (TOFSpec SE, Micromass, Reino Unido). Los fragmentos del veneno se disolvieron en 500 μ L TFA al 50% (v/v) en Acetonitrilo-Agua. La matriz de ensayo consistía en una solución al 0.7 mg/mL de ácido α -Cyano-4-hydroxycinnamic (HCCA). La solución y la matriz se colocaron en una placa masiva MALDI y se secaron en horno durante 5 minutos.

3.4.3. SDS-PAGE. Para evaluar el material proteico, el grado de purificación y el peso molecular del veneno de *L. acrochorda*, se realizó electroforesis SDS-PAGE. Se usaron geles de Acrilamida/Bisacrilamida de concentración 5%, y de separación de 12%. Las muestras de la secreción mucosa y sus fracciones se mezclaron con buffer Laemmli (3.55 mL de agua tipo I; 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8; 2.5 mL de glicerol; 2 mL de SDS al 10% y 0.2 mg de azul de bromofenol al 0.5%). Se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se cargó 15 μ L por pozo. Se usó un marcador de peso molecular con rango entre 14.4 y 116 kDa. Los geles se corrieron a un voltaje

inicial de 30 V por 20 minutos hasta que las muestras entraron en el gel de separación; posteriormente, se subió el voltaje a 150 V hasta el final de la corrida. La coloración de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Coomassie, se sometió el gel a una solución de tinción de Coomassie R-250 durante 1 hora, seguido de solución para decolorar (50 % metanol, 10 % ácido acético) hasta lograr la respectiva visualización de las bandas (Laemmli, 1970). Este procedimiento se realizó por triplicado.

3.4.4. SDS-PAGE bidimensional. El veneno de *L. acrochorda* fue separado por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Las proteínas obtenidas en el proceso anterior fueron analizadas por electroforesis bidimensional (2D-PAGE), técnica descrita por O'Farrel (1975) y modificada por Görg et al., (1988). 2D-PAGE es una técnica que permite la separación proteínas o "spots" dependiendo de dos propiedades independientes de estas (propiedades moleculares de carga (punto isoelectrico) y peso molecular) (Suarez *et al.*, 2021).

Se utilizaron tiras de gradientes de pH inmovilizado (IPG-Strip) de rango de pH 3-10 no lineal. La muestra fue mezclada y cargada al IPG-strip de 17 cm en una proporción 1:1 con buffer de rehidratación (Urea 8 M, Chaps 2%, DTT 50 Mm, Anfolitos 0.2% y Azul de bromofenol 0.1%) durante 12 a 14 horas (Suarez *et al.*, 2021).

Las proteínas se separaron en un Protean IEF cell (Bio-Rad) según su punto isoelectrico en una primera etapa conocida como isoelectroenfoque (IEF). Posteriormente, se realizaron un paso de equilibrio mediante un proceso de reducción-alquilación en un buffer que contiene Urea 6 M, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, SDS 2%, Glicerol 20% y DTT 2%, logrando así la reducción de puentes disulfuro en la muestra; un segundo paso se llevó a cabo con una solución que contiene

Iodoacetamida 2% en lugar de DTT para bloquear los grupos sulfhídricos (Görg et al. 1988a). Cada paso se realizó por 30 minutos en agitación constante (Suarez *et al.*, 2021).

En la segunda etapa las proteínas fueron separadas de acuerdo con su peso molecular (Laemmli 1970). Se corrió un SDS-PAGE en una cámara electroforética Protean xi Cell (Bio-Rad) a 200v. Se usó buffer de corrida (Glicina 1.44%, Tris-base 0.2%, SDS 0.1%) para la migración de las proteínas. El peso molecular y punto isoelectrico de las muestras se determinó comparando la movilidad electroforética de los marcadores PageRuler™ unstained protein ladder, 2D-SDS-PAGE Standards (Suarez *et al.*, 2021).

Finalmente, los geles se fijaron en una solución de Metanol 50% y Ácido fosfórico 2%. Para realizar la tinción de los geles obtenidos se preparó una solución de metanol 33%, ácido fosfórico 3%, sulfato de amonio 17% y azul de coomassie G-250, posteriormente, los geles se lavaron con agua MQ y se almacenaron en una solución decolorante débil (Metanol 5% y Ácido acético 10%). Cada experimento fue corrido por triplicado (Suarez *et al.*, 2021).

3.5 Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura con la actividad encontrada en *L. acrochorda*

Se realizó un levantamiento bibliográfico sistemático en las bases de datos Web of Science (WoS), Scopus, Redalyc y PubMed utilizando una ecuación de búsqueda con una serie de palabras claves seleccionadas que involucren trabajos relacionados con actividades antibacterianas encontradas en venenos de serpientes restringiéndola al período de 1970 a 2021 en las secciones del resumen, título y palabras clave de cada documento (Sweileh et al., 2016).

Cada artículo fue leído y analizado para incluir solo las publicaciones que presentaron datos explícitos sobre actividades antibacterianas del veneno de serpiente (en el caso de trabajos de investigación, comunicaciones breves e informes de casos), o que contengan una recopilación revisada de estos (en el caso de reseñas, libros, capítulos de libros y otros).

Para cada publicación, se revisó todo el documento para extraer y colocar la siguiente información en la base de datos: año, título, tipo de publicación, palabras clave, familia, género, especie, tipo de cepa inhibida, aproximación metodológica y familia de toxinas.

Luego, se generó una base de datos que permitirá identificar los grupos de serpientes con mayor cantidad de datos disponibles, cuáles son las toxinas que presentan actividad antibacteriana con mayor frecuencia y cuáles son las cepas bacterianas que muestran susceptibilidad a las toxinas de serpientes, entre otros. Estos datos permitirán realizar una revisión profunda del estado del conocimiento sobre los efectos antibacterianos reportados en venenos de serpiente.

Figura 1. Cinética de inhibición del veneno de *L. acrochorda* frente a: A) *S. aureus*; B) SARM; C) *S. enteritidis*; y D) *E. coli*.

Cada color representa cada una de las concentraciones de veneno que fueron evaluadas en cada una de las cepas bacterianas evaluadas. En el eje x está el tiempo en horas y en el eje y se encuentra el porcentaje de crecimiento.

Las bacterias Gram positivas *S. aureus* y SARM (Figura 1, A y B) mostraron resultados similares de inhibición con un valor de 49.87 % a una concentración de 100 ppm para ambas cepas; lo que indica susceptibilidad ante el veneno de *L. acrochorda*.

Por otro lado, las cinéticas de las cepas Gram negativas mostraron valores específicos entre ellas. En *S. enterica* subsp. *Enterica serovar. enteritidis* la concentración de 1000 ppm alcanzó a inhibir el 45% del crecimiento a las 8 horas de cultivo (Figura 1, C). Para *E. coli*, el crecimiento de las muestras tratadas no muestra diferencia frente a las muestras de control de crecimiento; además, la inhibición en las concentraciones más altas no supera el 32% (Figura 1, D)

4.1.2 Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida.

Tabla 1.

Valores de MIC₅₀, MIC₉₀ y MBC

Microorganismo	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC
<i>S. aureus</i> (ATCC 21213)	250 ppm	>1000 ppm	No presenta
SARM (CMPUJ)	250 ppm	>1000 ppm	No presenta
<i>S. enteritidis</i> (ATCC 13076)	>1000 ppm	>1000 ppm	No presenta
<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	>1000 ppm	>1000 ppm	No presenta

Luego de determinar las MIC₅₀, MIC₉₀ para las cuatro cepas evaluadas, solo las cepas Gram positivas que fueron inhibidas por el veneno de *L. acrochorda* arrojaron valores de MIC₅₀ (Tabla 1). El valor de MIC₅₀ para *S. aureus* y SARM fue de 250 ppm. En ninguna de las cepas bacterianas fue posible establecer un valor de MBC.

4.2 Descripción composicional del veneno

4.2.1. Perfiles electroforéticos

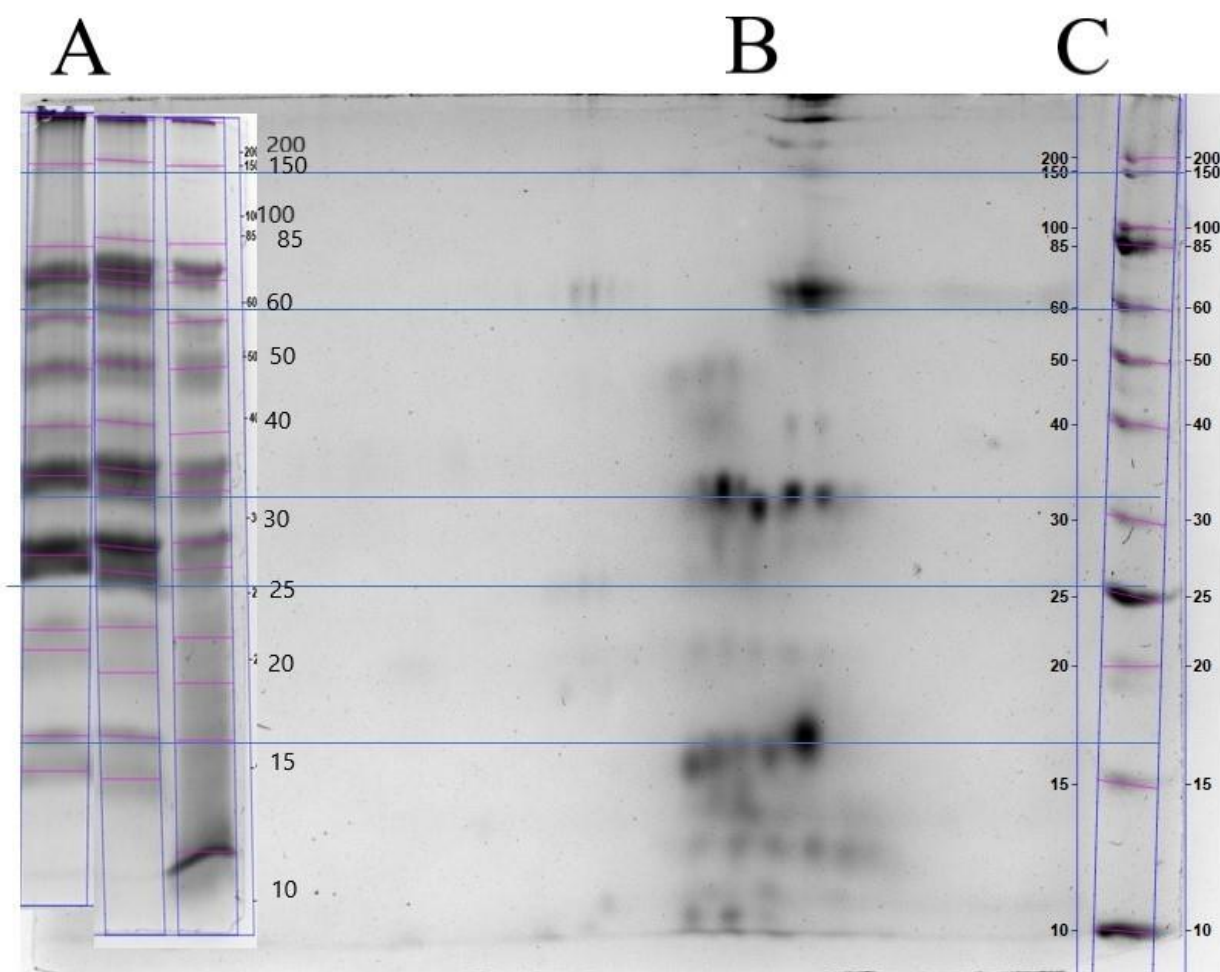


Figura 2. Separación de proteínas provenientes del veneno de *L. acrochorda* por A) Electroforesis SDS-PAGE por triplicado; B) Electroforesis bidimensional SDS-PAGE; y C) Marcador de peso molecular.

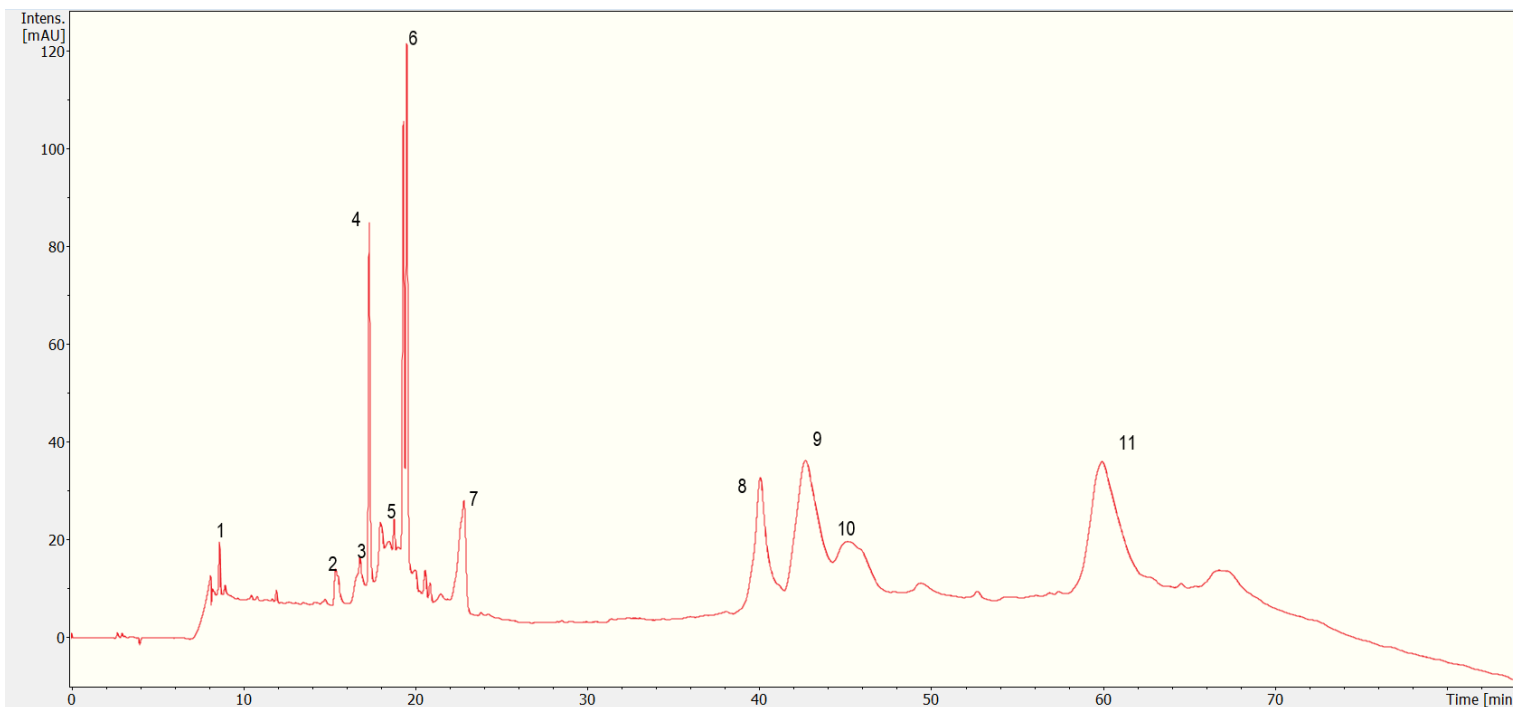


Figura 3. Separación de los componentes del veneno crudo de *L. acrochorda* por RP-HPLC en una columna Purospher (r) STAR RP-18 (250 X 4.6 mm) a flujo de 1 min/mL. Los números en el cromatograma indican los picos que fueron recuperados.

Al analizar el veneno crudo de *L. acrochorda* por SDS-PAGE (Figura 2, A) se encontraron patrones de bandas complejos con componentes de alto y bajo peso molecular, variando desde los 10 kDa hasta más de los 200 kDa. Dentro del perfil electroforético bidimensional es posible ver que todas las bandas encontradas anteriormente tienen una amplia variedad de isoformas; como

no se usó un marcador de PI, el valor se determinó de forma visual dado que las proteínas se encuentran en lado básico del gel, el pH probablemente sea de ~6-8. Por otro lado, al realizar el RP-HPLC del veneno de *L. acrochorda* se pudieron separar 11 componentes mayoritarios en diferentes tiempos de retención (Figura 3).

Utilizando los picos liofilizados obtenidos del RP-HPLC del veneno crudo de *L. acrochorda* se realizó un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de cromatografía y espectrometría de masas de la UIS. Los datos de los espectros identificados fueron generados, pero por limitaciones de tiempo; entre ellas el constante cierre de laboratorios durante la pandemia, el análisis no fue realizado. Esos datos serán considerados y revisados en trabajos futuros para determinar la composición de toxinas del veneno de la especie.

4.3 Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura

El uso masivo de antibióticos a mediados del siglo XX resultó en una disminución dramática de la tasa de mortalidad en todo el mundo (Wu *et al.*, 2020). En la actualidad, las infecciones asociadas a bacterias son causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Okubo *et al.*, 2012). Se estima que la incidencia de estas enfermedades alrededor del mundo es del 5 al 10 % en los países desarrollados y con una frecuencia superior al 25% en países en vía de desarrollo (Okubo *et al.*, 2012). Sumado a esto, la resistencia bacteriana ha sido el factor principal responsable del aumento de la mortalidad y costes sanitarios asociados a las infecciones bacterianas (Ferreira *et al.*, 2011).

Estas enfermedades pueden ser causadas por una serie de microorganismos como bacterias, hongos y virus: sin embargo, los patógenos involucrados en estos procesos infecciosos son

bacterias constitutivas del microbiota humano normal las cuales son inofensivas en individuos sanos, pero pueden ser peligrosas en individuos inmunocomprometidos (Okubo *et al.*, 2012).

Adicional a lo anterior, durante seis décadas los antibióticos se han usado de forma generalizada, por lo que los patógenos bacterianos se han vuelto cada vez más resistentes durante este periodo de tiempo (Abir *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2012;), debido a mutaciones específicas en dianas de antibióticos o adquiridas por genes transposones (Abir *et al.*, 2017; Samy *et al.*, 2014). La resistencia a antibióticos ha convertido en un problema a las bacterias Gram positivas y Gram negativas debido a sus capacidades infecciosas (de Oliviera-Franco, 2013). Por ejemplo, para tratar infecciones quirúrgicas dermales infectadas por *Staphylococcus aureus* u otros patógenos similares se usa metilina, vancomicina, glucopéptidos y betalactamas; sin embargo, la cicatrización de estas heridas sólo tiene éxito moderado en muchos casos (Samy *et al.*, 2014). La suma de estas condiciones llevo a que la organización mundial de la salud clasificara las infecciones bacterianas dentro de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo (Costa *et al.*, 2015).

Debido a esto en los últimos años se han intensificado los esfuerzos para encontrar nuevos agentes antimicrobianos de origen natural (Abir *et al.*, 2017; Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Los productos naturales están superando a los materiales sintéticos al ser una fuente importante de nuevas diversidades químicas, nuevos sitios de acción y mecanismos tan únicos contra los microorganismos que es poco probable que adquieran resistencia a ellos (Wu *et al.*, 2020). Estos compuestos no solo son efectivos sino también tienen menos efectos secundarios sobre la salud humana y el medio ambiente (Wu *et al.*, 2020). Entre ellos, los venenos animales para atacar esta crisis gracias a su alta cantidad de sustancias farmacológicamente activas debidas a si composición

proteica inusual y compleja (Costa *et al.*, 2015; de Oliviera-Franco, 2013; Diniz-Sousa *et al.*, 2018; Okubo *et al.*, 2012).

Solo alrededor del 20% de las serpientes avanzadas tienen sistemas de liberación con colmillos frontales y, por lo general, se les considera de gran interés médico (Accary *et al.*, 2014). El veneno en las serpientes se produce en glándulas especializadas ubicadas en la mandíbula superior. (de Oliviera-Franco, 2013); dentro de ella se sintetizan la secreción de proteínas conocidas como toxinas en las células secretoras de la glándula de veneno (de Oliviera-Franco, 2013). Después de ser metabolizadas, se transfieren al sistema de endomembranas donde el transporte se dará por los gránulos secretores (de Oliviera-Franco, 2013). Estas glándulas exocrinas especializadas están conectados a los colmillos por conductos (Accary *et al.*, 2014).

Los venenos de serpiente son una solución acuosa de múltiples compuestos dentro de los que destacan los péptidos y proteínas (Abir *et al.*, 2017; de Oliviera-Franco, 2013). Estas toxinas pueden causar una amplia variedad de alteraciones en un organismo, incluso alterar canales y receptores intracelulares e incluso enzimas (de Oliviera-Franco, 2013); también atacan tejidos y sistemas neuromusculares (de Oliviera-Franco, 2013).

Sin embargo, no solo se han registrado propiedades dañinas del veneno sino se han comenzado a ver como una fuente de compuestos con alta variabilidad química y funcional (Abir *et al.*, 2017; Toyama *et al.*, 2003). Desde pequeños péptidos hasta proteínas, se han permitido descubrimientos innovadores por lo que se ha estudiado el uso de propiedades farmacológicas de las moléculas presentes en el veneno, viendo como las toxinas son plantillas estructurales para el diseño y síntesis de agentes terapéuticos contra diferentes patógenos como bacterias, hongos y protozoos explorando el potencial biotecnológico de estas toxinas (Abir *et al.*, 2017; de Oliviera-Franco, 2013; Diniz-Sousa *et al.*, 2018; Toyama *et al.*, 2003). En este caso, la revisión se centrará

en los compuestos antimicrobianos como agentes terapéuticos novedosos y eficientes con potencial para atacar las enfermedades infecciosas producidas por estos organismos de forma eficiente.

4.3.1. Veneno completo. Para los años 40, las investigaciones sobre la naturaleza de los venenos de serpiente principalmente se relacionaban según los aspectos bioquímicos e inmunológicos de esas toxinas. Entre los análisis químicos y observaciones de manifestaciones clínicas, algunos trabajos se realizaron en busca de los componentes proteicos altamente variables junto a la determinación de dosis letales mínimas para numerosas especies de metazoos y protozoos (Glaser, 1948). Entre estos estudios analizar un posible efecto bactericida en las toxinas ofídicas, resultó una visión atractiva (Accary *et al.*, 2014; Al-Asmari *et al.*, 2015; Aloof-Hirsch *et al.*, 1968; Blaylock, 2000; Bustillo *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; İğci *et al.*, 2016; Jami *et al.*, 2010; Moerman *et al.*, 2002; Perumal *et al.*, 2006; Perumal *et al.*, 2007; Rangspanuratn *et al.*, 2019; Stocker y Traynor *et al.*, 1986; Talan *et al.*, 1991; Tahir *et al.*, 2018).

Aunque era razonable esperar acción bactericida en una mezcla predominante de proteolisinas y citolisinas; no existían estudios que sustentaran dicha teoría (Glaser, 1948). Los venenos de las serpientes del género *Crotalus* además de haber estado disponibles en la época, tienen las propiedades mencionadas anteriormente de forma muy notoria manifestando necrosis en los casos avanzados de ofidismo por lo que son buenos candidatos para las pruebas antimicrobianas (Glaser, 1948). Este estudio analizó los venenos de *Crotalus mitchelli pyrrhus* y *C. ruber* en pruebas de hemólisis junto a la actividad en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli communis*, *Sarcina sp.* y *Staphylococcus aureus* (Glaser, 1948). El veneno de *C. m. pyrrhus*

mostró una mayor actividad que la de *C. ruber* en todas las pruebas; esto se atribuyó a una menor susceptibilidad en los cocos debido a su forma (Glaser, 1948). El comentario final del autor es que el uso de estos venenos como agentes terapéuticos es remoto debido a la complejidad de los constituyentes proteicos que evitan un adecuado análisis químico (Glaser, 1948).

Por estas épocas los venenos de serpiente se clasificaban en dos grupos principales según su actividad hemolítica: los venenos líticos directos, capaces de hemolizar los glóbulos rojos; y los indirectos, que necesitan una fuente de fosfátidos para realizar la hemólisis (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968). En las cobras el efecto de lisis en los eritrocitos se produce por la acción sinérgica de dos componentes del veneno: una proteína básica que es moderadamente hemolítica por sí misma denominada factor lítico directo (DLF) y una fosfolipasa A que no presenta actividad biológica por sí misma (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968). Sin embargo, el DLF es una mezcla de varios componentes como se evidenció al separarse por electroforesis en papel (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968).

El DLF permite que la fosfolipasa del veneno divida los fosfolípidos de la membrana de los glóbulos rojos; aunque también se ha visto una actividad similar en plaquetas y mitocondrias (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968). El factor lítico directo (DLF) del veneno de *Haemachatus haemachates* fue aislado y purificado mediante la aplicación sucesiva de ácido tricloroacético junto a precipitación de sal (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968). Esta proteína tiene 57 residuos aminoácidos; intramolecularmente cuenta con 4 puentes disulfuro (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968). En pruebas de actividad biológica la DLF provoca la inhibición del crecimiento completo de *S. aureus* y *E. coli* durante 24 horas a una concentración de 100 µg/mL (Aloof-Hirsch *et al.*, 1968).

Varios años después se investigó la actividad antibacteriana de los venenos de *Naja naja sputatrix*, *Vipera russellii* y *C. adamanteus* contra *E. coli*. La idea del estudio fue comparar

venenos con polipéptidos activos en la membrana, como es el caso de *N. n. sputatrix*, en contra los que aparentemente no los tenían, los cuales eran *V. russellii* y *C. adamanteus* (Stocker y Traynor *et al.*, 1986). El daño celular provocado por el veneno de *N. n. sputatrix* fue evidente en micrografías electrónicas (Stocker y Traynor *et al.*, 1986). Este estudio fue importante ya que indicaba como la acción del veneno se dirigía hacia la envoltura celular ya que la beta-galactosidasa se detectó en cada uno de los venenos evaluados evidenciando como el grado de daño necesario para permitir la liberación de constituyentes era pequeño (Stocker y Traynor *et al.*, 1986).

Otro enfoque interesante lo da el equipo de Talan *et al.* (Talan *et al.*, 1991) donde se hizo notar que a pesar de la fuerte contaminación oral y en los colmillos de las especies de crotálicos donde se estimaba que existen una gran variedad de bacterias potencialmente patógenas, durante el envenenamiento existe una baja incidencia de infección bacteriana (Talan *et al.*, 1991). Se comparó el veneno de tres especies de crotálicos: *C. viridus helleri*, *C. atrox* y *C. horridus horridus*; el veneno se probó frente a organismos reportados en las cavidades orales de este grupo, seis aeróbicos y ocho anaeróbicos; así como otras bacterias patógenas representativas aisladas de pacientes clínicamente infectados (Talan *et al.*, 1991). Mientras la mayoría de las cepas anaeróbicas fueron resistentes a la mayor concentración de veneno, estos venenos fueron ampliamente activos contra bacterias aerobias Gram positivas y Gram negativas; por lo que se llegó a plantear que el oxígeno era un cofactor necesario para el efecto bactericida (Talan *et al.*, 1991). En estudios adicionales se terminó que el veneno tenía mayor actividad contra estafilococos, *Pseudomonas auriginosa* además de otras especies de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Morganella* (Talan *et al.*, 1991). Sin embargo, la actividad inhibitoria se perdió al incubar prolongadamente muchas especies Gram negativas lo que indicaba o una

recuperación bacteriana parcial o una disminución gradual de la actividad del veneno (Talan *et al.*, 1991).

Un estudio similar buscó analizar las propiedades antibacterianas de las serpientes locales en Sur África (Blaylock, 2000). Los venenos de *Causus rhombeatus*, *Bitis gabonica*, *B. arientans*, *Dendroaspis polylepis*, *D. augusticeps*, *N. melanoleuca*, *N. annulifera* y *Naja mossambica* se probaron contra las cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *B. intermedius*, *Clostridium sordellii* y *C. perfringens* (Blaylock, 2000). Los venenos de la familia Viperidae tuvieron mayor efectividad en cepas aerobias, mientras que los miembros de Elapidae mostrando la misma efectividad contra cepas aerobias y anaerobias; entre ellos resalta el caso del veneno de *D. polylepis* el cual solo mostró actividad contra *C. perfringens* (Blaylock, 2000). EL trabajo concluyó que las propiedades antibacterianas dependen del tipo de veneno y de cepa bacteriana debido a que este efecto biológico probablemente sea consecuencia de más de una toxina (Blaylock, 2000).

De la misma manera para abordar esta problemática debido a la especificidad de la actividad antibacteriana según el origen del veneno está en probar múltiples venenos sobre una cepa de importancia clínica (Perumal *et al.*, 2006). Este es el caso de *Burkholderia pseudomallei*, el agente causante de la melioidosis, el cual hace parte del problema de la resistencia a fármacos (Perumal *et al.*, 2006). Esta bacteria se encuentra distribuida ampliamente en el suelo y el agua superficial generando casos en todos los continentes, especialmente en el sudeste de Asia y el norte de Australia (Perumal *et al.*, 2006). La mayoría de los pacientes adultos desarrollan una enfermedad pulmonar aguda o septicémica, ambas con altas tasas de mortalidad (Perumal *et al.*, 2006).

B. pseudomalei se enfrentó a varios venenos y los resultados del veneno completo se compararon con LAAO y PLA₂ aisladas (Perumal *et al.*, 2006). Los venenos de *C. adamanteus*, *Daboia ruselli ruselli*, *Agkistrodon halys*, *Pseudechis australis*, *B. candidus* y *P. guttata* mostraron acciones antimicrobianas similares al cloranfenicol y la ceftazidimia; los venenos de la familia Viperidae mostraron un mayor efecto ante estas cepas que los de la familia Elapidae (Perumal *et al.*, 2006). Uno de los efectos más interesantes se vio en *C. adamanteus* donde si bien disminuyó la supervivencia celular no mostró un efecto evidente sobre la viabilidad celular (Perumal *et al.*, 2006). Adicionalmente, todos los venenos completos mostraron una mayor actividad que las LAAO evaluadas; sin embargo, la actividad más fuerte del estudio la dieron las PLA₂ aisladas (Perumal *et al.*, 2006).

Así mismo, un año después al comparar los venenos puros de diferentes taxones junto al de toxinas purificadas para comparar las actividades antibacterianas en cada uno de los casos (Perumal *et al.*, 2007). Los datos hasta la fecha informaban una posible acción sinérgica entre los péptidos antimicrobianos y las enzimas del veneno; esta propiedad sinérgica potencial fue el centro de este tipo de estudios (Perumal *et al.*, 2007). La degradación enzimática de los fosfolípidos en la membrana bacteriana diana destacaba como uno de los factores importantes en la propiedad bactericida de los venenos animales (Perumal *et al.*, 2007).

Este estudio comparó treinta y cuatro venenos crudos, nueve PLA₂ purificados y dos LAAO mediante ensayos de difusión en disco (Perumal *et al.*, 2007). Los venenos de serpientes mostraron actividad en promedio de dos a cuatro bacterias patógenas diferentes; mostrando datos comparables a las de los fármacos estándar (Perumal *et al.*, 2007). Entre los venenos examinados, cuatro especies de Viperidae: *D. r. ruselli*, *Echis carinatus*, *B. g. rhinoceros* y *B. arietans*; y dos especies de Elapidae: *P. australis* y *N. n. naja* mostraron fuertes efectos antimicrobianos,

especialmente contra *S. aureus*. En orden de susceptibilidad las bacterias fueron *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Perumal *et al.*, 2007). De igual manera que al estudio anterior, se observó un efecto más fuerte con los venenos de la familia Viperidae frente a los de la familia Elapidae (Bustillo *et al.*, 2008; Perumal *et al.*, 2006). También de forma semejante al estudio anterior, al comparar la acción de los LAAO, fue significativamente mayor a la de los venenos crudos; también la actividad de las PLA₂ purificados mostraron la actividad antimicrobiana más potente (Perumal *et al.*, 2006; Perumal *et al.*, 2007).

Pasado un tiempo, se compararon cuatro venenos de serpiente de la familia Viperidae: *A. rhodostoma*, *Bothrops jararaca*, *B. atrox* y *Lachesis muta* contra diez cepas clínicas Gram positivas y Gram negativas resistentes a medicamentos (Ferreira *et al.*, 2011). Los venenos de *A. rhodostoma* y *B. atrox* fueron activos contra *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*; así mismo, *B. jararaca* inhibió el crecimiento de *S. aureus* (Ferreira *et al.*, 2011). La actividad de los venenos fue comparable entre ellos, como se pudo observar al tener MIC similares (Ferreira *et al.*, 2011). Curiosamente, el veneno de *L. muta* no mostró ser efectivo a pesar de que se tiene conocimiento de una PLA₂ en él, esto se atribuyó a un patrón individual que tienen las serpientes de la familia; esto se refuerza al ver las dos especies usadas del género *Bothrops* las cuales tuvieron actividades diferenciales (Ferreira *et al.*, 2011).

Los datos otorgados por las pruebas fueron abordados desde una perspectiva genómica y proteómica sugiriendo que las tres especies que mostraron actividad significativa serían fuentes factibles para buscar prototipos antimicrobianos para el desarrollo de nuevos antibióticos (Ferreira *et al.*, 2011).

Siguiendo esta metodología, se evaluaron los venenos de dos cobras: *N. arabica* y *W. aegyptia*; junto a cuatro víboras: *E. pyramidum*, *E. coloratus*, *Cerastes gasperetti*, *B. arietans* (Al-

Asmari *et al.*, 2015). En víboras, el veneno de *E. coloratus* fue el más eficaz contra las cepas muestreadas; *E. pyramidum* y *C. gasperettii* mostraron efectos medios; mientras, *B. aorientans* mostró la menor actividad (Al-Asmari *et al.*, 2015). Por otro lado, y a diferencia de lo comúnmente encontrado en literatura, las cobras demostraron ser muy efectivas contra los cinco microorganismos con datos muy cercanos a los obtenidos en víboras, incluso más eficaces (Al-Asmari *et al.*, 2015).

Entre las cepas probadas la más susceptible fue SARM, seguida de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *P.aeruginosa* (Al-Asmari *et al.*, 2015). Los venenos de serpiente mostraron actividad biológica comparable a la de los antibióticos, mostrando un efecto dosis dependiente (Al-Asmari *et al.*, 2015). Esta tendencia si es compatible a lo obtenido en la literatura donde las bacterias Gram negativas son más resistentes presuntamente por la membrana externa formada por lipopolisacáridos que afectan la captación de péptidos antimicrobianos (Al-Asmari *et al.*, 2015).

Ya con suficientes pruebas de un perfil diferencial en la actividad antimicrobiana en cada veneno el trabajo de Boda *et al.* (2019) mostró actividades antimicrobianas en varias especies de las familias Viperidae y Elapidae mediante la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas para seis cepas bacterias, tres Gram positivos junto a tres Gram negativos (Boda *et al.*, 2019). Las especies usadas pertenecientes a la familia Elapidae fueron *Acanthopis praelongus*, *D. angusticeps*, *N. atra* y *N. kaouthia*; en Viperidae se usaron *A. piscivorus leucostoma*, *A. p. piscivorous*, *B. gabonica*, *C. atrox*, *C. polystictus*, *D. siamensis* y *V. latastei gaditana* (Boda *et al.*, 2019).

Para el género *Crotalus* aunque sus perfiles fueron similares, se encontraron diferencias en sus actividades antimicrobinas, indicando que el veneno de *C. atrox* presentaba mayor actividad que el de *C. polystictus* (Samy *et al.*, 2008). De forma similar en el género *Agkistrodon* a pesar de

la similitud en los perfiles proteicos y en las actividades antimicrobianas la susceptibilidad a *K.pneumoniae* fue menor en *A. p. piscivorus* que en *A. p. leucostoma* (Samy *et al.*, 2008). El veneno de *D. siamensis* mostró la mayor actividad antibacteriana contra las cepas Gram positivas *S. aureus* y SARM; junto a una actividad relativamente alta en la Gram negativa *K. pneumoniae*, a pesar de mostrar una composición simple en comparación a los otros venenos de vipéridos (Samy *et al.*, 2008). La actividad de *B. gabonica* fue moderada frente a todas las cepas estudiadas; mientras *V. lastastei* no mostró actividad registrable según parece a que el veneno tiene carencias de PLA₂ en comparación a las otras víboras estudiadas (Samy *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio fue correlacionar la composición cualitativa de los once venenos y su actividad antimicrobiana (Samy *et al.*, 2008). En los elápidos predominan las toxinas de menor peso molecular, mientras que los de los vipéridos parecen ser más abundantes en proteínas de mayor masa (Samy *et al.*, 2008). Además, entre ambas familias hay una distinción en la complejidad de los venenos en donde los venenos de la familia Elapidae son mucho más simples en comparación a los de la familia Viperidae (Samy *et al.*, 2008). Por esto mismo los venenos varían menos entre miembros de la familia Elapidae, a diferencia de los miembros de Viperidae que muestran un perfil mucho más heterogéneo (Samy *et al.*, 2008).

La familia Elapidae también llamó la atención de Rangsipanuratn *et al.* (2019) donde se probaron los venenos de quince especies de los géneros *Naja*, *Bungarus* y *Ophiophagus* contra bacterias de cepas Gram negativas y Gram positivas (Rangsipanuratn *et al.*, 2019).

El veneno de *Ophiophagus hannah* mostró una actividad selectiva contra *S. aureus*, SARM, *S. saprophyticus* y *S. lugdunensis*; la cual fue más eficiente que la de los antibióticos comunes en el mercado junto a la ampicilina, penicilina, cloranfenicol y tetraciclina (Rangsipanuratn *et al.*, 2019). Con estos datos se pudo asegurar que este veneno no tiene una

actividad antimicrobiana de amplio espectro; esto fue explicado debido a la estructura del lipopolisacárido y la densidad de carga para bacterias Gram negativas, o a la composición lipídica de la membrana citoplasmática junto al potencial electrostático de la misma (Rangsipanuratn *et al.*, 2019).

Al usar el microscopio electrónico de barrido reveló que el veneno de *O. hannah* ejercía una actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas generando daño en la membrana (Rangsipanuratn *et al.*, 2019). Se cree que el modo de acción de este veneno es debido a la interacción con la membrana citoplasmática, lo que lleva a una ruptura final y posterior fuga del citoplasma lo que lleva a la muerte bacteriana (Rangsipanuratn *et al.*, 2019). Así mismo, se cree que esta actividad biológica podría deberse a componentes enzimáticos como las PLA₂ (Rangsipanuratn *et al.*, 2019).

Los resultados de este estudio fueron variados: En primer lugar, aunque los valores por MIC de *O. hannah* fueron más altas que los de los antibióticos estándar, si se llegará a evaluar el compuesto activo solamente podría mostrar un efecto mayor (Moerman *et al.*, 2002). Segundo, de este estudio sugirió que los componentes específicos presentes en los venenos de cada especie pueden tener actividades antimicrobianas variadas, resultando en diferencias en la susceptibilidad dentro de múltiples cepas (Rangsipanuratn *et al.*, 2019).

Por otro lado, también hay estudios donde solo se analiza un taxón a la vez como es en el caso de *B. alternatus* la especie es la responsable de la mayoría de los accidentes ofídicos en el Noreste de Argentina (Bustillo *et al.*, 2008). El veneno fue probado contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*; de las cuales la mayor actividad se dio sobre las dos primeras cepas mientras que *E. faecalis* fue el organismo más resistente ante la actividad biológica (Bustillo *et al.*, 2008). La acción del veneno mostró un efecto dosis dependiente (Bustillo *et al.*, 2008).

Para el caso de *Echis carinatus*, la cual es una de las serpientes más venenosas del mundo debido a su veneno hematotóxico se habían registrado actividad biológica destruyendo células endoteliales y provocando hemorragia (Jami *et al.*, 2010). De este veneno ya se han sintetizados dos fármacos, por lo que su potencial antimicrobiano es prometedor (Jami *et al.*, 2010). Para probar su actividad antibacteriana se usaron seis cepas bacterianas diferentes mediante difusión en gel; los resultados mostraron un efecto significativo contra *S. aureus* y SARM, pero no se vio un efecto notable en las otras cepas (Jami *et al.*, 2010).

En *Montivipera bornmuelleri* se obtuvieron datos prometedores al mostrar un efecto notable en *S. aureus* y *Morganella morganii*; además de un efecto intermedio en otras once cepas bacterianas (Accary *et al.*, 2014). Como se vio en estudios anteriores, las bacterias Gram negativas fueron más resistentes a los venenos crudos de serpiente (Bustillo *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; Jami *et al.*, 2010; Perumal *et al.*, 2007); esto puede deberse posiblemente a los lipopolisacáridos cargados en la membrana externa, ya que las cargas podrían afectar la absorción de los componentes antimicrobianos explicando su resistencia al veneno crudo (Accary *et al.*, 2014).

Con la confirmación de la actividad antibacteriana en el veneno de *M. bornmuelleri* se identificaron algunos componentes del proteoma tales como PLA₂, metaloproteasas III y serina-proteasas; sin embargo, muchos datos hicieron falta como la secuenciación N-terminal (Accary *et al.*, 2014).

Por la misma línea de estudio, una amplitud de actividades biológicas se evaluó en *Vipera ammodytes* (İğci *et al.*, 2016). Este fue el primer estudio sobre la detección de la actividad biológica del veneno crudo de *V. ammodytes* (İğci *et al.*, 2016). En cuanto a la actividad antimicrobiana el veneno mostró un perfil de actividad específico para la especie como se ha venido reportando en esta familia (Accary *et al.*, 2014; Al-Asmari *et al.*, 2015; Bustillo *et al.*,

2008; Ferreira *et al.*, 2011; İğci *et al.*, 2016; Jami *et al.*, 2010); el efecto se dio sobre *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. faecium*; esta actividad fue dosis dependiente (İğci *et al.*, 2016). Estos resultados pueden deberse a diferencias en la membrana externa de las bacterias o a la composición del mecanismo de alteración celular (İğci *et al.*, 2016).

Adicionalmente los datos de las actividades citotóxicas y antitumorales refuerzan los datos de actividades específicas en los venenos de serpiente; en este caso en la variación de vías moleculares que controlan la proliferación celular y el metabolismo en diferentes tipos de cáncer (İğci *et al.*, 2016).

4.3.2. Fosfolipasas A₂. Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son miembros de una superfamilia enzimática que se clasifican en 11 grupos según sus estructuras conformacionales, principalmente el patrón de puentes de siete puentes de disulfuro (Rodrigues *et al.*, 2004); y los efectos patológicos que se encuentran en ellas (de Oliviera y Franco, 2013). Estas enzimas son de los compuestos mejor caracterizados de los venenos de serpiente (8). Gracias a esto, las PLA₂ se conocen como enzimas de baja masa molecular con una longitud de 120 a 130 residuos de aminoácidos que hidrolizan los enlaces éster de fosfolípidos en la posición sn-2 de manera dependiente del calcio liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos (de Oliviera y Franco, 2013; Wei *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Además, se pueden encontrar fosfolipasas A₂ básicas y ácidas; los básicos suelen ser responsables de los principales factores tóxicos en el veneno, mientras que los ácidos tienden a tener una toxicidad más baja; sin embargo, son responsables de inducir efectos farmacológicos importantes (8).

Dentro del veneno de serpiente las PLA₂ se clasifican en grupos denominados I y II (Stábeli *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006); además de su función catalítica principal tienen una amplia gama

de efectos importantes (Stábeli *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007) que serán discutidos más adelante.

Principalmente las serpientes pertenecientes a la familia Elapidae contienen PLA₂ pertenecientes al grupo IA; mientras que las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, contienen PLA₂ que se encuentran en el grupo IIA (de Oliviera y Franco, 2013; Páramo *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2006). Dentro del grupo IIA, existen otros dos subgrupos principales: el primero de tiene un ácido aspártico en la posición del aminoácido 49 (Asp49), el cual potencia la unión de Ca²⁺, lo que a su vez aumenta la actividad catalítica de la enzima (de Oliviera y Franco, 2013; Wei *et al.*, 2006). El otro subgrupo tiene un residuo de lisina en el aminoácido 49 (Lys 49); la lisina en la posición 49 evita la unión de Ca²⁺, siendo muy poco hidrófoba, además de perder su actividad catalítica sin perder sus actividades biológicas al ser responsables de mionecrosis y edemas locales (Diniz-Sousa *et al.*, 2018; Páramo *et al.*, 1998). El grupo IIA puede presentar en su mayoría un gran número de actividades biológicas adicionales como agregación plaquetaria, actividad anticoagulante, neurotoxicidad y miotoxicidad (de Oliviera y Franco, 2013; Diniz-Sousa *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2006).

De igual manera, las fosfolipasas secretoras se han clasificado según eficacia a grupos bacterianos determinados (de Oliviera y Franco, 2013; Xu *et al.*, 2007). Las fosfolipasas secretoras A₂ del grupo IIA (sPLA₂-II) muestran una potente actividad bactericida grampositiva, mientras que las fosfolipasas secretoras A₂ del grupo IA (sPLA₂-I) no la tiene (de Oliviera y Franco, 2013; Xu *et al.*, 2007). Esto podría explicarse por la carga positiva de las moléculas svPLA₂, que potencian la unión de las proteínas a las superficies aniónicas de la pared celular, lo que provoca la degradación de los fosfolípidos constituyentes (Samy *et al.*, 2008).

En la naturaleza se han encontrado otros tipos de residuos en el aminoácido 49 pertenecientes al grupo IIA (de Oliviera y Franco, 2013); estas variantes naturales se caracterizan generalmente por mostrar una toxicidad comparable a las demás toxinas del grupo a pesar de tener actividades catalíticas extremadamente bajas (Páramo *et al.*, 1998). Esto quiere decir que estas enzimas poseen actividades perturbadoras de membrana que no están relacionadas con el mecanismo enzimático (Páramo *et al.*, 1998).

Cada una de las distintas variantes dentro de las PLA₂ ha probado resultados particulares en los ensayos antimicrobianos para bacterias Gram positivas y Gram negativas (de Oliviera y Franco, 2013; Wei *et al.*, 2006). Los primeros trabajos se hicieron en *Bothrops*. Páramo *et al.* (1998) evaluó el veneno de *Bothrops asper* donde se encontró que dos fosfolipasas miotóxicas A₂, de los tipos Lys49 y Asp49; denominadas miotoxinas II y miotoxinas III respectivamente (Páramo *et al.*, 1998). Ambas miotoxinas fueron efectivas contra un amplio espectro de bacterias inhibiendo exitosamente bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Lysteria monocytogenes*; además de bacterias Gram negativas como *Brucella abortus*, *Salmonella montevideo*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (Páramo *et al.*, 1998). Debido a que la isoforma Lys49 a pesar de ser catalíticamente inactiva, presenta propiedades bactericidas similares a su contraparte activa Asp49 que es indica que el mecanismo con el que atacan a las bacterias es independiente de la actividad fosfolipasa en sí misma (Páramo *et al.*, 1998). Este trabajo demostró por primera vez un efecto bactericida enzimáticamente independiente de una proteína PLA₂ junto a una descripción del sitio específico dentro de la proteína encargado de dañar la membrana (Santamaría *et al.*, 2005).

Además de lo anterior, los autores evaluaron un péptido sintético que comprendía desde el residuo 115 al 129 cerca del bucle C-terminal (Páramo *et al.*, 1998). Este péptido de 13 residuos

reprodujo el efecto bactericida de la proteína original; esto permitió concluir que si bien la toxina tiene un efecto bactericida directo que es independiente de una actividad enzimática, es dependiente de la presencia de un grupo de aminoácidos hidrófobos cerca al bucle C-terminal (Páramo *et al.*, 1998).

Ocho años después, se estudió la acción de una variación del péptido artificial evaluado por Paramo *et al.* (1998) mediante análisis *in vitro* el cual sería denominado pEM-2 (Santamaría *et al.*, 2005). Este péptido mostro actividad bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas a pesar de mostrar una reducción de la toxicidad en células eucariotas (Santamaría *et al.*, 2005). Adicionalmente a las pruebas biológicas realizadas anteriormente se evaluó la letalidad inducida por la necrosis en ratones debido a las cepas bacterianas *E. coli* y *Salmonella enterica* la cual se vio reducida mediante la administración de pEM-2; esto demuestra el potencial de los derivados de las fosfolipasas A₂ de contrarrestar infecciones microbianas además de la importancia de sus evaluaciones *in vivo* (Santamaría *et al.*, 2005).

De igual manera, del veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* se extrajeron dos PLA₂ miotóxicas básicas mediante pasos cromatográficos; estos se denominaron BnpTX-I y BnpTX-II (Rodrigues *et al.*, 2004). Ambas PLA₂ contenían 121 residuos de aminoácidos; sin embargo, las pruebas biológicas mostrando resultados específicos para cada una de ellas de lo cual lo más destacable es la actividad bactericida de BnpTX-I sobre *E. coli* y *S. aureus* la cual se atribuye a una región C-terminal de unión a heparina (Rodrigues *et al.*, 2004).

En este mismo género, en el veneno de *Bothrops moojeni* se caracterizó un homólogo de fosfolipasa Lys 49 denominado MjTX-II (Stábeli *et al.*, 2006). Este trabajo fue especialmente completo en cuanto a la caracterización funcional y estructural al considerar variaciones estructurales, caracterización enzimática junto a una caracterización molecular (Stábeli *et al.*,

2006). La MjTX-II inhibió el crecimiento contra *E. coli* y *Candida albicans*; además se mostró actividad antitumoral, además de actividad antiparasitaria ().

Otros estudios han evaluado la actividad enzimática de estas PLA₂ no registradas para distintos géneros; este es el caso de un aislamiento del veneno de *Crotalus durissus terrificus* denominada F15 (Toyama et al., 2003) La F15 contiene 122 residuos aminoácidos y fue evaluada ante la presencia de distintos iones, pH y temperatura; además de pruebas de actividad biológica entre las cuales se descubrió una función bactericida frente a cepas Gram negativas y Gram positivas (Toyama et al., 2003).

Si saltamos 11 años, se identificó una PLA₂ del veneno de *Crotalus adamanteus* denominada CaTx-II la cuál mostró efectos bactericidas a distintas concentraciones (Samy et al., 2014). A una concentración de 7,8 µg/mL se registró el efecto sobre *S. aureus*; al aumentarla a 15,6 µg/mL se registró la actividad sobre *Burkholderia pseudomallei* y *Enterobacter aerogenes* (Samy et al., 2014). El efecto de esta toxina resultó en la formación de poros junto a otros efectos dañinos sobre la pared celular bacteriana; a pesar de no presentar citotoxicidad en células de pulmón, fibroblastos cutáneos y ratones (Samy et al., 2014). En estos últimos incluso mostraron un cierre de la herida significativo seguido a una recuperación completa, además de una mejoría en los demás procesos biológicos evaluados al ser tratados con CaTx-II en comparación a los controles que no recibieron tratamiento (Samy et al., 2014).

Otra forma de abordar la problemática de la resistencia bacteriana a partir de las PLA₂ es la síntesis de oligopéptidos que imitan las regiones que causan la actividad antimicrobiana de estas enzimas; como lo que se hizo a partir de la plantilla del PLA₂ Lys 49 llamada CoaTx-II, purificada a partir del veneno de *Crotalus oreganus abyssus* (Almeida et al., 2018). En este trabajo se sintetizaron cinco péptidos buscando zonas clave para reproducir el efecto bactericida; entre ellos

el péptido pC-CoaTxII pudo reproducir el efecto bactericida de la toxina original frente a aislados clínicos multirresistentes (Almeida *et al.*, 2018). Este péptido tiene 13 aminoácidos de longitud que corresponden a los residuos 115 al 129 de la proteína original; esta secuencia está conformada por aminoácidos hidrófobos cargados positivamente, lo cual es un rasgo común en la mayoría de los péptidos antimicrobianos (Almeida *et al.*, 2018). Al realizar pruebas *in silico* se cree que el daño a la membrana bacteriana se debe a la formación de un canal de agua debido a la inserción del péptido (Almeida *et al.*, 2018).

Del mismo modo, una de las variantes de las PLA₂ del grupo IIA se encuentra la promotoxina, la cual presenta argenina en el sitio 49 (Arg 49), la cual fue purificada del veneno de *Protobothrops mucrosquamatus* mediante cromatografía (Wei *et al.*, 2006). La promotoxina está formada por 122 residuos de aminoácidos y aunque cuenta con las características estructurales propias del grupo IIA, no presenta la actividad enzimática propia de las PLA₂ (Wei *et al.*, 2006). Al comprobar los efectos biológicos de la toxina fue bactericida para *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* (Wei *et al.*, 2006). Aun así, la promotoxina demostró miotoxicidad e indujo una alteración de los monocitos humanos lo cual evidencia su participación en los procesos inflamatorios causados por el veneno (Wei *et al.*, 2006).

Siguiendo esta línea de estudio, se descubrió la PnPLA₂, una nueva PLA₂ se describió por primera vez a partir del veneno de *Porthidium nasutum* usando RP-HPLC con una columna C18 (Vargas *et al.*, 2012). Entre las actividades biológicas realizadas mostró actividad bactericida contra *S. aureus* de manera dosis dependiente; este fue el primer informe con una proteína de actividad bactericida del veneno de la especie (Vargas *et al.*, 2012). Sin embargo, a diferencia de las otras enzimas aisladas anteriormente no mostró citotoxicidad para mioblastos C₂C₁₂ (Vargas *et al.*, 2012).

En la serpiente *D. r. russelli* se realizó la purificación y caracterización de las proteínas del veneno; principalmente dos toxinas llamadas viperatoxina, específicamente VipTx-I y VipTx-II (Samy *et al.*, 2015). Al realizar las pruebas antimicrobianas, VipTX-II mostró eficacia contra *S. aureus*, *B. pseudomallei*, *Proteus vulgaris* y *P. mirabilis*; esta actividad fue ocasionada por la formación de poros a lo largo de la membrana que se visualizaron gracias a microscopio electrónico (Samy *et al.*, 2015). Debido a que la toxina no mostró propiedades citotóxicas en células humanas fue propuesto para una evaluación *In vivo* (Samy *et al.*, 2015).

Uno de los trabajos más completos se dio sobre el veneno de *Lachesis muta muta*. Este trabajo aisló un homólogo de Lys 49 usando dos pasos cromatográficos, esta proteína denominada LmutTX carecía de actividad fosfolipasa sobre un sustrato artificial (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Adicionalmente, se realizaron péptidos sintéticos a los cuales se evaluaron sus actividades citotóxicas y antimicrobianas (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Los péptidos sintéticos mostraron efectos citolíticos bajos a diferencia que la proteína original; además, en las pruebas antimicrobianas, aunque la LmutTX mostró actividad especialmente contra *S. aureus* y SARM, los péptidos sintéticos probaron ser efectivos adicionalmente contra *P. aeruginosa* (Diniz-Sousa *et al.*, 2018). Al igual que en los dos casos mencionados anteriormente, este trabajo es el primero en describir el aislamiento de una PLA2 Lys 49 dentro del género *Lachesis*.

Las variaciones dentro del grupo de fosfolipasas IA también han demostrado actividades particulares (Xu *et al.*, 2007). El primer trabajo en informar sobre actividad bactericida grampositiva de sPLA₂-I describe el caso de una proteína identificada a partir del veneno de *Bungarus fasciatus* denominada BFPA (Xu *et al.*, 2007). Dentro de la secuencia de aminoácidos se encontraron 15 medias cisteínas en vez de las 14 que comúnmente se encuentran en las

fosfolipasas del grupo IA, la cual mostró actividad bactericida contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Xu *et al.*, 2007).

Para *Walterinnesia aegyptia*, se purificó una PLA₂ no tóxica a partir de un solo paso cromatográfico y fue llamada WaPLA₂ (Bacha *et al.*, 2017). Este homólogo del grupo IA fue caracterizado mediante pruebas de actividad enzimáticas y pruebas biológicas en las cuales se encontró actividad bactericida para cepas Gram positivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa* y *S. enteric*) (Bacha *et al.*, 2017). Al comparar la actividad bactericida con la actividad hemolítica se sugiere que la primera depende estrictamente de la segunda por lo que su actividad enzimática es responsable de la actividad bactericida mediante un efecto de degradación de la membrana enzimática (Bacha *et al.*, 2017).

4.3.3. Metaloproteinasas. Las metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMPs) son una subfamilia compleja de enzimas dependientes del zinc que están implicadas en una variedad de actividades biológica como la hemorragia, inhibición de la agregación plaquetaria, mionecrosis y respuestas inflamatorias (de Oliviera y Franco, 2013). Estas habilidades se encuentran relacionadas a funciones específicas de múltiples complejos en los dominios SVMP; los cuales se organizan en tres clases diferentes PI, PII y PIII (de Oliviera y Franco, 2013).

El primero, PI es la clase de SVMP más pequeña, con masas moleculares entre 20 y 30 kDa; tienen un pro-dominio y un dominio proteinasa; generalmente muestra fibrinógeno o actividades fibrinolíticas (de Oliviera y Franco, 2013). La clase PII tiene masas moleculares intermedias de 30 a 60 kDa y contiene los dominios idénticos a PI además de un dominio desintegrina (de Oliviera y Franco, 2013). Por último, las PIII son la clase de MVPs más grande,

con masas moleculares de 60 a 100 kDa; están conformadas por estructuras pro-dominio, preproteinasa y son ricas en cisteínas (de Oliviera y Franco, 2013).

Las SVMP son conocidas principalmente por sus capacidades proteolíticas, de adhesión matriz-célula y célula-célula; pero algunos estudios también analizan sus propiedades bactericidas debido a este tipo de funciones (de Oliviera y Franco, 2013; Samy *et al.*, 2015). Estos estudios muestran ser efectivas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas en especial sobre las Gram positivas; posiblemente debido al reconocimiento del sitio aniónico bacteriano y la degradación de las membranas de fosfolípidos (Samy *et al.*, 2015).

Uno de estos estudios aisló a partir del veneno de la serpiente *A. halys*, una proteína de 21 kDa; la cuál presenta alta similitud con otras SVMP aisladas en la familia Viperidae debido a dominios conservados propios a la clase PIII (Samy *et al.*, 2008). Esta metaloproteinasa mostró actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *B. pseudomallei*; sin embargo, mostraron no tener actividad citotóxica sobre células monocítas humanas (Samy *et al.*, 2008). Este estudio sugiere que la metaloproteinasa encontrada generaba efecto antimicrobiano por el reconocimiento del sitio aniónico bacteriano y por la degradación enzimática de las membranas de los fosfolípidos debido a un proceso de perforación que deriva en una ruptura de la membrana (Samy *et al.*, 2008).

4.3.4. L- aminoácido oxidasas. Las l-aminoácido oxidasas del veneno de serpiente (SV-LAAO), son glicoproteínas que comúnmente tienen masas moleculares entre 110 y 150 kDa; estas enzimas representan aproximadamente el 30% de todo el veneno de serpiente (de Oliviera y Franco, 2013; Samy *et al.*, 2015; Stábeli *et al.*, 2004). Cada monómero de las SV-LAAO constan de tres dominios, y su estructura completa está formada por un total de 14 hélices α y 18 hebras β

(de Oliviera y Franco, 2013). A pesar de encontrarse ampliamente en la naturaleza, el veneno de serpiente es la fuente más rica de esta enzima (Samel *et al.*, 2008). Estas enzimas catalizan la desaminación oxidativa de sustrato de L-aminoácido en un α -cetoácido dependiente del FAD que se encuentra en el veneno de serpiente y su toxicidad probablemente se deba a la reoxidación de la reducción transitoria del cofactor de flavina por el oxígeno molecular; además muestran una marcada afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos (Izidoro *et al.*, 2006; Stábeli *et al.*, 2004).

También se ha propuesto que los iones de zinc involucrados en la estabilización de sus estructuras cuaternarias podrían ser un factor relevante para sus actividades biológicas las cuales abarcan acciones plaquetarias, inducción de apoptosis, efectos hemorrágicos, citotoxicidad, y propiedades antimicrobianas (de Oliviera y Franco, 2013; Samy *et al.*, 2015). Se ha propuesto que las LAAO pueden actuar como defensa del huésped para otro organismo, ya que se encuentran en una amplia variedad de fluidos animales como la leche y el moco epidérmico; su actividad antimicrobiana puede deberse a la acción del peróxido de hidrógeno generado como resultado de la catálisis causante de la oxidación de L-aminoácidos por los LAAOS, así como la unión de estas a las membranas bacterianas (de Oliviera y Franco, 2013; Okubo *et al.*, 2012; Samy *et al.*, 2015). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula bactericida con actividad ante cepas Gram positivas y Gram negativas (Samy *et al.*, 2015). Sin embargo, la cantidad de H_2O_2 producida es insuficiente para generar la muerte celular (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015).

El primer estudio registrado en este tema fue la evaluación de la L-aminoácido oxidasa purificada a partir del veneno de la serpiente *C. adamanteus* (Skarnes, 1970). La enzima había sido purificada anteriormente y para este estudio se obtuvo por fuentes comerciales; la evaluación se hizo con diferentes cantidades de enzima que iban desde los 0,2 μ g hasta los 50 μ g donde a la

mayor concentración se reporta la actividad bactericida para *M. aureus*, *S. typhimurium*, *S. ST Paul*, *S. typhosa*, *P. vulgaris*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *E. coli* (Skarnes, 1970). El autor menciona que el hecho que el sistema L-aminoácido oxidasa tenga el efecto bactericida mientras que el sistema D-aminoácido oxidasa no lo tenga, muestra la importancia del sitio de acción del H₂O₂ durante la oxidación de los aminoácidos; una de las teorías fue la creación de un intermedio tóxico diferente al H₂O₂ (Skarnes, 1970).

Los estudios antes de la década de 1990 sobre LAAO se encargaban de reportar principalmente las propiedades enzimáticas y fisicoquímicas de las moléculas purificadas (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015; Ciscotto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Izidoro *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Okubo *et al.*, 2012; Phua *et al.*, 2012; Samel *et al.*, 2008; Stábeli *et al.*, 2004; Stábeli *et al.*, 2007). Después de los 2000, el foco sobre ellas se ha centrado según sus características farmacológicas, estructurales y moleculares (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015; Ciscotto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Izidoro *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Okubo *et al.*, 2012; Phua *et al.*, 2012; Samel *et al.*, 2008; Stábeli *et al.*, 2004; Stábeli *et al.*, 2007).

Luego, quince años después del trabajo de Skarnes (1970) se encuentra una nueva L-aminoácido oxidasa a partir del veneno de *C. durissus cascavella*; la purificación se realizó usando una combinación de cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico; además fue denominada Casca LAO (Toyama *et al.*, 2006). Esta LAAO en las pruebas biológicas realizadas mostró agregación plaquetaria dependiente de la dosis, la cual fue inhibida por la catalasa; también se afectó el crecimiento bacteriano de cepas Gram negativas (*Xanthomonas axonopodis*) y Gram positivas (*S. mutans*) (Toyama *et al.*, 2006). Al evaluar las cepas bacterianas por microscopía electrónica se sugiere que el H₂O₂ induce a la ruptura de la membrana bacteriana, por lo tanto, a la pérdida de contenido citoplasmático (Toyama *et al.*, 2006).

Por otro lado, se purificaron dos componentes del elárido australiano *P. australis*; estas proteínas se llamaron LAO1 y LAO2 las cuales registraron una potente actividad antimicrobiana para las cepas de *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *B. subtilis* y *S. aureus* (Stábeli *et al.*, 2004). Al realizar pruebas *in vitro* LAO1 y LAO2, fueron respectivamente 70 y 17, 5 veces más eficaces que el control con tetraciclina (Stábeli *et al.*, 2004). Esta actividad se correlacionó con la actividad enzimática y fue eliminada al suministrar la catalasa (Stábeli *et al.*, 2004).

Ya entrados los años dos mil se destacaron el número de trabajos; a pesar de que el método de acción de estas LAAO seguía siendo desconocido se reconocieron como posibles agentes biotecnológicos y grandes candidatos para aplicaciones médicas (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015; Ciscotto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Izidoro *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Okubo *et al.*, 2012; Phua *et al.*, 2012; Samel *et al.*, 2008; Stábeli *et al.*, 2004; Stábeli *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2006). Dentro de ellos, un gran número de trabajos se ha dado en el género *Bothrops* (Stábeli *et al.*, 2004). Uno de ellos describe el aislamiento y la caracterización bioquímica de una LAAO a partir del veneno de *B. alternatus*; esta enzima fue registrada como Balt-LAAO-I (Stábeli *et al.*, 2004). Esta enzima induce la agregación plaquetaria y muestra actividad bactericida contra *E. coli* y *S. aureus*; además de ser levemente hemorrágica e induce edema en la pata de ratón (Stábeli *et al.*, 2004).

Dos años después dentro del mismo género se realizó el aislamiento de una nueva LAAO usando una combinación de exclusión molecular, afinidad y pasos de cromatografía hidrofóbica; esta enzima fue denominada BpirLAAO-I, la cual viene del veneno de *Bothrops pirajai* (Izidoro *et al.*, 2006). Como resultado de las pruebas biológicas realizadas la BpirLAAO-I indujo agregación plaquetaria dependiente del tiempo, edemas, y una actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Izidoro *et al.*, 2006). Todas las actividades biológicas fueron inhibidas por la catalasa (Izidoro *et al.*, 2006).

Un año después se realizó una purificación en alto grado en el veneno de *Bothrops moojeni* llamada BmooLAAO-I mediante cromatografía secuencial de intercambio iónico (Stábeli *et al.*, 2007). Se realizó caracterización fisicoquímica, de similitud estructural y pruebas biológicas comunes para el género; todos los efectos biológicos fueron inhibidos por la acción de la catalasa (Costa *et al.*, 2015; Ciscotto *et al.*, 2009; Izidoro *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Okubo *et al.*, 2012; Phua *et al.*, 2012; Samel *et al.*, 2008; Stábeli *et al.*, 2004; Stiles *et al.*, 1991; Stábeli *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2006). La actividad bactericida fue efectiva en *S. aureus*, *Salmonella typhimurim*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (Stábeli *et al.*, 2007). Este estudio es especialmente importante ya que además de todo lo anterior, los análisis estructurales y funcionales realizados intentaron establecer una relación en la estructura -función en estas enzimas (Stábeli *et al.*, 2007).

Tiempo después ya se contaba con la certeza de que en el veneno de *Bothrops jararaca* existía un agente microbiano eficaz contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, en especial *S. aureus* (Ciscotto *et al.*, 2009). Por lo que se buscó caracterizar los componentes responsables (Ciscotto *et al.*, 2009). Este procedimiento se dio mediante diferentes métodos de fragmentación que fueron combinados y posteriormente se sometieron a cromatografía por afinidad con heparina; la enzima con mayor peso molecular fue denominada anti-*S. aureus* (Ciscotto *et al.*, 2009). Debido a la diversidad de LAAO en diferentes características fisicoquímicas, las caracterizaciones no se hacen únicamente para lograr una mejor comprensión en el mecanismo de envenenamiento sino también su potencial biotecnológico, en este caso fueron usadas como reactivos inmunoquímicos para desarrollar una técnica *in vitro* para estimar la potencia neutralizante de los antivenenos antibotrópicos brasileños para caballos (Ciscotto *et al.*, 2009).

Otro de los taxones estudiados en este campo fue la *Naja naja oxiana*, de la cual se aisló y se caracterizó una nueva L-aminoácido oxidasa usando exclusión de tamaño, intercambio iónico

y cromatografía hidrófoba (Samel *et al.*, 2008). Esta proteína mostro actividad antibacteriana que inhibió el crecimiento de las bacterias *B. subtilis* y *E. coli*; también mostró actividad de agregación plaquetaria de manera dosis dependiente (Samel *et al.*, 2008). Ambos efectos biológicos fueron suprimidos por la acción de la catalasa (Samel *et al.*, 2008).

De igual manera, la CR-LAAO es una L- aminoácido oxidasa purificada a partir del veneno de *Calloselasma rhodostoma* la cual ha sido estudiada ampliamente en cuanto a sus características estructurales y bioquímicas; sin embargo, los estudios en cuanto a los efectos farmacológicos no han sido tan abundantes (Costa *et al.*, 2015). El trabajo de Costa *et al.* (2015) evaluó el potencial biotecnológico de esta enzima determinando su actividad bactericida, antifúngica, leishmanicida, tripanocida, citotoxicidad en líneas celulares tumorales y no tumorales (Costa *et al.*, 2015). La CR-LAAO registro efectos bactericias en *S. aureus* y *E. coli* mediante la inducción del desmantelamiento de las paredes celulares bacterianas (Costa *et al.*, 2015).

La L-aminoácido oxidasa del veneno de *O. hannah* es una forma inusual de estas enzimas debido a sus características estructurales únicas y una estabilidad térmica inusual (Lee *et al.*, 2011). Dentro de estos datos únicos está una especificidad única al sustrato L-lisina, el cuál presentaba una actividad bastante pobre frente a otras LAAO; al realizar los estudios estructurales la mostraron evolutivamente distante frente a las otras enzimas de serpiente registradas (Lee *et al.*, 2011). Las pruebas biológicas dejaron efectos antibacterianos especialmente eficaces las bacterias Gram positivas *S. aureus*, *S. epidermis*; para *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* los resultados fueron moderadamente eficaces en las bacterias Gramnegativas al comparar las MIC; estos resultados indican que la unión específica a bacterias es importante para la actividad de la enzima (Lee *et al.*, 2011). La catalasa inhibió el efecto antimicrobiano de la enzima (Lee *et al.*, 2011).

Debido a la importancia para esta especie, un año después se realizó un análisis del veneno completo contra doce cepas Gram negativas y Gram positivas, corroborando lo obtenido en el estudio anterior a mostrar una especial eficacia contra *S. aureus* y *S. epidermis* (Phua *et al.*, 2012). Posterior a esto, se purificó una proteína antibacteriana mediante purificación en gel, intercambio iónico y cromatografía con heparina (Phua *et al.*, 2012). Mediante análisis de espectrometría de masas se confirmó que era la L-aminoácido oxidasa llamada Oh-LAAO (Phua *et al.*, 2012). Esta proteína fue sometida nuevamente a pruebas antibacterianas frente a las 12 cepas usadas anteriormente; en este caso el valor MIC más bajo se dio contra *S. aureus*, SARM y *S. epidermis* (Phua *et al.*, 2012).

Dentro de la especie *Bothropoides matogrosensis* se aisló y caracterizó bioquímicamente una LAAO denominada MbLAO (Okubo *et al.*, 2012); esta enzima está muy relacionada con otras enzimas reportadas para vipéridos. Al realizar las pruebas biológicas mostró actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas y Gram positivas a pesar de no mostrar actividad citotóxica contra macrófagos y eritrocitos. Adicionalmente se evaluó la actividad antimicrobiana en fragmentos de MbLAO los cuales mostraron resultados mejorados haciéndolos candidatos para el diseño de nuevos antibióticos contra microorganismos resistentes (Okubo *et al.*, 2012).

Una actividad similar se encontró en CC-LAAO; la enzima purificada del veneno de *Cerastes cerastes*; la enzima mostró una termo actividad inusual y es estructuralmente distante a otras SV-LAAO reportadas (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015). Al evaluar la interacción de la LAAO con membranas citoplasmáticas de diferentes tipos de células y monocapas interfaciales de Langmuir no se evidenció citotoxicidad contra eritrocitos y células mononucleares de sangre periférica; sin embargo, si hubo citotoxicidad en varias líneas de células cancerosas además de inducir agregación plaquetaria de manera dosis dependiente (Abdelkafi-Kouba *et al.*, 2015). En

cuanto a la actividad antibacteriana se mostraron efectos notables contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Abdelkafi-Kouba *et al.*,2015). Todas las actividades biológicas se inhibieron con la adición de catalasa (Abdelkafi-Kouba *et al.*,2015). Lo importante del estudio son las pruebas de unión que revelaron que CC-LAAO se une a la superficie celular permitiendo la producción de una concentración altamente localizada de H₂O₂ cerca de las interfases de unión; aunque al evaluar la interacción de la enzima con una membrana de fosfolípidos miméticos no se encontró una interacción entre la unión a la membrana y las actividades farmacológicas (Abdelkafi-Kouba *et al.*,2015).

4.3.5. Péptidos antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos se definen como moléculas que tienen una defensa crítica contra todo tipo de microorganismos, protegiendo al huésped de la invasión de bacterias, hongos y virus (de Oliviera y Franco, 2013). Son parte del sistema inmunológico innato por lo que además de hacer parte en la defensa contra la infección de microorganismos, también son capaces de inactivar agentes infecciosos haciéndolos fuertes candidatos para combatir la farmacorresistencia (de Oliviera y Franco, 2013).

La terapia con péptidos ha jugado un papel esencial en la práctica médica desde la aparición de la terapia con insulina en la década de 1920 (Wu *et al.*, 2020). Los péptidos tienen las ventajas de tener alta actividad, especificidad de diana y baja toxicidad (Wu *et al.*, 2020). Hasta 2019 se han probado más de sesenta medicamentos peptídicos en Estados Unidos, Europa y Japón, sin contar los más de trescientos en desarrollo clínico (Wu *et al.*, 2020).

Sin embargo, solo se han descrito unos pocos péptidos adecuados para aplicaciones farmacológicas debido a las malas propiedades fisicoquímicas de los péptidos, como la escasa estabilidad proteolítica y la fácil pérdida de su conformación biológicamente relevante dificultando

su suministro de forma eficiente (Wu *et al.*, 2020); además, la poca compresión de sus determinantes estructurales que participan en el reconocimiento de compuestos de membrana (de Oliviera y Franco, 2013).

Los péptidos antimicrobianos se pueden dividir en cuatro grupos estructurales: α -helicoidales, β -hoja, α -horquilla y péptidos extendidos; además, es común que estos péptidos compartan propiedades anfipáticas (de Oliviera y Franco, 2013). Esta característica les permite unirse a las membranas de los microorganismos y se cree que es la causante de la lisis celular al tener interacción con los lípidos (de Oliviera y Franco, 2013). Por otro lado, estos péptidos pueden autoasociarse formando poros o actuando similar a un detergente en la desintegración de las membranas (de Oliviera y Franco, 2013). Aunque los mecanismos exactos de la acción de estos péptidos aún no están claros, parece que un pliegue de la estructura anfipática es uno de los requisitos previos a la lisis celular (de Oliviera y Franco, 2013).

Las membranas citoplasmáticas bacterianas Gram positivas y Gram negativas presentan fosfolípidos con cargas negativas de forma predominante, siendo los más abundantes el fosfatidilglicerol y la cardiolipina; estos dan lugar a una atracción electrostática hacia los péptidos altamente catiónicos (de Oliviera y Franco, 2013). La interacción entre los péptidos y estos lípidos parece ser esencial para comprender el proceso de alteración de la membrana (de Oliviera y Franco, 2013).

Los péptidos antimicrobianos también están presentes en el veneno de *N. atra* y se han considerado como una forma de abordar esta problemática (Chen *et al.*, 2011; Glaser, 1948; Nair *et al.*, 2007; Oguiura *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008). Uno de ellos evaluó péptidos aislados del veneno de serpientes contra *M. tuberculosis* multirresistente; de los cuales, un péptido de 60 aminoácidos denominado vgf-1 presento actividad antimicrobiana *in vitro* contra estas cepas (Xie

et al., 2003). Este estudio plantea si los tres pares de enlaces disulfuro encontrados en vgf-1 son vitales para la actividad antibacteriana (Xie *et al.*, 2003).

Una de las familias de péptidos antimicrobianos aislados en el veneno de serpiente son las waprin (de Oliviera y Franco, 2013). Una proteína catiónica de 50 aminoácidos del veneno de *Oxyuranus microlepidotus* fue aislada y caracterizada bajo el nombre de omwaprin (Nair *et al.*, 2007). Los autores diseñaron un gen sintético para expresar la proteína recombinante en *E. coli* y así poder realizar análisis funcionales (Nair *et al.*, 2007). La proteína no mostró ser tóxica para ratones albinos suizos en dosis de hasta 10 mg/kg al ser administradas por vía intraperitoneal (Nair *et al.*, 2007). Su actividad antibacteriana es selectiva y dosis dependiente contra bacterias Gram-positivas (*B. megaterium* y *S. warneri*); esta actividad se perdió tras la reducción y alquilación de sus residuos de cisteína, o tras la deleción de seis residuos de aminoácidos N terminales; esto indica que la estructura tridimensional restringida por cuatro enlaces disulfuro y los residuos N terminales son esenciales para su actividad (Nair *et al.*, 2007). El mecanismo de acción es mediante la ruptura de la membrana, como se pudo ver mediante microscopía electrónica de barrido (Nair *et al.*, 2007). La omwaprin no muestra actividad hemolítica en los eritrocitos humanos, mostrando así especificidad para las membranas bacterianas (Nair *et al.*, 2007).

Otra familia de péptidos antimicrobianos que se puede encontrar en los venenos de serpiente son las catelicidininas que actúan como moléculas efectoras multifuncionales de la inmunidad innata (Wang *et al.*, 2008). Su representante en reptiles es la catelicidina-BF, un péptido aislado del veneno de *Bungarus fasciatus*; su estructura secundaria es una conformación anfipática alfa-helicoidal típica dentro de la familia (Wang *et al.*, 2008). Las pruebas biológicas mostraron una actividad eficaz sobre 40 cepas de microorganismos donde se eliminó eficazmente las bacterias y algunas especies de hongos (Wang *et al.*, 2008). Entre las bacterias afectadas estaban

diferentes cepas de *E.coli* y varias especies de *Bacillus*; el efecto antibacteriano fue especialmente eficaz contra bacterias Gram negativas (Wang *et al.*, 2008).

Las b-defensinas son péptidos ricos en cisteína comunes en vertebrados las cuales presentan actividad antimicrobiana directa contra una amplia gama de bacterias Gram negativa y Gram positivas (Oguiura *et al.*, 2011). Similar a este tipo de péptidos la crotamina, una miotoxina del veneno de *Crotalus durissus* mostró una similitud estructural con este grupo lo que la hace candidata a tener los mismos efectos biológicos comunes (Oguiura *et al.*, 2011). Al probar sus propiedades antimicrobianas se ve que afectó a varias cepas de *E. coli*; su actividad se eliminó con NaCl a 12,5 mM (Oguiura *et al.*, 2011). Al ser analizado por microscopia electrónica se pudo ver como la crotamina elimina bacterias mediante la permeabilización de la membrana (Oguiura *et al.*, 2011). A pesar de todo, este péptido parece tener un espectro antibacteriano estrecho a diferencia de lo reportado para las b-defensinas clásicas (Oguiura *et al.*, 2011). Debido a la similitud estructural y al mecanismo de acción se cree que la crotamina y las b-defensinas compartan un ancestro común (Oguiura *et al.*, 2011).

De igual manera, las cardiotoxinas son un grupo de alrededor de 60 residuos de aminoácidos que son abundantes en la familia Elapidae (Glaser, 1948). Al evaluar los efectos biológicos de la cardiotoxina 3 (CTX3) del veneno de *Naja naja atra* se evidenció una mayor actividad inhibidora del crecimiento en bacterias Gram positivas como *S. aureus* a diferencia de las Gram negativas como *E. coli* (Glaser, 1948). La actividad antibacteriana de la CTX3 se correlaciona positivamente con el aumento de la permeabilidad de la membrana de células bacterianas (Glaser, 1948). Mediante exámenes morfológicos se mostró como la cardiotoxina interrumpió la integridad de la membrana bacteriana, por lo que se analizó la capacidad de unión

a lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico en distintos casos para analizar las consecuencias en la permeabilización de la membrana y en el efecto bactericida de la CTX3 (Glaser, 1948).

4.3.6. Otros venenos animales. No solo los venenos de serpientes se han estudiado como potenciales agentes biotecnológicos (de Oliviera y Franco, 2013; Perumal *et al.*, 2006; Perumal *et al.*, 2007; Tahir *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020). Entre ellas las propiedades antibacterianas del veneno de la abeja *Apis mellifera* son conocidas desde los años 40 debido a la presencia de polipéptidos activos en la membrana bacteriana (Stocker y Traynor *et al.*, 1986). En las pruebas contra *E. coli* mostró una actividad similar al veneno de *N. n. sputatrix* siendo los únicos que mostraron cambios morfológicos en las cepas; además, fue el veneno con mayor actividad al compararlo con la acción de tres venenos de serpientes (Stocker y Traynor *et al.*, 1986). Los autores pensaban que la melitina era la principal responsable del efecto biológico en este veneno; sin embargo, los resultados mostraron que en sí misma no causaba daño celular por lo que la acción del veneno se les atribuyó a cambios estructurales posteriores a un efecto antibacteriano primario de los polipéptidos activos (Stocker y Traynor *et al.*, 1986).

De igual manera, al comparar venenos de diferentes especies entre serpientes, abejas y escorpiones en un estudio contra *B. pseudomallei* la PLA₂ del veneno de la abeja *A. mellifera* mostró una actividad antibacteriana significativa contra las cepas evaluadas (Perumal *et al.*, 2006). Sin embargo, los venenos de Apiidae y Scorpionidae mostraron una actividad PLA₂ relativamente menor que los venenos de Viperidae (Perumal *et al.*, 2006). Esta diferencia en la potencia de los venenos se cree que es debido a las enzimas PLA₂ presentes (Perumal *et al.*, 2006).

Un año después, en un estudio comparativo de familias de diversos taxones el veneno de los escorpiones *Buthus hottentota* y *B. martensii* mostraron ser una excepción notable al carecer de actividad antimicrobiana contra todas las cepas probadas (Perumal *et al.*, 2007).

Dentro de los estudios que enteramente han tratado sobre venenos de otros taxones diferentes a las serpientes están los escorpiones (Moerman *et al.*, 2002). El veneno de escorpión se ha investigado por sus neurotoxinas que actúan sobre diferentes canales iónicos; sin embargo, también se han encontrado péptidos formadores de poros alfa-helicoidales en el veneno (Moerman *et al.*, 2002).

En el 2002, Moerman *et al.* (Moerman *et al.*, 2002) aislaron dos péptidos formadores de poros del veneno de *Opisthophthalmus carinatus*; los cuales fueron denominados opistoporina 1 y 2, los cuales se diferencian por un solo aminoácido (Moerman *et al.*, 2002). Adicional a lo anterior, se realizaron estudios de actividad biológica de la opistoporina 1 junto a otro péptido previamente aislado de la especie *Parabuthus schlecteri*, la parabutoporina (Moerman *et al.*, 2002). El péptido más catiónico, en este caso la parabutoporina fue el más activo en las bacterias Gram negativas como se demostró al suprimir el crecimiento de *E. coli*, mostrando ser un péptido importante contra este tipo de cepas (Moerman *et al.*, 2002). De igual manera la opostoporina 1 mostró un resultado similar; si bien ambos péptidos parecen ser especialmente activos contra cepas Gram negativas, no lo son frente a cepas Gram positivas mostrando un mejor efecto que la cefuroxima, un antibiótico clásico (Moerman *et al.*, 2002).

Las propiedades de los péptidos y la diferencia en la composición de las membranas celulares fueron determinantes para la actividad selectiva de los péptidos formadores de poros (Moerman *et al.*, 2002). La parabutoporina es el péptido con mayor superficie polar; además de

poseer un ángulo cargado positivamente más grande lo que podría explicar la actividad antibacteriana en bacterias gran negativas de este péptido (Moerman *et al.*, 2002).

Este estudio mostró que existe una alta conservación en la secuencia de aminoácidos de los péptidos en el veneno de los escorpiones dentro de sus respectivas familias, independiente del continente y región donde se encuentren (Moerman *et al.*, 2002).

Por otro lado, entre los recursos naturales para formar fármacos antibacterianos potentes y eficaces, las arañas destacan enormemente (Tahir *et al.*, 2018). Las arañas son uno de los depredadores terrestres más exitosos y abundantes con aproximadamente cien mil especies existentes, sus venenos contienen una amplia gama de compuestos biológicamente activos que se dirigen a una amplia gama de sitios que incluyen membranas, receptores, canales y enzimas en una gran variedad de especies tanto de vertebrados como de invertebrados (Tahir *et al.*, 2018). En estos venenos se encuentran pequeños polipéptidos conocidos como péptidos antimicrobianos, los cuales causan alteraciones estructurales y funcionales en las membranas celulares al unirse directamente a la membrana plasmática de la célula diana (Tahir *et al.*, 2018).

La araña lobo *Lycosa terrestris* es un artrópodo bien conocido que contienen compuestos tóxicos, los cuales tienen un potencial depredador significativo además de potencial medicinal e insecticida (Tahir *et al.*, 2018). Tahir *et al.* (2018) extrajo y caracterizó el veneno de esta especie además de realizar pruebas de susceptibilidad en pruebas biológicas (Tahir *et al.*, 2018). Las fracciones de veneno resultaron ineficaces contra todas las cepas bacterianas probadas, es decir *Actinobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Pasteurella sp.* (Tahir *et al.*, 2018). Sin embargo, se formaban zonas de inhibición al usar el sobrenadante del veneno en *Actinobacter sp.* (Tahir *et al.*, 2018).

Al analizar el efecto del veneno sobre el crecimiento de las cepas evidentemente se ve que el crecimiento en *Actinobacter sp.* se limitó por medios bacteriostáticos (Tahir *et al.*, 2018). Los resultados del estudio permitieron concluir la propiedad bacteriostática de esta toxina a pesar de no ser citolítico ni neurotóxico (Tahir *et al.*, 2018).

En uno de los estudios más recientes evalúa la glicosilación como una estrategia prometedora para modular las propiedades fisicoquímicas de los péptidos; sin embargo, es poco o nulo el conocimiento disponible sobre la influencia de la glicosilación sobre las actividades biológicas de los péptidos (Wu *et al.*, 2020). Por lo mismo, se usó el péptido HYL del veneno de la abeja *Hylaeus signatus* como péptido modelo y doce monosacáridos diferentes como azúcares modelo para estudiar los efectos del sitio de glicosilación, actividades, así como selectividades celulares de los derivados de HYL (Wu *et al.*, 2020).

La estrategia de síntesis química permite la regulación de las propiedades farmacocinéticas y la especificidad de la diana mediante la modificación del aminoácido o la cadena principal, la incorporación de aminoácidos no naturales y la conjugación de glucanos, extendiendo así la vida media o mejorando la solubilidad de los péptidos (Wu *et al.*, 2020).

Al evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos de sustitución de D-Lys se vio una mejora significativa en la actividad inhibitoria contra las cepas Gram negativas *A. johnsonii* a la vez que se redujo la toxicidad hemolítica (Wu *et al.*, 2020). Sin embargo, estos péptidos redujeron significativamente la actividad inhibitoria contra las cuatro cepas Gram positivas *S. lentus*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* y *E. faecalis* (Wu *et al.*, 2020); indicando que la sustitución puede llegar a reducir a actividad contra varias bacterias Gram positivas para mejorar la selectividad hacia las bacterias en gran parte por la hidrofobicidad (Wu *et al.*, 2020).

Algunos análogos de HYL mostraron una mejora no solo en la selectividad celular y la estabilidad proteolítica, sino también en la actividad antitumoral y antimicrobiana (Wu *et al.*, 2020). Por lo que es posible diseñar péptidos con propiedades mejoradas variando el número, la estructura y la posición de los monosacáridos (Wu *et al.*, 2020). Además, se encontró que la mejor estrategia de sustitución de D-lisina puede mejorar significativamente la estabilidad proteolítica de HYL (Wu *et al.*, 2020). Este trabajo mostró un nuevo enfoque en la investigación de nuevos fármacos peptídicos antimicrobianos (Wu *et al.*, 2020).

5. Discusión

5.1 Screening antibacteriano

Las cepas que mostraron ser susceptibles al veneno fueron *S. aureus* y SARM, donde el veneno crudo fue capaz de inhibir el 49.87% del crecimiento de los organismos. Estos datos corresponden a lo reportado en la literatura al reportar como otros venenos de víboras presentaba una actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (Ferreira *et al.*, 2011; İğci *et al.*, 2016). Este resultado probablemente se deba a las PLA₂ del veneno de serpiente, el cual está bien representado en los venenos de Viperidae (Boda *et al.*, 2019). Aunque la sensibilidad bacteriana a las PLA₂ es muy variable, generalmente las bacterias Gram positivas son susceptibles ya que estas enzimas penetran rápidamente y dañan la bicapa de fosfolípidos bacterianos (Boda *et al.*, 2019; İğci *et al.*, 2016); esto explica la efectividad de los venenos en este tipo de bacterias. Además, a pesar del perfil de acción de inhibición único para cada especie muchos estudios reportan resultados similares a los de este estudio (Accary *et al.*, 2014; Al-asmari *et al.*, 2015; Bustillo *et*

al., 2008; Jami *et al.*, 2010; Perumal *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2011; İğci *et al.*, 2016); como es el caso de Abdulrahman *et al.* (İğci *et al.*, 2016) reportó la mayor sensibilidad para SARM y *S. aureus* en cuatro venenos de tres géneros diferentes.

En cuanto a las bacterias Gram negativas, cuentan con una distribución asimétrica de los lipopolisacáridos lo que limita el acceso de las PLA₂ a la bicapa de fosfolípidos de la membrana citoplasmática, proporcionando resistencia a las fosfolipasas (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019; İğci *et al.*, 2016). Además, muchas de estas bacterias presentan actividad fosfolipasa, haciéndolas naturalmente inmunes (Boda *et al.*, 2019) lo que explicaría los resultados obtenidos para *S. enteritidis* y *E. coli* en este estudio.

Recordando que los resultados en ppm pueden interpretarse en microgramos sobre mililitros. La actividad antimicrobiana de los extractos crudos generalmente se considera moderada si el valor de MIC está entre 100 µg/mL y 625 µg/mL (İğci *et al.*, 2016). Por lo que el extracto de *L. acrochorda* tiene actividad moderada contra *S. aureus* y SARM. Estos valores son comparables a los encontrados en taxones como *Echis pyramidum* (Al-asmari *et al.*, 2015), *C. gasperettii* (Al-asmari *et al.*, 2015), *V. ammodytes* (İğci *et al.*, 2016); y menores para lo reportado en *P. australis* (Perumal *et al.*, 2007), *D. russelli russelli* (Perumal *et al.*, 2007), *E. carinatus* (Perumal *et al.*, 2007), *B. jararaca* (Ferreira *et al.*, 2011), *M. bornmuelleri* (Accary *et al.*, 2014) y *E. coloratus* (Al-asmari *et al.*, 2015).

Sin embargo, dentro del género Ferreira *et al.* (2011) reportó que *L. muta* no presentó actividad antibacteriana, a pesar de contar con una fosfolipasa A₂ previamente identificada (Ferreira *et al.*, 2011). Los autores atribuyeron este resultado al patrón individual de inhibición que tiene cada especie, a pesar de que las muestras obtenidas para *L. muta* se obtuvieron de tres proveedores diferentes (Ferreira *et al.*, 2011). Este mismo estudio muestra evidencia sobre la

diferencia en el espectro de actividad al evaluar dos especies del género *Bothrops* (Ferreira *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que diferentes moléculas y dianas están involucradas en estas actividades biológicas (Ferreira *et al.*, 2011). Por el contrario, Diniz-Sousa *et al.* (2018) encontró en una PLA₂ purificada del veneno de *L. muta muta* actividad frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas; especialmente *S. aureus* y SARM (Diniz-Sousa *et al.*, 2018).

Los resultados sugieren que el veneno de *L. acrochorda* es una fuente factible para buscar prototipos antimicrobianos y diseñar nuevos antibióticos contra cepas bacterianas resistentes específicas, entre ellas *S. aureus* y SARM. También se recomienda fraccionar la muestra para verificar la actividad antimicrobiana en cada una de las fracciones, así como mirar esta actividad a concentraciones más bajas y determinar un posible comportamiento dosis-dependiente; analizar si el efecto de la inhibición de diferentes péptidos y proteínas es de forma sinérgica; y si existen proteínas, péptidos u otras moléculas que interfieren con la actividad antimicrobiana de los péptidos activos.

5.2 Descripción composicional del veneno

Para la discusión de este trabajo se consideraron las bandas que salieron en cada uno de los tres triplicados. La literatura reporta que en Vipéridos son comunes los patrones complejos de bandeo en los procesos de SDS-PAGE (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019;). Entre ellos, una banda fuerte de aproximadamente 15 kDa, la cual se asocia a las PLA₂ (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019). Aunque en este estudio no se ve claramente en el gel de una dimensión, es una banda fuerte en la electroforesis bidimensional. De igual manera, en estos venenos se reportan componentes de mayor peso molecular (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019). Como las serina proteasas, observables entre 25 y 35 kDa (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019); las cuales muestran un

bandeo fuerte en ambas electroforesis. Así mismo, es probable encontrar SVMP de las tres clases reportadas ya que hay bandas fuertes alrededor de los 20 kDa y los 60 kDa (Accary *et al.*, 2014; Boda *et al.*, 2019). De igual manera las bandas por encima de 60 kDa pueden corresponder a enzimas LAAO (Izidoro *et al.*, 2006; Okubo *et al.*, 2011; Stábeli *et al.*, 2007)

Las separaciones SDS-PAGE de los componentes del veneno de *L.acrochorda* mostraron un número correlacionado de bandas de proteínas en comparación con la separación realizada por RP-HPLC, lo que permitió una mayor distinción de las especies moleculares (Accary *et al.*, 2014).

Aunque es difícil comparar los datos obtenidos debido a múltiples variables ente trabajos como: El juicio de cada autor para decidir cuales picos tomar, la sensibilidad de la máquina, el tratamiento de la muestra o la longitud de onda a la cual se haga la medición; el veneno de *L.acrochorda* muestra ser más complejo en comparación a otras víboras como es el caso de *M.bornmuelleri* la cual presento únicamente 9 picos por RP-HPLC (Accary *et al.*, 2014). Sin embargo, el número de picos fue menor frente a otras viperidos como es el caso del cromatograma de en *B.marajoensis* se registraron un total de 18 picos (Galbiatti *et al.*, 2012); en *Eristocophis macmahoni* se encontraron 23 picos (Ali *et al.*, 1998); y en *Pseudocerastes persicus* los autores determinaron un total de 34 picos (Shahbazi *et al.*, 2019). Al comparar el SDS-PAGE, el patrón de componentes entre 10 kDa y 70 kDa es común en los perfiles analizados para los géneros *Echis*, *Cerastes* y *Vipera* (Ali *et al.*, 2014).

En todo el género *Lachesis* la mayoría de las moléculas caracterizadas corresponden a miotoxinas, neurotoxinas, PLA₂, serina proteasas y metaloproteinasas (Diniz-Sousa *et al.*,2020). Debido a estos componentes el envenenamiento dentro del género presenta dolor local, edemas, hemorragias y mionecrosis (Diniz-Sousa *et al.*,2020). Las responsables de está sintomatología en gran parte pueden ser las LAAO y las PLA₂. Se ha postulado que las LAAO en los venenos de

serpiente están involucradas en la respuesta inflamatoria alérgica (Izidoro *et al.*, 2006). Estas enzimas se asocian específicamente al con el daño de las células endoteliales de los mamíferos; se involucran en el deterioro junto a la inducción de la agregación plaquetaria y con la apoptosis de las células endoteliales vasculares, de manera que son responsables del sangrado prolongado de las paredes de los vasos dañados después de la mordedura de serpiente (Izidoro *et al.*, 2006; Okubo *et al.*, 2011; Stábeli *et al.*, 2007). Por otro lado, las PLA2 del veneno de serpiente se involucran en bioactividades como la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ácido araquidónico; también se involucran en actividades hemolíticas, de agregación plaquetaria, anti-coagulantes, neurotóxicas y miotóxicas (Wei *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta aquí la sintomatología es casi exacta a un accidente generado por el género *Bothrops* (Diniz-Sousa *et al.*, 2020). El género *Lachesis* tiene su distintivo al generar dolor y edema local punzante y agonizante durante los primeros minutos de la mordida; después se describe una “sintomatología vagal” caracterizada por sudoración profusa, cólico abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión diastólica, marcha descoordinada y lapsos de conciencia *Bothrops* (Diniz-Sousa *et al.*, 2020). Debido a la peculiaridad de este esquema de envenenamiento es lógico pensar que existen moléculas que aún no son consideradas dentro del veneno.

5.3 Revisión y comparación de los datos reportados en la literatura

Esta revisión abarca trabajos de 1948 desde el primer trabajo que evaluó las propiedades antimicrobianas en el veneno completo de dos especies del género *Crotalus* hasta los trabajos de Rangspanurathn *et al.* (2019) y Boda *et al.* (2019), siendo ambos los más recientes. De un extremo de la historia al otro el estudio de las propiedades del veneno se ha realizado sobre los extractos crudos. La visión de Glaser (1948) donde era razonable esperar efectos bactericidas en una mezcla

predominante de proteolisinas y citolisinas derivó en la confirmación de un perfil de actividad antimicrobiano específico según la especie trabajada.

Al revisar los cambios de este tema a través del tiempo se pueden ver tres grandes periodos de tiempo. El primero son los trabajos de siglo XX, antes de los 2000; en la revisión fueron siete trabajos en este intervalo temporal los cuales muestran las primeras nociones de actividades antimicrobianas en los venenos de serpiente. Donde destacan propiedades básicas como la actividad hemolítica, los conceptos de diferencia de componentes proteicos dentro de las familias Viperidae y Elapidae; y la observación de que a pesar de la contaminación oral en serpientes pocas veces existía la contaminación bacteriana durante el ofidismo. Sin embargo, a finales de este periodo se alcanzaron a estudiar las actividades específicas de componentes aislados del veneno tales como la PLA₂ y las LAAO.

El segundo periodo comprende la primera década de los 2000. Estos años fueron de exploración al separar los componentes del veneno y probar los efectos biológicos de cada uno. Los estudios evaluaron las propiedades de PLA₂, LAAO y la acción de péptidos. Al comparar los resultados obtenidos para las diferentes especies se hizo evidente la existencia de un perfil de acción propio de cada taxón, esta actividad era mostraba diferencias en dos especies de un mismo género las cuales tenían patrones similares de SDS. Sin embargo, a pesar de que estas pruebas permitían probar los efectos de cada una de las partes del veneno por aparte, el mecanismo de acción para muchas de ellas no fue esclarecido; lo máximo eran las pruebas en el microscopio electrónico de barrido que reflejaba los daños ocasionados en las membranas bacterianas. Otros de los resultados importantes fueron mayores registros de actividad en los venenos de la familia Viperidae que en Elapidae; además de que estas moléculas actuaban de mayor manera sobre cepas Gram positivas.

El último periodo de tiempo cubre los trabajos desde 2011 hasta 2019. De igual manera a lo anterior, en este periodo se mantiene a tendencia de investigar partes específicas del veneno en vez del veneno completo. Reforzando de esta manera la noción de un patrón individual en cada especie al comparando especies del mismo género a la vez, permitiendo comparar los datos de acción antibacteriana al no tener diferencias en la metodología como ocurría anteriormente. Por otro lado, nuevos enfoques se abordaron durante esta época como fue abordar los datos desde una perspectiva genómica y proteómica; o la fabricación de péptidos sintéticos a partir de fragmentos específicos como las PLA2 que ya contaban con información de su actividad contra cepas específicas. La purificación fue complementada con estudios de las características estructurales y bioquímicas de los fragmentos del veneno, exhibiendo variaciones únicas en algunos casos mostrando un punto de enfoque nuevo para tener en cuenta dentro del desarrollo farmacológico.

Estos estudios hasta la fecha han representado de manera convincente como estas proteínas y toxinas específicas intervienen en actividades antimicrobianas. Sin embargo, aún son necesarios estudios donde se presente el aislamiento junto a la caracterización funcional de estos componentes para poder llegar a comprender sus mecanismos de acción y finalmente su potencial terapéutico. Sin embargo, al hacer énfasis en la forma en que el potencial antibacteriano a sido interpretado se pueden ver diferencias a lo largo de los años. En especial, al comparar las metodologías de estos trabajos en tres periodos de tiempo como se hizo en los párrafos anteriores.

Dentro de los estudios del siglo XX, el primer método usado en estos estudios fue esparcir el veneno líquido en forma de triángulo sobre cultivos bacterianos que posteriormente fueron incubados durante cuarenta y ocho horas para posteriormente analizar la zona adyacente buscando la ausencia de colonias. En los otros trabajos la técnica más usada fue la dilución en tubos hasta el año 1991 donde las metodologías variaron al ensayo en disco y microdilución.

Para la década del 2000 al 2010 se agregó la dilución en placa, la cuál fue la más usada durante este periodo de tiempo junto a la metodología de la dilución en caldo; sin embargo, los métodos tradicionales seguían usándose y considerándose válidos. Durante este periodo de tiempo se incentivó la búsqueda de la actividad antimicrobiana en la mayor cantidad de taxones posibles por lo que la cantidad de métodos usado responde a la variabilidad en las condiciones de los estudios, muchos de ellos realizados en zonas como África e India. Además, después del 2008 comenzaron a usarse dos ensayos a la vez como una forma de tener una mejor visión de los resultados: El primer ensayo se encargaba de mirar la sensibilidad del cultivo y el segundo se usaba para determinar los valores de MIC correspondientes.

Después del 2010, no surgen nuevos métodos ni tampoco existe una decantación por alguno en específico. Al igual que en el periodo anterior, los métodos más usados fueron la difusión en caldo y la dilución en placa; aunque si se fue posible ver un notable aumento en el uso de dos metodologías para corroborar estos datos.

A pesar de todo, al mirar las cepas inhibidas a lo largo de los años no existe ninguna tendencia apreciable. La cepa Gram positiva con mayor mención de actividad antibacteriana fue *S. aureus* y la Gram negativa *E. coli*; sin embargo, el periodo de 2000 a 2010 fue el que presento un mayor número de cepas inhibidas

6. Conclusiones

- Según los análisis estadísticos el veneno completo de *L. acrochorda* muestra actividad antibacteriana significativa contra *S. aureus* y SARM.
- El veneno completo de *L. acrochorda* alcanzó valores de MIC₅₀ para *S. aureus* y SARM de 250 ppm para ambas cepas.

- El veneno completo de *L. acrochorda* no registró valores de MBC para ninguna de las cepas evaluadas.
- Los análisis composicionales del veneno encontraron la probable presencia de proteínas típicas de la familia Viperidae como las PLA₂, SVMP y serinas proteasas.
- Como se vio en el análisis bibliográfico, la información sobre el género *Lachesis* es bastante limitada. Por lo que este trabajo aporta a este vacío de información; además de ser el primero en evaluar las propiedades antimicrobianas en *L. acrochorda*.

7. Recomendaciones

- Evaluar la actividad antibacteriana de cada uno de los fragmentos obtenidos por RP-HPLC, con el objetivo de purificar las moléculas bioactivas del veneno.
- Realizar pruebas de MIC y MBC con otras cepas Gram positivas para esclarecer el perfil único de inhibición para esta población de *L. acrochorda*.
- Considerar la variación ontogenética en los componentes proteicos del veneno crudo y realizar las pruebas con diferentes estadios de la misma población para visualizar diferencias en la actividad inhibitoria.

Referencias bibliográficas

Ali, S. A., Jackson, T. N., Casewell, N. R., Low, D. H., Rossi, S., Baumann, K., & Fry, B. G. (2015). Extreme venom variation in Middle Eastern vipers: A proteomics comparison of *Eristicophis macmahonii*, *Pseudocerastes fieldi* and *Pseudocerastes persicus*. *Journal of proteomics*, *116*, 106-113.

Ali, S. A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J. M., Kayed, R., Faigle, M., ... & Voelter, W. (2000). Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Archives of biochemistry and biophysics*, *384*(2), 216-226.

Abir Ben Bacha, Mona Awad Alonazi, Mohamed Solman Elshikh, Aida Karray, A novel bactericidal homodimeric PLA2 group-I from *Walterinnesia aegyptia* venom. *Biomac* (2017).

Accary, C., Hraoui-Bloquet, S., Hamze, M., Mallem, Y., El Omar, F., Sabatier, J. M., ... & Fajloun, Z. (2014). Protein content analysis and antimicrobial activity of the crude venom of *Montivipera bornmuelleri*; a viper from Lebanon. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, *14*(1), 49-55.

Al-Asmari, A. K., Abbasmanthiri, R., Osman, N. M. A., Siddiqui, Y., Al-Bannah, F. A., Al-Rawi, A. M., & Al-Asmari, S. A. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of few Saudi Arabian snake venoms. *The open microbiology journal*, 9, 18.

Almeida, J. R., Mendes, B., Lancellotti, M., Marangoni, S., Vale, N., Passos, Ó., & Da Silva, S. L. (2018). A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 19, 248-256.

Aloof-Hirsch, S., De Vries, A., & Berger, A. (1968). The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 154(1), 53-60.

Blaylock, R. S. (2000). Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. *Toxicon*, 38(11), 1529-1534.

Boda, F. A., Mare, A., Szabó, Z. I., Berta, L., Curticaean, A., Dogaru, M., & Man, A. (2019). Antibacterial activity of selected snake venoms on pathogenic bacterial strains. *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 27(3), 305-317.

Bordon, K. de C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiezel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreira, I. G., Oliveira, I. S. de, Boldrini-França, J., Pucca, M. B., Baldo, M. A., & Arantes, E. C. (2020).

From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11(July).

Brogden, R. N., Todd, P. A., & Sorkin, E. M. (1988). Captopril. *Drugs*, 36(5), 540- 600.

Bustillo, S., Leiva, L. C., Merino, L., Acosta, O., Bal de Kier Joffé, E., & Gorodner, J. O. (2008). Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. *Rev Latinoam Microbiol*, 50(3-4), 79-82.

Cáceres, M.; Hidalgo, W.; Stashenko, E.; Torres, R.; Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9, 147.

Charvat, R. A., Strobel, R. M., Pasternak, M. A., Klass, S. M., & Rheubert, J. L. (2018). Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. *Toxicon*, 150(January), 151–167.

Chen, L. W., Kao, P. H., Fu, Y. S., Lin, S. R., & Chang, L. S. (2011). Membrane-damaging activity of Taiwan cobra cardiotoxin 3 is responsible for its bactericidal activity. *Toxicon*, 58(1), 46-53.

Ciscotto, P., De Avila, R. M., Coelho, E. A. F., Oliveira, J., Diniz, C. G., Farías, L. M., ... & Chávez-Olórtegui, C. (2009). Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 53(3), 330-341.

CLSI. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (11th ed.).

Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. de Oliveira Junior, N. G., & Franco, O. L. (2013). Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cellular and molecular life sciences*, 70 (24), 4645-4658.

De Oliveira Junior, N. G., E Silva Cardoso, M. H., & Franco, O. L. (2013). Snake venoms: Attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (24), 4645–4658.

Diniz-Sousa, R., Caldeira, C. A. S., Kayano, A. M., Paloschi, M. V., Pimenta, D. C., Simões-Silva, R., Ferreira, A. S., Zanchi, F. B., Matos, N. B., Grabner, F. P., Calderon, L. A., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2018). Identification of the Molecular Determinants of the Antibacterial Activity of LmutTX, a Lys49 Phospholipase A2 Homologue Isolated from *Lachesis muta muta* Snake Venom (Linnaeus, 1766). *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 122 (4), 413–423.

Diniz-Sousa, R., Moraes, J. do N., Rodrigues-da-Silva, T. M., Oliveira, C. S., & Caldeira, C. A. d. S. (2020). A brief review on the natural history, venomics and the medical importance of bushmaster (*Lachesis*) pit viper snakes. *Toxicon*: X, 7.

Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S. A., Knapp, C. C., Holliday, N., & Killian, S. B. (2004). Multicenter comparison of the Sensititre Yeast One colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2), 718-721.

Fernández, J., Gutiérrez, J.M., Na, Y., Sanz, L., Juárez, P., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2010. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. *Biochimie* 92, 273–283.

Ferreira, B. L., Santos, D. O., Santos, A. L. D., Rodrigues, C. R., de Freitas, C. C., Cabral, L. M., & Castro, H. C. (2011). Comparative analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: a short communication for proteomics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Galbiatti, C., Rocha, T., Randazzo-Moura, P., Ponce-Soto, L. A., Marangoni, S., Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (2012). Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18, 62-72.

Glaser, H. R. (1948). Bactericidal activity of *Crotalus* venom in vitro. *Copeia*, 245-247.

Gorg, A. (1988). with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9 (53), 531-546.

İğci, N., Nalbantsoy, A., Erkan, L. G., Akça, G. Y., Yalçın, H. T., Yalçın, M., & Göçmen, B. (2016). A of cytotoxic, anti-angiogenic, anti-tumorigenic and antimicrobial activities of Anatolian *Vipera ammodytes* (Nose-horned viper) venom. *Turkish Journal of Biochemistry*, *41*(6), 483-491.

Izidoro, L. F. M., Ribeiro, M. C., Souza, G. R., Sant'Ana, C. D., Hamaguchi, A., Homsibrandeburgo, M. I., & Rodrigues, V. M. (2006). Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *14*(20), 7034-7043.

JAMI, A. A. A., Fathi, B., Jamshidi, A., Zolfagharian, H., & ZARE, M. A. (2010). Investigation of the antibacterial effect of venom of the Iranian snake *Echis carinatus*.

Lee, M. L., Tan, N. H., Fung, S. Y., & Sekaran, S. D. (2011). Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *153*(2), 237-242.

Lomonte, B. (2007). Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado Manual de Métodos Inmunológicos. Universidad de Costa Rica. Sede Rodrigo Facio. <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>.

Mackessy, S. P. (Ed.). (2021). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC press.

Medina E, Pieper DH. (2016) Tackling threats and future problems of multidrug- resistant bacteria, in: Stadler M., Dersch P. (Eds.), *How to Overcome the Antibiotic Crisis*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–33.

Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., & Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European journal of biochemistry*, 269(19), 4799-4810.

Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P., & Kini, R. M. (2007). Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. *Biochemical Journal*, 402(1), 93-104.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lomonte, B. (2007). Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado Manual de Métodos Inmunológicos. Universidad de Costa Rica. Sede Rodrigo Facio.

Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R., & Zhang, G. (2011). In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *The Journal of antibiotics*, 64(4), 327-331.

Okubo, B. M., Silva, O. N., Migliolo, L., Gomes, D. G., Porto, W. F., Batista, C. L., & Moreno, S. E. (2012). Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides mattozosensis* pitviper venom. *PloS one*, 7(3), e33639.

Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoechea, J. A., Gorvel, J. P., & Moreno, E. (1998). Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115–129) -peptide identifies its bactericidal region. *European journal of biochemistry*, 253(2), 452-461.

Perumal Samy, R., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Chow, T. K. V., Bow, H., Yap, E. H., & Thong, T. W. J. (2007). Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *Journal of applied microbiology*, 102(3), 650-659.

Perumal Samy, R., Pachiappan, A., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Hian, Y. E., Chow, V. T., ... & Weng, J. T. (2006). In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infectious Diseases*, 6(1), 1-16.

Phua, C. S., Vejayan, J., Ambu, S., Ponnudurai, G., & Gorajana, A. (2012). Purification and antibacterial activities of an L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18, 198-207.

Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodriguez, Y., Lomonte, B., y Calvete, J. J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of Proteomics*, *152*, 1–12.

Rangspanuratr, W., Sandee, A., Daduang, J., & Janwithayanuchit, I. (2019). Antibacterial activity of snake venoms against bacterial clinical isolates. *Pharm Sci Asia*, *46*(2), 80-87

Rheubert JL, Meyer MF, Strobel RM, Pasternak MA, Charvat RA (2020) Predicting antibacterial activity from snake venom proteomes. *PLoS ONE* *15*(1): e0226807.

Rodrigues, V. M., Marcussi, S., Cambraia, R. S., de Araújo, A. L., Malta-Neto, N. R., Hamaguchi, A., & Soares, A. M. (2004). Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, *44*(3), 305-314.

Rodriguez-Tudela, J. L., Donnelly, J. P., Pfaller, M. A., Chryssantou, E., Warn, P., Denning, D. W., & Cuenca-Estrella, M. (2007). Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *Journal of clinical microbiology*, *45*(1), 109-111.

Samel, M., Tõnismägi, K., Rönholm, G., Vija, H., Siigur, J., Kalkkinen, N., & Siigur, E. (2008). L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *149*(4), 572-580.

Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., Chow, V. T., & Ho, B. (2008). Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of cellular physiology*, 216(1), 54-68.

Samy, R. P., Kandasamy, M., Gopalakrishnakone, P., Stiles, B. G., Rowan, E. G., Becker, D., & Chow, V. T. (2014). Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PLoS One*, 9(2), e80199.

Samy, R. P., Stiles, B. G., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Franco, O. L., & Sethi, G. (2015). Viperatoxin-II: A novel viper venom protein as an effective bactericidal agent. *FEBS Open Bio*, 5, 928-941.

Santamaría, C., Larios, S., Quirós, S., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J. P., Lomonte, B., & Moreno, E. (2005). Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1340-1345.

Shahbazi, B., Najafabadi, Z. S., Goudarzi, H., Sajadi, M., Tahoori, F., & Bagheri, M. (2019). Cytotoxic effects of *Pseudocerastes persicus* venom and its HPLC fractions on lung cancer cells. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 25.

Skarnes, R. C. (1970). L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. *Nature*, 225, 1072-1073.

Stábeli, R. G., Amui, S. F., Sant'Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., & Soares, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3-4), 371-381.

Stábeli, R. G., Marcussi, S., Carlos, G. B., Pietro, R. C., Selistre-de-Araújo, H. S., Giglio, J. R., & Soares, A. M. (2004). Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(11), 2881-2886.

Stábeli, R. G., Sant'Ana, C. D., Ribeiro, P. H., Costa, T. R., Tieli, F. K., Pires, M. G., ... & Soares, A. M. (2007). Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *International journal of biological macromolecules*, 41(2), 132-140.

Stiles, B. G., Sexton, F. W., & Weinstein, S. A. (1991). Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *toxicol*, 29(9), 1129-1141.

Stocker, J. F., & Traynor, J. R. (1986). The action of various venoms on *Escherichia coli*. *Journal of applied bacteriology*, 61(5), 383-388.

Suárez L, Pereira A, Hidalgo W, Uribe N. (2021) Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Virulence Activity of Biactive Fractions from Mucus Secretion of Giant African Snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics* (Basel). 10 (12):1548. doi: 10.3390/antibiotics10121548. PMID: 34943760; PMCID: PMC8698528.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021

Tahir, H. M., Zaheer, A., Khan, A. A., & Abbas, M. (2018). Antibacterial potential of venom extracted from wolf spider, *Lycosa terrestris* (Araneae: Lycosiade). *Indian Journal of Animal Research*, 52(2), 286-290.

Talan, D. A., Citron, D. M., Overturf, G. D., Singer, B., Froman, P., & Goldstein, E. J. (1991). Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 164(1), 195-198.

T.R. Costa, D.L. Menaldo, C.P. Silva, R. Sorrechia, S. de Albuquerque, R.C.L.R. Pietro, S. Ghisla, L.M.G. Antunes, S.V. Sampaio. (2015). Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom, *International Journal of Biological Macromolecules*.

Toyama, M. H., de Oliveira, D. G., Beriam, L. O., Novello, J. C., Rodrigues-Simioni, L., & Marangoni, S. (2003). Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, *41*(8), 1033-1038.

Toyama, M. H., Toyama, D. D. O., Passero, L. F., Laurenti, M. D., Corbett, C. E., Tomokane, T. Y., ... & Fonteles, M. C. (2006). Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*, *47*(1), 47-57.

Vargas, L. J., Londoño, M., Quintana, J. C., Rua, C., Segura, C., Lomonte, B., & Núñez, V. (2012). An acidic phospholipase A2 with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. *Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology*, *161*(4), 341-347.

Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., ... & Lai, R. (2008). Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PloS one*, *3*(9), e3217.

Wei, J. F., Li, T., Wei, X. L., Sun, Q. Y., Yang, F. M., Chen, Q. Y., ... & He, S. H. (2006). Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A2 from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. *Biochimie*, *88*(10), 1331-1342.

Wu, M. H., Ai, S., Chen, Q., Chen, X. Y., Li, H. J., Li, Y. L., & Zhao, X. (2020). Effects of glycosylation and D-amino acid substitution on the antitumor and antibacterial activities of bee venom peptide HYL. *Bioconjugate Chemistry*, *31*(10), 2293-2302.

Xie, J. P., Yue, J., Xiong, Y. L., Wang, W. Y., Yu, S. Q., & Wang, H. H. (2003). In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *International journal of antimicrobial agents*, 22(2), 172-174.

Xu, C., Ma, D., Yu, H., Li, Z., Liang, J., Lin, G., & Lai, R. (2007). A bactericidal homodimeric phospholipases A2 from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides*, 28(5), 969-973.

Z. Abdelkafi-Koubaa, I. Aissa, M. Morjen, N. Kharrat, M.E.L. Ayeb, Y. Gargouri, N. Srairi-Abid, N. Marrakchi, Interaction of a snake venom L-amino acid oxidase with different cell types membrane, *International Journal of Biological Macromolecules* (2015).