



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

*Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada (LEMA),
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVet Litoral), UNL-CONICET
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias*

**Identificación, caracterización molecular y evaluación antimicrobiana
de catelicidinas del yacaré overo
(*Caiman latirostris*)**

Autor: Lic. Trinidad de los Ángeles CORDERO GIL

Director: Dr. Pablo A. SIROSKI

Codirectora: Dra. Belkis E. MARELLI

Dedicada a los momentos en los que crea no poder continuar

Agradezco a la migración, por enseñarme a querer a Argentina, mi segunda
casa, tanto como a Venezuela, mi país
A la educación pública universitaria, de Venezuela y Argentina, no pude tener
mejores casas de estudio
A mis padres, por su esfuerzo en siempre darme la mejor educación y una
niñez feliz
A Samuel, por recordarme siempre lo buena que puedo ser, incluso cuando
no lo sabía, no hubiese sido posible sin tí
A la Granja, el Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada
y al Proyecto Yacaré
A Patricia Amavet, porque sin saberlo me enseñaría algo que hoy es mi
primera área de investigación y desempeño, la filogenética
A Soledad Moleón, por ser mi compañera de todo en el laboratorio, por
reírnos juntas de trabajar los feriados y los findes
A Pablo Siroski, por no solo ser mi director, sino también ser la persona que
me aconsejó cada vez que lo necesité
A Belkis Marelli, por su labor como co-directora
A la Ávila y la Smelly, por ser la luz de mis ojos

Gracias

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Orden Crocodylia. Características Físicas	2
Taxonomía.....	4
Distribución y Hábitat.....	5
Ectotermia.....	7
Sistema Inmune.....	8
Sistema Inmune y los cocodrilianos.....	12
Péptidos de Defensa del Huésped (PDHs).....	16
Características de los PDHs	17
Clasificación de los PDHs.....	18
Péptidos antibacterianos.....	20
Péptidos antifúngicos (PAFs).....	20
Péptidos antivirales (PAVs).....	20
Péptidos antiparasitarios.....	20
Péptidos anticancerígenos (PACs)	20
Mecanismos de acción de los PDHs.....	21
PDHs en cocodrilianos.....	23
Alternativas computacionales en el diseño, desarrollo y modificación de PDHs. Definición y ejemplos en cocodrilianos.....	27
OBJETIVOS	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 1. FACTOR DE VENENO DE COCODRILIANOS	33
1.1 Introducción	34
1.2 Materiales y métodos.....	37
1.2.1 Secuenciación génica	37
1.2.2 Análisis filogenéticos.....	38
1.3 Resultados	41
1.4 Discusión	45
CAPÍTULO 2. CATELICIDINAS. UNA FAMILIA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CONSERVADA Y DIVERSA.....	52

2.1	Introducción	53
2.2	Materiales y Métodos	57
2.2.1	Búsqueda y selección de péptidos.....	57
2.2.2	Predicción del potencial antimicrobiano y otras propiedades relevantes de los péptidos.....	58
2.2.3	Determinación de propiedades fisicoquímicas de plcat1lat y plcat2lat	58
2.2.4	Determinación de regiones de plcat1lat y plcat2lat.....	59
2.2.5	Predicción del comportamiento y desempeño de plcat1lat y plcat2lat en membranas y micelas bacterianas.....	59
2.2.6	Determinación de estructura secundaria y terciaria de plcat1lat y plcat2lat	60
2.2.7	Validación de la estructura tridimensional de plcat1lat y plcat2lat	61
2.2.8	Detección, aislamiento, secuenciación y síntesis química de plcat1lat y plcat2lat	61
2.2.9	Análisis por UV-Vis y dicroísmo circular de plcat1lat y plcat2lat	62
2.2.10	Análisis filogenéticos.....	63
2.3	Resultados	67
2.3.1	Potencial antibacteriano predicho y otras propiedades relevantes de plcat1lat y plcat2lat	67
2.3.2	Propiedades fisicoquímicas de plcat1lat y plcat2lat	68
2.3.3	Regiones de plcat1lat y plcat2lat	68
2.3.4	Desempeño de los péptidos en membranas y micelas bacterianas ..	69
2.3.5	Estructuras de orden superior de plcat1lat y plcat2lat	70
2.3.6	Validación de la estructura tridimensional de los péptidos plcat1lat y plcat2lat	71
2.3.7	Dicroísmo circular de plcat1lat y plcat2lat	72
2.3.8	Análisis filogenéticos.....	73
2.4	Discusión	80
2.4.1	Aspectos bioquímicos y estructurales predichos	80
2.4.1.1	Cationicidad	81
2.4.1.2	Anfipaticidad (medida como momento hidrofóbico)	82
2.4.1.3	Hidrofobicidad	84
2.4.1.4	Presencia de residuos aromáticos	85
2.4.2	Relación y análisis entre secuencia-estructura de plcat1lat y plcat2lat	86
2.4.3	Estrategias y posibles modificaciones estructurales de los péptidos ..	89
2.4.4	Análisis filogenéticos de plcat1lat y plcat2lat	89
	CAPÍTULO 3. PROPIEDADES BIOACTIVAS DE PLCAT1LAT Y PLCAT2LAT	91

3.1	Introducción	92
3.2	Materiales y métodos	95
3.2.1	Reconstitución de los péptidos plcat1lat y plcat2lat	95
3.2.2	Activación de cepas bacterianas provenientes de ATCC y aislados clínicos	96
3.2.3	Evaluación de actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat	97
3.2.3.1	Método de microdilución en caldo	97
3.2.4	Evaluación de la actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat	98
3.2.4.1	Identificación de las condiciones óptimas de crecimiento del biofilm	98
3.2.4.2	Ensayo de Inhibición de Biofilm por plcat1lat y plcat2lat	99
3.2.5	Aplicación de microscopía electrónica de barrido a muestras bacterianas expuestas a plcat1lat o plcat2lat	102
3.2.6	Determinación de la viabilidad celular en células VERO	102
3.3	Resultados	103
3.3.1	Actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat. Cepas ATCC	103
3.3.2	Actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat. Cepas provenientes de aislados clínicos	106
3.3.3	Actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat. Cepas ATCC	109
3.3.4	Actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat. Cepas provenientes de aislados clínicos	111
3.3.5	Caracterización de los efectos antimicrobianos de plcat1lat y plcat2lat	113
3.3.6	Viabilidad celular en células VERO posterior a la exposición a plcat1lat o plcat2lat	117
3.4	Discusión	119
	DISCUSIÓN GENERAL	125
	CONCLUSIONES	130
	BIBLIOGRAFÍA	133
	ANEXOS	182
	PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA TESIS	190

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cráneo de <i>C. latirostris</i>	2
Figura 2.	Especímenes adultos de <i>C. latirostris</i>	3
Figura 3.	Filogenia de cocodrilanos	5
Figura 4.	Distribución de <i>C. latirostris</i>	7
Figura 5.	Vías de activación del SC	10
Figura 6.	Diagrama de cinta de la estructura cristalina de C3	11
Figura 7.	Microfotografía de células sanguíneas de cocodrilanos	15
Figura 8.	PDHs registrados en la base de datos de péptidos antimicrobianos	17
Figura 9.	Principales funciones de PDHs	21
Figura 10.	Mecanismos de acción de PDHs focalizados en la membrana bacteriana	23
Figura 11.	Esquema general de las ventajas de los PDHs	28
Figura 12.	Árbol filogenético experimental del FV	42
Figura 13.	Árbol filogenético del FV	43
Figura 14.	Árbol filogenético del complemento C3	43
Figura 15.	Árbol consenso de densidad del FV y el complemento C3	44
Figura 16.	Alfa-hélices de plcat1lat y plcat2lat.	70
Figura 17.	Cromatogramas de A. plcat1lat y B. plcat2lat	73
Figura 18.	Árbol estructural de catelicidinas	75
Figura 19.	Árbol filogenético convencional de catelicidinas	79
Figura 20.	Comparación de la topología de las filogenias	80
Figura 21.	Actividad antimicrobiana de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas ATCC de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	106
Figura 22.	Actividad antimicrobiana de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas provenientes de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	108
Figura 23.	Actividad antibiofilm de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas ATCC de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	111

Figura 24.	Actividad antibiofilm de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas provenientes de aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	113
Figura 25.	Micrografía SEM de <i>S. aureus</i> ATCC mostrando los efectos del péptido plcat1lat	114
Figura 26.	Micrografía SEM de <i>S. aureus</i> bajo los efectos del péptido plcat2lat	115
Figura 27.	Micrografía SEM de <i>E. coli</i> sometida a exposición al péptido plcat1lat	116
Figura 28.	Micrografía SEM de <i>E. coli</i> sometida a exposición al péptido plcat2lat	117
Figura 29.	Viabilidad celular en la línea VERO	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Comparación de los sistemas inmunitarios de mamíferos y reptiles	13
Tabla 2.	PDHs de cocodrilianos y propiedades fisicoquímicas	26
Tabla 3.	Cebadores específicos utilizados para amplificar el FV de <i>C. latirostris</i>	37
Tabla 4.	Secuencias de GenBank incluidas en los análisis	39
Tabla 5.	Bibliotecas producto de transcriptómica.	57
Tabla 6.	Cebadores específicos para la detección de los péptidos de <i>C. latirostris</i>	61
Tabla 7.	Secuencias genéticas incluidas en los análisis filogenéticos secuenciales y estructurales de <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	64
Tabla 8.	Propiedades relevantes de los péptidos seleccionados	67
Tabla 9.	Propiedades fisicoquímicas de la región madura de los péptidos <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	68
Tabla 10.	Regiones de las secuencias de <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	69
Tabla 11.	Comportamiento de <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i> en membranas bacterianas y micelas	69
Tabla 12.	Criterios de validación de la estructura tridimensional de <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	72
Tabla 13.	Bacterias utilizadas para evaluar propiedades bioactivas de <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	96
Tabla 14.	Criterios interpretativos de CMI para <i>plcat1lat</i> y <i>plcat2lat</i>	108

ABREVIATURAS

AIC	Criterio de Información de Akaike
ANA	Dominio anafilotoxina
APD	Base de datos de péptidos antimicrobianos
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATNF	Ángulos de torsión no favorecidos
BIC	Criterio de información Bayesiano
C3	Componente 3 del complemento
C3bB	Convertasa de C3 de la vía alternativa
CAMP	Catelicidina antimicrobiana
CATH	Catelicidina
CATH-like	Similar a catelicidina
CIDAMP	Péptidos antimicrobianos catiónicos intrínsecamente desordenados
CL-11	Colectina 11
CV	Cristal violeta
DBAASP	Base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENF	Enlaces no favorecidos
ET	Elementos transponibles
FB	Factor B
FD	Factor D
FV	Factor venenoso
FVC	Factor del Veneno de la Cobra
HAMP1	Hepcidinas
IA	Inmunidad adaptativa
IC₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IDPs	Proteínas intrínsecamente desordenadas
IDRs	Regiones intrínsecamente desordenadas
II	Inmunidad innata
IS	Índice de selectividad
K	Lisina

LEAP-2	Péptido antimicrobiano expresado en el hígado-2
LINEs	Elementos nucleares intercalados largos
LL37	Catelicidina humana
LNK	Región enlazadora
LTR	Repeticiones terminales largas
LUM	Lectina de unión a la manosa
MCMC	Método de Monte Carlo mediante Cadenas de Markov
MDR	Multirresistencia
MG	Macroglobulina
MHA	Agar Mueller Hinton
MHB	Caldo Mueller Hinton
ML	Machine learning
MRP	Molécula de reconocimiento de patrones
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias
Ma	Millones de años
NK	Natural killer
NMR	Resonancia magnética nuclear
PACs	Péptidos anticancerígenos
PAFs	Péptidos antifúngicos
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PAVs	Péptidos antivirales
PB	Pares de bases
PDHs	Péptidos de defensa del huésped
pLDDT	Prueba de diferencia de distancia local prevista
Protegrina-like	Similar a protegrina
RF	Residuos favorecidos
RF	Distancia Robinson-Foulds
RNF	Residuos no favorecidos energéticamente
SC	Sistema del complemento
SCV	Fenotipos de colonias pequeñas
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SI	Sistema inmune
SINEs	Elementos nucleares intercalados cortos

TATV	Virus taterapox
TED	Dominio tioéster
TH	Transferencia horizontal
TMRCA	Tiempo hasta el ancestro común más reciente
TSB	Caldo de tripteína de soja
TTL	Toxinas y genes similares a toxinas
TV	Transferencia vertical
UV	Radiación ultravioleta
VA	Vía alternativa
VC	Vía clásica
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VL	Vía de las lectinas

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana múltiple representa un problema crítico que exige el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Esta investigación se centra en péptidos antimicrobianos derivados de las catelicidinas de *Caiman latirostris*, un modelo animal poco utilizado en estudios científicos. Estos péptidos fueron evaluados por su potencial terapéutico frente a la mastitis bovina, una enfermedad ampliamente extendida causada principalmente por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para ello, se analizaron cepas bacterianas provenientes tanto de la colección de cultivos tipo (ATCC) como de aislados clínicos de mastitis y endometritis bovina.

La investigación combina enfoques computacionales y experimentales. El enfoque computacional permitió predecir actividades antimicrobianas, hemolíticas, antivirales y anticancerígenas de dos péptidos, denominados plcat1lat y plcat2lat. Además, se validaron sus estructuras secundarias y terciarias, y se analizaron sus interacciones con membranas bacterianas mediante simulaciones moleculares. El enfoque experimental incluyó la caracterización de las alfa hélices mediante dicroísmo circular y pruebas microbiológicas de concentración mínima inhibitoria (32–512 µg/mL), así como estudios de actividad antibiofilm. La microscopía electrónica de barrido evidenció disrupciones morfológicas en las bacterias tratadas, siendo más marcadas en *E. coli*.

Los resultados confirman que ambos péptidos poseen actividad antimicrobiana y antibiofilm, con mayor efectividad antimicrobiana. Aunque su estructura es prometedora, podría optimizarse para mejorar su desempeño. Futuras investigaciones deberían evaluar su acción frente a una mayor diversidad de microorganismos.

ABSTRACT

Multidrug antimicrobial resistance represents a critical problem that demands the development of new therapeutic agents. This research focuses on antimicrobial peptides derived from cathelicidins of *Caiman latirostris*, an animal model rarely used in scientific studies. These peptides were evaluated for their therapeutic potential against bovine mastitis, a widespread disease mainly caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For this purpose, bacterial strains from both the American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates of bovine mastitis and endometritis were analyzed.

The study combines computational and experimental approaches. The computational approach enabled the prediction of antimicrobial, hemolytic, antiviral, and anticancer activities of two peptides, named plcat1lat and plcat2lat. Additionally, their secondary and tertiary structures were validated, and their interactions with bacterial membranes were analyzed using molecular simulations. The experimental approach included the characterization of alpha helices via circular dichroism and microbiological tests to determine the minimum inhibitory concentration (32–512 µg/mL), as well as antibiofilm activity studies. Scanning electron microscopy revealed morphological disruptions in treated bacteria, which were more pronounced in *E. coli*.

The results confirm that both peptides exhibit antimicrobial and antibiofilm activities, with greater antimicrobial effectiveness. Although their structure is promising, it could be optimized to improve performance. Future research should evaluate their action against a broader range of microorganisms.

INTRODUCCIÓN GENERAL



Orden Crocodylia. Características Físicas

Los cocodrilianos son reptiles tetrápodos con forma de grandes lagartos, cuerpo robusto, hocico prominente largo y plano, cola comprimida lateralmente y ojos, oídos y fosas nasales en la parte dorsal de la cabeza. Se consideran “diápsidos” debido a que poseen dos pares de aberturas denominadas “fenestrae”, las cuales se ubican detrás de las órbitas oculares (Figura 1). Poseen un hocico con fuertes mandíbulas armadas de numerosos dientes cónicos ($\approx 30-40$ en cada mandíbula) (Figura 1). Sus ojos poseen membranas nictitantes, que los protegen y permiten la visión bajo el agua. La piel está formada por una gruesa capa dérmica cubierta por escamas epidérmicas y placas óseas intradérmicas denominadas osteodermos (Seijas, 2011).

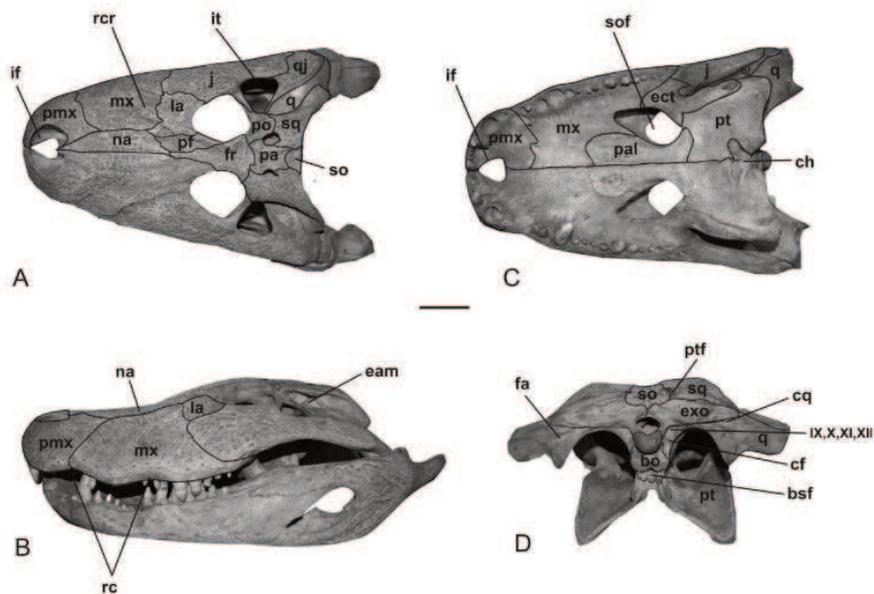


Figura 1. Cráneo de *C. latirostris*. **A.** Vista dorsal **B.** Vista lateral **C.** Vista palatina **D.** Vista occipital. La barra de escala es igual a 5 cm. *bo*, basioccipital; *bsf*, basefenoidea; *ch*, coanas; *cf*, agujero carotídeo; *cq*, canal craneocuartado; *eam*, meato auditivo externo; *ect*, ectopterigoide; *exo*, exoccipital; *fa*, foramen ae`rum; *fr*, frontal; *if*, foramen incisivo; *it*, fenestra infratemporal; *j*, yugal; *la*, lagrimal; *mx*, maxilar; *na*, nasal; *pa*, parietal; *pal*, palatino; *pf*, prefrontal; *pmx*, premaxilar; *po*, postorbital; *pt*, pterigoide; *ptf*, fenestra posttemporal; *q*, cuadrado; *qj*, cuadratoyugal, *rc*, curvaturas rostrales; *rcr*, cresta rostral; *sq*, escamoso; *so*, supraoccipital; *sof*, fenestra suborbital; *f IX*, *f X*, *f XI*, *f XII*, 9-128 forámenes de los nervios craneales. (Fuente: Bona y Desojo, 2011).

Estos animales poseen un corazón cuatricameral (Huchzermeyer, 2003), y son ectotermos, lo que significa que su temperatura corporal depende de la temperatura ambiental y su envergadura (Coulson y Herbert, 1981). En consecuencia, los procesos fisiológicos que dependen de la temperatura

corporal, como la función inmune, la alimentación y el metabolismo, son regulados a través de medios conductuales como la exposición al sol o sumergirse en el agua para elevar o disminuir su temperatura corporal manteniéndola entre los 25 y 35°C, y principalmente entre 30 y 33°C (Lance, 2003; Bassetti *et al.*, 2014). Igualmente, la reproducción también está influenciada por la temperatura, así como la determinación sexual, ya que el desarrollo y la diferenciación del embrión está ligado a la temperatura de incubación durante un período de tiempo denominado “Período Termosensible” donde el embrión desarrollará alguno de los dos sexos (Lang y Andrews, 1994; Van Hoek, 2014).

En particular, *Caiman latirostris* es un cocodrilo de tamaño mediano (Figura 2) (adultos \approx 2 m de longitud y 80 kg de peso), con un tamaño máximo registrado de 3,16 m de longitud total (Verdade *et al.*, 2010; Siroski *et al.*, 2019), posee un cuerpo comprimido en forma dorsoventral, cola fusiforme, musculosa y cónica (Medem, 1983). Su nombre común, yacaré overo, deriva de la distribución de las manchas que lo caracterizan y su hocico robusto y corto, el cual es uno de los más anchos en proporción de entre todos los cocodrilianos (Figura 1) (Medem, 1983).



Figura 2. Especímenes adultos de *C. latirostris*. (Fuente: Siroski, 2011).

Taxonomía

Los cocodrilianos y las aves constituyen los únicos representantes actuales del grupo monofilético de los arcosaurios (clado **Archosauria**), lo que convierte a los cocodrilianos en los parientes vivos más cercanos de todas las aves (Janke y Arnason, 1997; Sennikov, 2012). Si bien ambos linajes divergieron hace más de 240 millones de años (Ma), los primeros fósiles con morfología semejante a las familias de cocodrilianos actuales (Alligatoridae, Crocodylidae y Gavialidae) se registran entre 80 y 90 Ma (Brochu, 2003).

El estado ancestral de los arcosaurios posee un ritmo lento de cambio genómico (Green *et al.*, 2014), esto se evidencia en estudios de filogenia donde la longitud de las ramas sugiere que los cocodrilianos muestran una baja tasa de evolución molecular en relación con todos los grupos de tetrápodos, incluidas las tortugas (Green *et al.*, 2014), teniendo la evolución molecular más lenta de todos los demás linajes, de hecho, el ritmo de los cocodrilianos es aproximadamente un orden de magnitud más tardío que el de lepidosaurios y mamíferos (Figura 3A) (Green *et al.*, 2014).

El orden Crocodylia posee 28 especies que están divididas en 3 familias: Alligatoridae, Crocodylidae y Gavialidae (Hekkala *et al.*, 2011; Shirley *et al.*, 2018). El género *Crocodylus* (cocodrilos verdaderos) es hermano de un clado compuesto por *Mecistops* (cocodrilos africanos de hocico fino) y *Osteolaemus* (cocodrilos enanos) dentro de Crocodylidae. Crocodylidae se agrupa con Gavialidae (gaviales verdaderos y falsos), y este clado combinado es hermano de Alligatoridae (alligatoridos y caimanes) (Figura 3B) (Hekkala *et al.*, 2021).

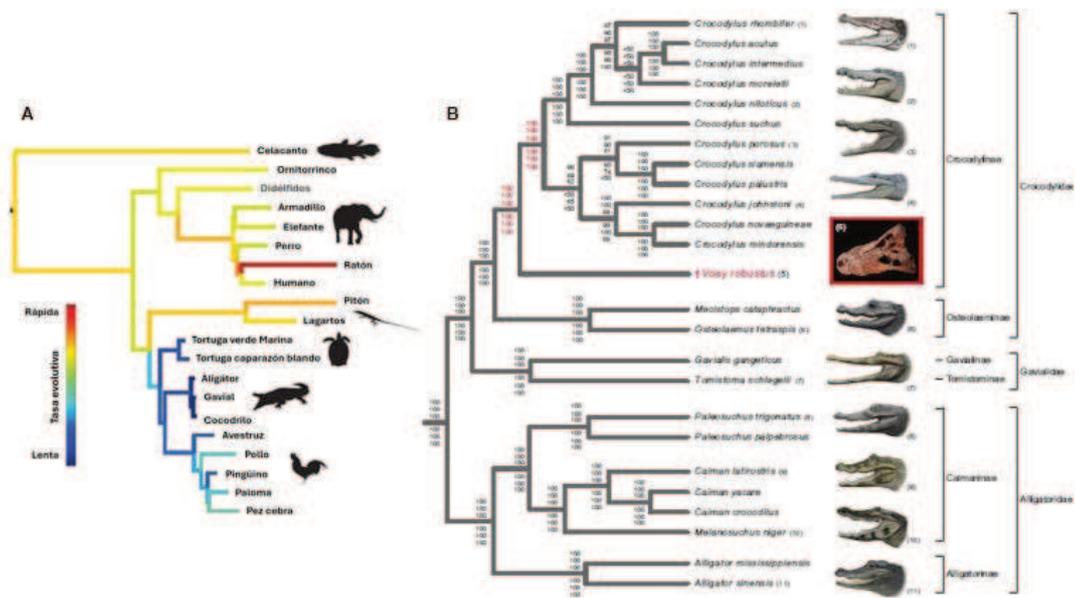


Figura 3. Filogenia de cocodrilanos. **A.** Filogenia inferida de amniotas incluyendo cocodrilanos. Los colores indican las tasas estimadas, correspondiendo los colores fríos a tasas bajas de evolución molecular (Modificado de: Green *et al.*, 2014). **B.** Árbol de relaciones filogenéticas entre Crocodylidae, Gavialidae y Alligatoridae (Fuente: Hekkala *et al.*, 2021).

Distribución y Hábitat

Los cocodrilanos actuales son depredadores semiacuáticos de emboscada y piscívoros que se distribuyen por todo el mundo en los trópicos y subtropicos y habitan en ambientes de agua dulce y estuarios (Grigg y Kirshner, 2015). Estos alcanzaron una distribución global, incluyendo dispersiones en altas paleolatitudes (Estes y Hutchison, 1980; Willis y Stilwell, 2000; Eberle *et al.*, 2014) y a través de grandes barreras oceánicas (Vélez-Juarbe *et al.*, 2007; Meredith *et al.*, 2011; Oaks, 2011; Nicolai y Matzke, 2019).

El clado sufrió una serie de radiaciones y extinciones a lo largo de su historia evolutiva, incluyendo la supervivencia de varios linajes a través de la extinción masiva del Cretácico/Paleógeno. En el curso de estos fenómenos, sufrieron la transición de hábitats totalmente acuáticos a terrestres al menos dos veces (Wilberg *et al.*, 2019), y evolucionaron estrategias de alimentación más allá de los hábitos carnívoros y piscívoros de los taxones existentes (Ósi, 2014; Gignac *et al.*, 2019; Melstrom e Irmis, 2019; Drumheller y Wilberg, 2020, Hilevski *et al.*, 2022). Aunque probablemente limitada por una combinación de factores abióticos y bióticos (Solórzano *et al.*, 2020; Stubbs *et al.*, 2021), la dinámica de diversificación de los cocodrilanos parece mostrar estrechos vínculos con las fluctuaciones ambientales y climáticas (Hutchison, 1982;

Markwick, 1998; Brochu, 2003; Bronzati *et al.*, 2015; Mannion *et al.*, 2015; De Celis *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2021).

Sudamérica alberga la mayor diversidad de especies de cocodrilianos. En este subcontinente habita un tercio del total de especies existentes de estos animales (Eaton, 2010; Hekkala *et al.*, 2011; Shirley *et al.*, 2018). En la República Argentina se encuentran: *Caiman yacare* (yacaré negro) y *Caiman latirostris* (yacaré overo). Las poblaciones de yacaré overo abarcan el centro norte del país, estando presente en Misiones, Salta, Santiago del Estero, Jujuy, Chaco, Corrientes, Formosa, Entre Ríos y Santa Fe (Waller y Minucci, 1993; Larriera e Imhof, 2006) (Figura 4B), debiéndose su distribución meridional a la mayor tolerancia de esta especie a bajas temperaturas (Siroski, 2011). La situación geográfica de yacaré overo también incluye un gran número de pequeños drenajes de la costa atlántica desde Natal, en el extremo oriental de Brasil, hasta el noreste de Uruguay (Siroski *et al.*, 2019) (Figura 4A).

Esta especie de cocodriliano suele habitar ambientes con vegetación densa y asolearse sobre vegetación flotante (Siroski *et al.*, 2019). Se encuentra en ambientes acuáticos de escasa profundidad, en clima subtropical-templado y abundante alimento. Las mayores poblaciones de *C. latirostris* se localizan en grandes esteros asociados a las planicies de inundación de los ríos de llanura, como el río Paraná, el Uruguay y el Salado, aunque una fracción de las poblaciones suele permanecer cerca de los canales o cavas de erosión hídrica dentro del bosque y alejados de los espejos de aguas permanentes (Verdade *et al.*, 2010).

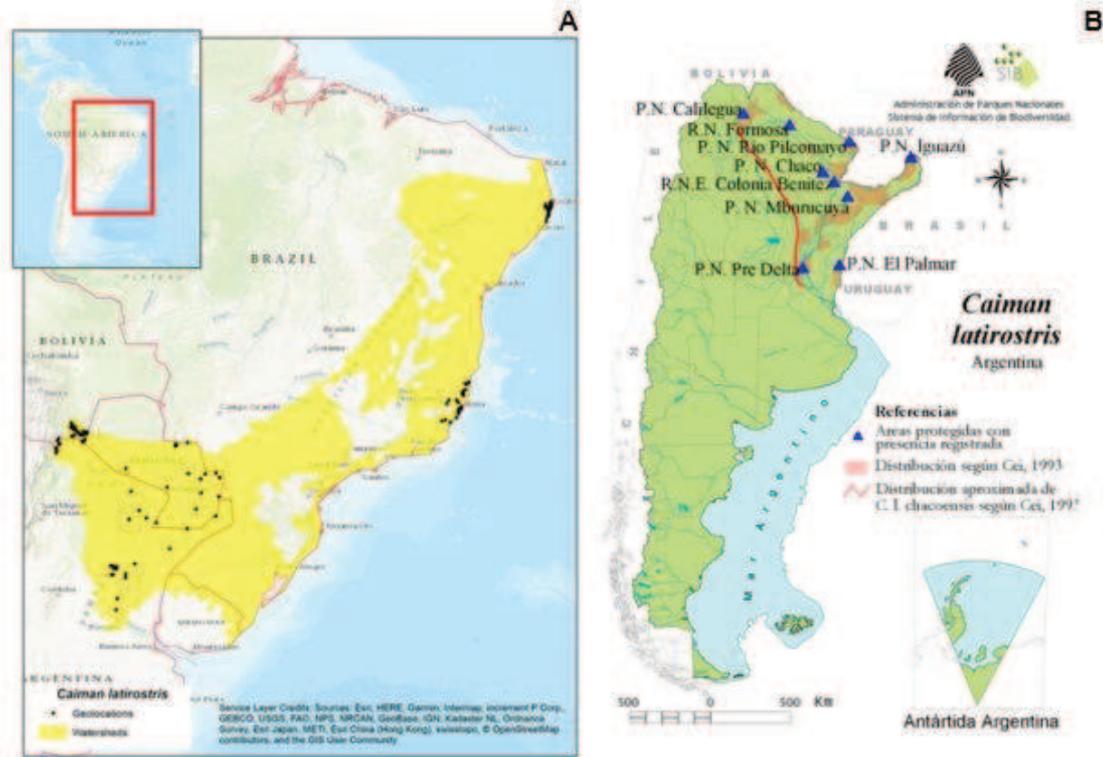


Figura 4. Distribución de *C. latirostris* en **A.** Sudamérica, rango Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay (Fuente: Siroski *et al.*, 2019). **B.** Distribución en Argentina. (Fuente: Sistema de Información de Biodiversidad de la Administración de Parques Nacionales, Argentina (SIB). Actualizado en marzo, 2025).

Ectotermia

Los cocodrilianos son importantes organismos modelo en campos como la biología del desarrollo, osmorregulación, cardiofisiología, paleoclimatología, determinación del sexo, genética de poblaciones, paleobiogeografía y morfología funcional (Grigg y Kirshner, 2015).

Los cocodrilianos son animales ectotermos, por lo que su regulación térmica depende directamente de las condiciones ambientales, ya que carecen de mecanismos fisiológicos para controlar el calor corporal (Coulson y Herbert, 1981; Webb y Manolis, 1989; Richardson *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2010). En consecuencia, procesos vitales como la función inmune, la alimentación, el metabolismo y la reproducción están modulados por la temperatura interna, la cual se ajusta mediante conductas como exponerse al sol o sumergirse en el agua, manteniéndose generalmente entre 25 y 35 °C (Angilletta *et al.*, 2001; Lance, 2003; Bassetti *et al.*, 2014).

La temperatura es una variable ambiental que tiene un papel fundamental en la historia de vida de los cocodrilianos debido a que interviene en la

determinación del sexo (Ferguson y Joanen, 1983; Webb *et al.*, 1987; Campos, 1993; Piña *et al.*, 2003), el crecimiento embrionario (Joanen *et al.*, 1987; Iugman *et al.*, 2008) y el patrón de termorregulación (Lang, 1987; Merchant *et al.*, 2007). En la regulación de la temperatura intervienen directamente el estado nutricional, la edad, las infecciones y las relaciones sociales (Lang, 1985). Dicha regulación de la temperatura corporal juega un rol muy importante asegurando que los procesos celulares y bioquímicos puedan llevarse a cabo con una tasa metabólica muy cercana a la óptima para cada especie (Feder *et al.*, 2000; Siroski *et al.*, 2010; 2011).

Hay indicios de que la temperatura, la tasa metabólica, los factores ambientales y las adaptaciones evolutivas influyen en la función inmunitaria de los organismos ectotermos. El efecto de la temperatura ambiental sobre la inmunidad específica ha sido demostrado (Rijkers *et al.*, 1980; Miller y Clem, 1984) como también, que la inmunidad innata es más resistente a cambios en la temperatura ambiental (Le Morvan *et al.*, 1998). Le Morvan *et al.*, (1997) indicaron que la inmunidad innata tiende a reemplazar a la inmunidad específica a bajas temperaturas. Sin embargo, existen otros estudios donde se demuestra que el efecto de la temperatura ambiental es del mismo orden sobre ambas (Nikoskelainen *et al.*, 2004).

Sistema Inmune

El sistema inmune (SI) de los vertebrados está constituido por barreras físicas y bioquímicas, células inmunitarias especializadas y anticuerpos específicos (Haryanto *et al.*, 2015; Maggini *et al.*, 2018).

Hace aproximadamente 500 Ma con la aparición de los vertebrados y en un contexto de una inmunidad innata (II) preexistente ocurrieron distintos procesos evolutivos que condujeron al origen de la inmunidad adaptativa (IA). En consecuencia, ambas inmunidades funcionan tanto individualmente como en tándem (Hillion *et al.*, 2019). La II actúa rápidamente y no requiere de exposición previa al patógeno para formar una respuesta, debido a que es no específica. En contraste, la IA requiere exposición previa, es muy específica y puede tardar 48 horas o más en generar una respuesta (Baker *et al.*, 2019; Haapasalo y Meri, 2019).

El principal mecanismo efector de la II es el sistema del complemento (SC), (Haapasalo y Meri, 2019). Aparte de defensa el SC presenta funciones, tales como: opsonización, fagocitosis, reclutamiento quimiotáctico de leucocitos, inflamación y expresión de citoquinas proinflamatorias (Ricklin *et al.*, 2010).

La activación de la cascada del SC puede ocurrir a partir de tres vías distintas: clásica, de lectinas y/o alternativa (Figura 5). La diferencia entre las 3 vías son los mecanismos de activación y las etapas iniciales, posteriormente ellas se fusionan en un paso de amplificación común que conduce a la formación de un complejo de ataque de membrana multiproteico denominado convertasa de C3 con el fin de activar al componente central del SC: el componente 3 (C3) (Muller-Eberhard, 1986; Wang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016).

Vía clásica (VC): Es anticuerpo-dependiente, generalmente iniciada por IgM o IgG. También puede ser activada por la molécula de reconocimiento de patrones (MRP) C1q mediante el reconocimiento de estructuras microbianas y apoptóticas, o MRP endógenas como inmunoglobulinas y pentraxinas (Ricklin *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2019).

Vía de las lectinas (VL): Activada por patógenos o autoestructuras alteradas, mediante la detección de carbohidratos característicos de superficies bacterianas o compuestos acetilados. Las MRP reconocidas incluyen la lectina de unión a la manosa (LUM), Ficolina-1, 2 y 3, y colectina 11 (CL-11 o CL-K1) (Kozarcanin *et al.*, 2016).

Vía alternativa (VA): Se inicia con la unión covalente del C3 a grupos hidroxilo o amina de moléculas de superficie de patógenos. Es constitutivamente activa debido a la activación espontánea de C3 en plasma a través del mecanismo «tick-over». La activación de C3 genera los fragmentos C3a (con efectos anafilotóxicos) y C3b, que se asocia al factor B (FB) formando la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bB), activada por el corte proteolítico del factor D (FD) (Corvillo y López, 2017).

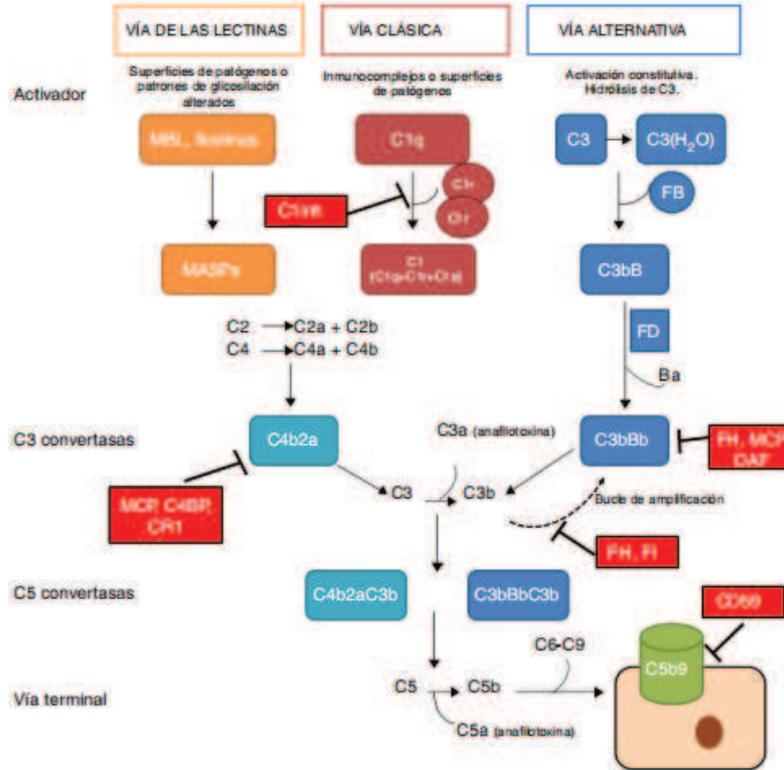


Figura 5. Vías de activación del SC. La activación por alguna de las tres vías genera una convertasa de C3 que eventualmente lleva a la formación del complejo de ataque a la membrana, lisando las células diana (Fuente: Corvillo y López, 2017).

La molécula madura del C3, consiste en dos cadenas de polipéptidos: una cadena beta y una cadena alfa, que se encuentran unidas mediante puentes de cisteína (Figura 6) (Chen *et al.*, 2016). Posee 13 dominios, ocho de los dominios se denominan dominios de macroglobulina (MG). La cadena beta está compuesta por seis dominios MG en tándem: MG1 a MG6^B seguidos de una región enlazadora (LNK). La cadena alfa comienza con el dominio anafilatoxina (ANA), la mitad C-terminal del MG6, el dominio MG7, seguido de un dominio CUB y, a continuación, el dominio tioéster (TED). A la región TED le sigue otro dominio CUB, MG8, una corta región de anclaje y, finalmente, el dominio C345C C-terminal (Blandin y Levashina, 2004; Budd *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2005; 2006).

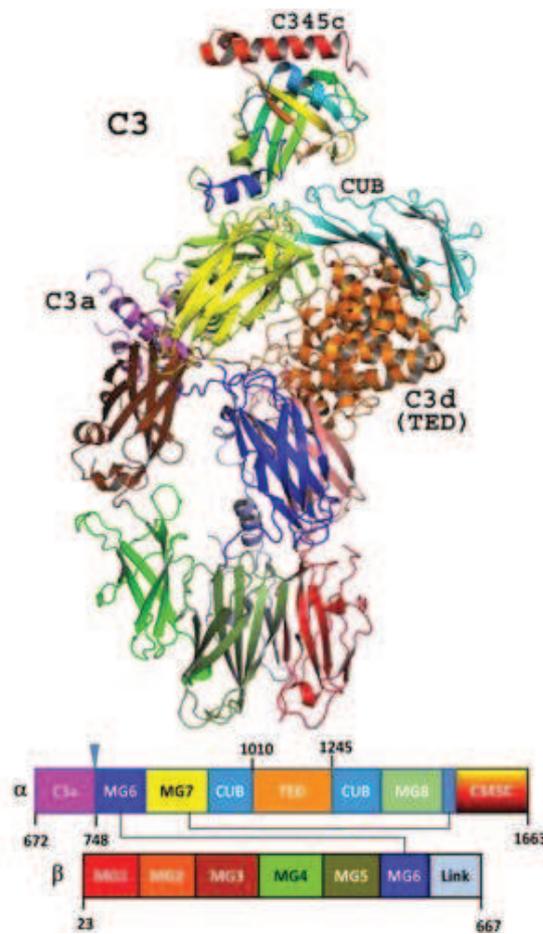


Figura 6. Diagrama de cinta de la estructura cristalina de C3 (PDB ID: 2A73) y representación esquemática de las cadenas alfa y beta del componente del complemento C3 (Fuente: Barnum, 2017).

Las funciones del C3 incluyen opsonización y fagocitosis de patógenos/células apoptóticas, eliminación de complejos inmunes y quimiotaxis. Es una proteína antigua y clave del SC, integrándose en la biología más allá de la defensa del huésped y escindiéndose en múltiples fragmentos biológicamente activos (Chen *et al.*, 2016; Barnum, 2017).

El Factor del Veneno de la Cobra (FVC) es una proteína homóloga al C3, encontrada en algunas serpientes de la familia Elapidae (Birdsey *et al.*, 1971; Eggertsen *et al.*, 1981; Takahashi y Hayashi, 1982). Facilita la entrada de toxinas del veneno en el torrente sanguíneo, activando el complemento y liberando anafilatoxinas C3a y C5a en el lugar de la mordedura (Vogel y Fritzing, 2017). Su homología funcional con el C3 ha permitido el desarrollo de proteínas quiméricas recombinantes con fines terapéuticos para inhibir el SC en enfermedades mediadas por este (Hew *et al.*, 2004; Vogel y Fritzing, 2007; Fritzing *et al.*, 2009; Vogel y Fritzing, 2010; Vogel *et al.*, 2014).

Recientemente, se descubrió una proteína homóloga al C3 y FVC en cocodrilianos, lo que sugiere la presencia de componentes del veneno de serpiente en reptiles no venenosos y requiere nuevos estudios sobre su expresión y funcionalidad (Cordero *et al.*, 2023).

Sistema Inmune y los cocodrilianos

El sistema inmune de los cocodrilianos se compone de partes innatas y adquiridas, al igual que todos los vertebrados con mandíbulas. Sin embargo, a diferencia de otros vertebrados que sufrieron una gran diversificación, como los mamíferos, los escamosos y las aves, las especies de cocodrilianos existentes han mantenido similitudes morfológicas y ecológicas (Grigg y Kirshner, 2015), esto también se observa a nivel de la evolución del cariotipo (Cohen y Gans, 1970), e incluso en su sistema inmunitario, en las citocinas expresadas (Zimmerman *et al.*, 2014) y la organización del tejido linfoide (Neely y Flajnik, 2016), y aunque estudios recientes en reptiles han establecido que sus sistemas inmunitarios tienden a tener los mismos componentes generales que los mamíferos (Tabla 1) (Zimmerman, 2020), es probable que las diferencias que existen den lugar a estrategias inmunitarias novedosas.

Tabla 1. Comparación de los sistemas inmunitarios de mamíferos y reptiles.¹Zimmerman *et al.*, (2014), ²Baker *et al.*, (2019), ³Shaffer *et al.*, (2013), ⁴Zimmerman *et al.*, (2010), ⁵Rakus *et al.*, (2017), ⁶Sandmeier *et al.*, (2018), ⁷Hoffman *et al.*, (2016), ⁸Attias *et al.*, (2019). (Tabla modificada de Zimmerman, 2020).

Componente	Mamíferos	Reptiles
General		
Endotermo/Ectotermo	Endotermo	Ectotermo
Amniota	+	+
Citoquinas (ejemplos)¹		
IL-1 β	+	+
TNF- α	+	+
IL-5	+	-
Linfotoxina- α	+	-
Complemento²		
Vía clásica	+	+
Vía alternativa	+	+
Vía de las lectinas	+	+
Receptores tipo Toll (ejemplos)³		
TLR4	+	+
TLR15	-	+
Leucocitos⁴		
Macrófagos	+	+
Eosinófilos	+	+
Basófilos	+	+
Heterófilos/Neutrófilos	Neutrófilos	Heterófilos
Fiebre⁵	Fisiológica	Comportamental
Órganos linfoides primarios⁴		
Timo	+	+
Medula ósea	+	+
Órganos linfoides secundarios⁴		
Bazo	+	+
Placas de Peyer	+	-
Tejido linfoide asociado al intestino	+	+
Nódulo linfático	+	-
Células B		
Células B-1 ⁶	+	Similar B-1
Células B-2 ⁷	+	?
Otras células B (ejemplo: reguladoras) ⁷	+	?
Células T		
Células T citotóxicas ⁴	+	+
Linfocitos T colaboradores ⁴	+	+
Otros subconjuntos de células T (ejemplo: reguladoras) ⁸	+	?
Anticuerpos⁴		
Anticuerpos naturales	+	+
Cambio de Isotipo	+	+
Maduración por afinidad	+	-
Centros germinales	+	-
Isotipos de cadena ligera	K, λ	K, λ
Isotipos de cadena pesada	IgA, IgO, IgE, IgG, IgM	IgA, IgD, IgM, Igy, Δ IgY

Estudios sobre las variaciones en los genes dentro de las familias de receptores de reconocimiento de patrones sugieren que los órdenes semiacuáticos se han enfrentado a fuerzas evolutivas diferentes en comparación con los órdenes terrestres, ya que se encuentran con patógenos de tierra y de agua (Priyam *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2018). En cocodrilianos en particular, existen dos comportamientos muy conservados que ocurren en el ámbito acuático y terrestre y que influyen directamente sobre el sistema inmune de estos, ya sea para generar inmunidad o para desafiarla, estos son: la exposición al sol y las disputas sociales intra e interespecie.

La luz solar proporciona la cantidad y calidad adecuadas de radiación ultravioleta (UV) para que los organismos desarrollen procesos vitales (Siroski y Moleon Barzani, 2020). Los cocodrilianos, al ser vertebrados ectotermos, son modelos oportunos para estudiar cómo la influencia de la temperatura ambiental, y en consecuencia la luz solar, modulan la respuesta inmunitaria (Pxytycz y Zkowitz, 1994; Kubasova *et al.*, 1995) incluida la formación de anticuerpos y la expresión de citoquinas (Klesius, 1990; Zhang *et al.*, 2015). En reptiles se ha observado que los tejidos linfoides sufren cambios específicos (según la especie) durante las estaciones (Zimmerman *et al.*, 2010), presentando una respuesta inmunitaria menos robusta durante el invierno (Hussein *et al.*, 1978; Hussein *et al.*, 1979; Ridi *et al.*, 1981; Zimmerman *et al.*, 2010), haciéndolas susceptibles a sufrir infecciones (Ladds *et al.*, 1996; Ariel *et al.*, 1997). Contrariamente, a medida que la temperatura aumenta, el bazo vuelve a desarrollarse y el timo vuelve a agrandarse y organizarse (Hussein *et al.*, 1978; Hussein *et al.*, 1979; Ridi *et al.*, 1981).

Los tejidos linfoides de los cocodrilianos, además del timo, están formados por el bazo, la médula ósea y el tejido linfoide asociado al intestino, estos carecen de centros germinales y ganglios linfáticos (Solas y Zapata, 1980; Zimmerman *et al.*, 2010). Al igual que en la mayoría de los vertebrados, el timo y la médula ósea funcionan como tejidos primarios en los cocodrilianos, a partir de los cuales las células maduras se dispersan e interactúan con los patógenos en los tejidos periféricos (Scollay *et al.*, 1980).

Las células sanguíneas de los cocodrilianos (y de todos los reptiles) presentan sutiles diferencias en comparación a las de los mamíferos. Los cocodrilianos tienen glóbulos rojos nucleados; tres tipos de granulocitos: eosinófilos, basófilos y heterófilos (Figura 7). El heterófilo es similar al neutrófilo de los mamíferos en que normalmente es el glóbulo blanco circulante más abundante. Ocasionalmente, pueden observarse monocitos. Los reptiles también tienen la misma variedad de linfocitos. Sin embargo, los linfocitos B de los reptiles son fagocíticos (Zimmerman *et al.*, 2010). En cocodrilianos, la respuesta inicial a los inmunógenos es más lenta, y en las exposiciones posteriores no se observan aumentos considerables de títulos de anticuerpos, ni en la afinidad de unión a estos. Además, la respuesta inmunitaria humoral adaptativa es

menos robusta que en los mamíferos (Zimmerman *et al.*, 2010) pero no menos eficaz.

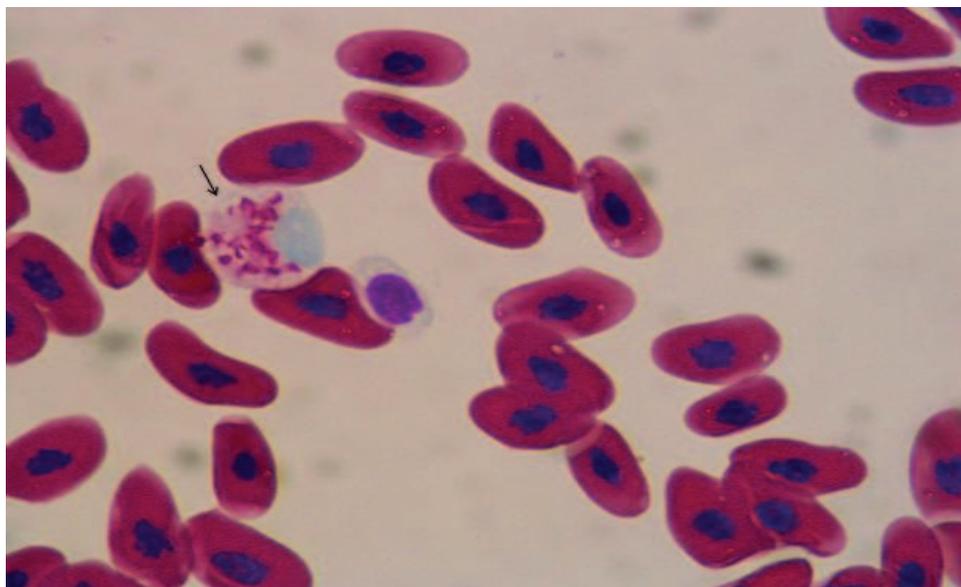


Figura 7. Microfotografía de células sanguíneas de cocodrilianos. Se evidencia señalado por una flecha un heterófilo de *C. latirostris* (60X) (Fuente: Moleón, 2019).

En cocodrilianos con frecuencia se observa la pérdida de miembros corporales como consecuencia de disputas sociales por altas densidades, obtención de alimento, sitios de nidificación, reproducción, presencia de predadores, entre otros. Estas peleas ocurren en ecosistemas que poseen gran abundancia y diversidad de bacterias patógenas, trayendo como consecuencia que la combinación de los factores mencionados predisponga al desarrollo de infecciones localizadas o sistémicas que pudiesen causarles la muerte, sin embargo, en muchos casos los cocodrilianos suelen sobreponerse sin demostrar signos de enfermedad, por lo que es probable que estos sean resistentes a las infecciones bacterianas (Huchzermeyer, 2003; Ikenaga *et al.*, 2010; Siroski, 2012) y poseer un sistema inmunitario robusto (Zimmerman *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que existen varios componentes eficaces del sistema inmunitario innato de los cocodrilianos, entre los que se encuentra un sistema de complemento sérico filogenéticamente conservado que funciona junto con la respuesta inmunitaria adaptativa sirviendo como un importante mediador

inflamatorio de las interacciones antígeno-anticuerpo (Zarkadis *et al.*, 2001; Merchant *et al.*, 2003; Mastellos *et al.*, 2004). También se encuentran, los péptidos antimicrobianos los cuales han mostrado actividades antimicrobianas y antifúngicas (Van Hoek, 2014) y, a los que se han atribuido las propiedades antimicrobianas de los cocodrilianos (Shaharabany *et al.*, 1999). Se cree que estos péptidos estimulan la respuesta inmunitaria frente a los microbios invasores mediante la activación y los leucocitos a través de la interacción con los receptores de quimiocinas y formilpéptidos (Siddiqui *et al.*, 2022).

Péptidos de Defensa del Huésped (PDHs)

También conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs), los PDHs se consideran miembros ancestrales del sistema inmune innato de casi todos los organismos vivos, ya que constituyen la primera línea de defensa (Zasloff, 2002) ante agentes extraños. Poseen un amplio espectro de organismos diana que van desde virus a parásitos y, consisten en fragmentos proteicos de unas pocas docenas de aminoácidos ($\approx 33,26$ residuos) (Huan *et al.*, 2020).

El primer PDH de origen animal, reportado en 1956 es la defensina, esta se aisló de leucocitos de conejo (Hirsch, 1956). En los años siguientes se describieron la bombinina de los epitelios (Kiss y Michl, 1962) y la lactoferrina de la leche de vaca (Groves *et al.*, 1965). Actualmente, un total de 3940 PDHs han sido reportados en la base de datos de péptidos antimicrobianos (APD, URL: <https://aps.unmc.edu/AP/>), de los cuales 2463 tienen origen animal (Figura 8) y que surgen debido al desarrollo de farmacorresistencia de cepas bacterianas incluso a más de tres clases diferentes de antimicrobianos (multirresistencia, MDR). Además, en los últimos años se ha reducido la producción de nuevos agentes antimicrobianos debido a factores, tales como: bajo costo de cada dosis individual, corto periodo de tratamiento, posible desarrollo de mecanismos de resistencia y permanencia incierta en el mercado (De Oliveira *et al.*, 2020).

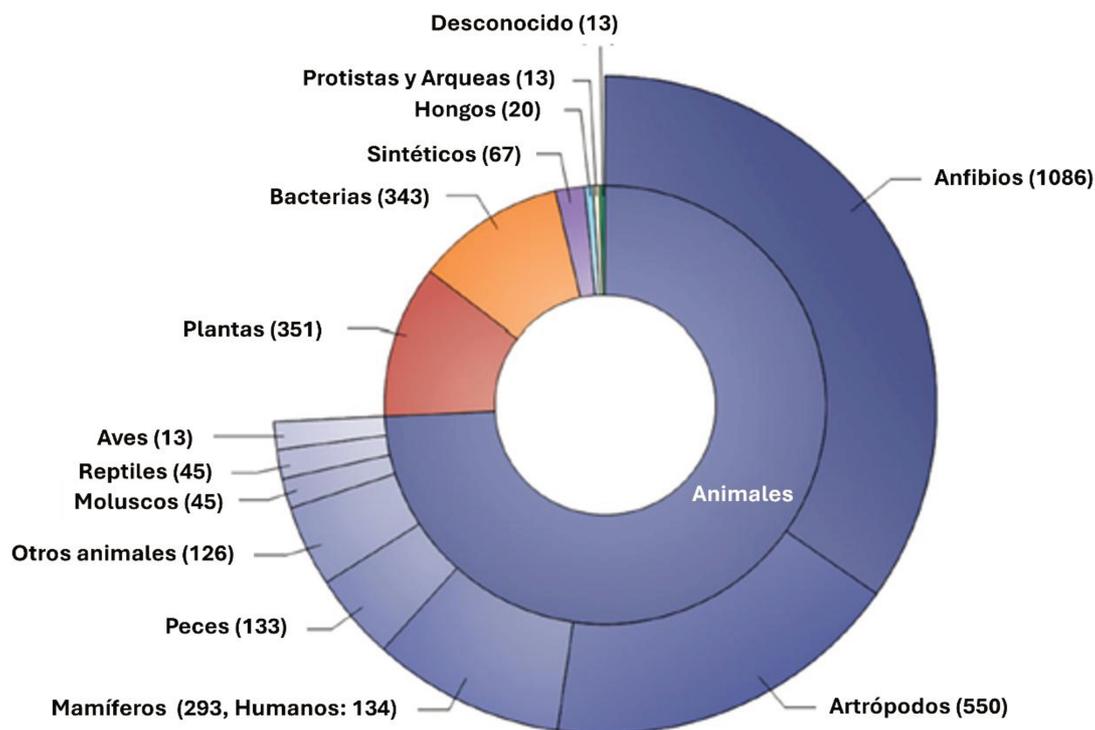


Figura 8. PDHs registrados en la base de datos de péptidos antimicrobianos, donde se reflejan sus diversas fuentes de origen (APD; <http://aps.unmc.edu/AP>, consultada en 2019) (Modificada de Mahlapuu *et al.*, 2020).

Características de los PDHs

A pesar de tener una gran diversidad, comparten algunas características comunes, entre las que se encuentran carga catiónica (+1 a +7), secuencias cortas (<50 residuos de aminoácidos) y suelen ser anfifílicos (Lee *et al.*, 2016; de la Fuente-Núñez *et al.*, 2017). La carga positiva neta resulta de la abundancia de residuos de arginina, lisina e histidina debido a las cargas positivas asociadas con estos residuos (Clark *et al.*, 2021). La presencia de ~50% de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos contribuye a la anfifilia de estos péptidos, lo que les permite interactuar con las membranas bacterianas e ingresar en las células (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2017). Estos péptidos pueden plegarse en diferentes estructuras, incluidas hélices alfa, láminas beta, hélices alfa y láminas beta combinadas y estructuras no alfa-beta (Wang, 2022), proporcionando una base para predecir y comprender sus mecanismos de acción (Gesell *et al.*, 1997; Wang, 2008; Comune *et al.*, 2021).

Contra la invasión de patógenos, la producción de PDHs por las células del huésped requiere menos tiempo y energía que la síntesis de anticuerpos por

la inmunidad adquirida, pudiendo alcanzar el objetivo más rápidamente que las inmunoglobulinas (Zhang *et al.*, 2021). Además, los PDHs poseen un papel fundamental en las respuestas inmunes del huésped contra las infecciones bacterianas en algunos reptiles; el reclutamiento de células inmunes (como neutrófilos, monocitos y macrófagos) puede ser más importante que la actividad antimicrobiana directa de los PDHs en la eliminación de infecciones bacterianas en reptiles. Esta capacidad de reclutamiento de células inmunitarias ha sido demostrada por Chen *et al.*, (2017) y Cai *et al.*, (2018).

Clasificación de los PDHs

Aunque los péptidos se clasifican en categorías como defensinas, catelicidinas, hepcidinas, entre otros, puede resultar difícil encontrar la similitud entre los péptidos activos dentro de estas categorías. Esto se debe a que comparten función, estructura y mecanismos dentro de los grupos, pero a menudo tienen secuencias muy diferentes. Es decir, tienen una conservación estructural significativa a menudo sin una conservación de secuencia (Jenssen *et al.*, 2006; Van Hoek, 2016).

Tal como se mencionó anteriormente, el primer PDH de origen animal del que se tiene constancia es la defensina (Hirsch, 1956). Estos péptidos catiónicos de 3-4 kDa se caracterizan por tener seis cisteínas dispuestas en tres enlaces disulfuro, tienen características predominantemente hoja-beta con algunas alfa-hélices (Wilson *et al.*, 2009). Un péptido similar a la defensina es la familia de la toxina crotamina aislada de las serpientes cascabel (Género: *Crotalus*), estas poseen un motivo gamma similar a las defensinas y se consideran péptidos penetrantes de membrana (Kerkis *et al.*, 2010; Rádis Baptista y Kerkis, 2011). Se sabe que algunos reptiles expresan péptidos similares a las crotaminas (Van Hoek, 2014).

Las catelicidinas son la segunda clase importante de PDHs en eucariotas superiores. Se caracterizan por derivar de la escisión proteolítica de un prepeptido que contiene el dominio "catelina" conservado en mamíferos y menos conservado en otros eucariotas (Lehrer y Ganz, 2002; Kościuczuk *et al.*, 2012). Existe una única catelicidina en humanos (LL37), monos rhesus, ratones, ratas y cobayas (Nagaoka *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 2001; Dürr *et al.*,

2006), mientras que se han descrito al menos siete catelicidinas en bovinos, caballos, cerdos, ovejas y cabras (Dürr *et al.*, 2006).

Otros péptidos son los expresados en el hígado, incluyendo: hepcidinas (HAMP1) y LEAP-2 (péptido antimicrobiano expresado en el hígado-2) (Van Hoek, 2014). Las hepcidinas, contienen ocho cisteínas (con cuatro enlaces disulfuro) y son ampliamente antimicrobianas, se unen al hierro y participan en la unión de ferroportina (Park *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2014). LEAP-2 se expresa en muchos organismos diferentes, tiene actividad antibacteriana y antifúngica de amplio espectro y puede inducirse tras un desafío bacteriano (Sang *et al.*, 2006; Henriques *et al.*, 2010; Hocquellet *et al.*, 2010). A pesar de HAMP1 y LEAP-2 son expresados en el hígado, el último difiere significativamente de HAMP1 en secuencia y estructura (Krause *et al.*, 2003). Se han descrito otros PDHs inusuales en reptiles, como leucrocinas, omwaprina y hemocidinas. Estos no se clasifican fácilmente en las categorías anteriores, pero tienen un potencial que debe investigarse más a fondo (Van Hoek, 2014), considerando sus eficientes actividades antimicrobianas (Lei *et al.*, 2019), rápida (Raheem y Straus, 2019), de amplio espectro (Park *et al.*, 2011; Amso y Hayouka, 2019; Lee *et al.*, 2020; Mahlapuu *et al.*, 2020; Pirtskhalava *et al.*, 2021) baja toxicidad (Peschel y Sahl, 2006; Rathinakumar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015) y no interfiere en la microbiota al ejercer su acción (Kim *et al.*, 2020).

Debido a que los PDHs presentan una diversidad considerable en cuanto a sus fuentes (naturales/sintéticas), mecanismos de acción, características estructurales y fisicoquímicas, y áreas de interés terapéutico, realizar una clasificación de estos suele ser difícil. Sin embargo, pueden ser clasificados en función de su origen, actividad, características estructurales y riqueza en aminoácidos (Huan *et al.*, 2020; Mahlapuu *et al.*, 2020). De acuerdo con su actividad los PDHs pueden dividirse en 18 categorías según la APD. Estas categorías pueden resumirse en péptidos antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, antiparasitarios, contra el virus la inmunodeficiencia humana (VIH) y antitumorales (Figura 9).

Péptidos antibacterianos

Estos representan una gran parte de los PDHs (algunas catelicidinas, defensinas, hepcidinas) y tienen un amplio efecto inhibitorio sobre bacterias patógenas comunes, tales como: Enterococos, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* común y resistente a la meticilina, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* en alimentos, Salmonella y, *Vibrio parahaemolyticus* en productos acuáticos (Huan *et al.*, 2020).

Péptidos antifúngicos (PAFs)

Los péptidos antifúngicos actúan contra las infecciones fúngicas con mayor resistencia a los fármacos. Muchos PAFs han demostrado una excelente actividad antifúngica contra hongos patógenos comunes, como *Aspergillus* y *Candida albicans* en medicina clínica, levaduras, hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus flavus*), moho en alimentación y agricultura (Huan *et al.*, 2020).

Péptidos antivirales (PAVs)

Este tipo de péptido muestra un efecto letal sobre los virus principalmente mediante (1) la inhibición de la adhesión del virus y la fusión de la membrana celular del virus, (2) la destrucción de la envoltura del virus, o (3) la inhibición de la replicación del virus (Jung *et al.*, 2019).

Péptidos antiparasitarios

Los péptidos antiparasitarios muestran su efecto letal sobre los parásitos que causan enfermedades como la malaria y la leishmaniasis (Mangoni *et al.*, 2005; Rhaïem y Houïmel, 2016) y PDH como catelicidinas, temporinas muestran una alta actividad de inhibición contra parásitos (Abbassi *et al.*, 2013).

Péptidos anticancerígenos (PACs)

Los ACP muestran mecanismos anticancerígenos mediante (1) el reclutamiento de células inmunitarias (como las células dendríticas) para eliminar las células tumorales, (2) la inducción de la necrosis o apoptosis de las células cancerosas, (3) la inhibición de la angiogénesis para eliminar la nutrición tumoral y prevenir la metástasis, y (4) la activación de ciertas

proteínas funcionales reguladoras para interferir en la transcripción y traducción de genes de las células tumorales (Wu *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2020).

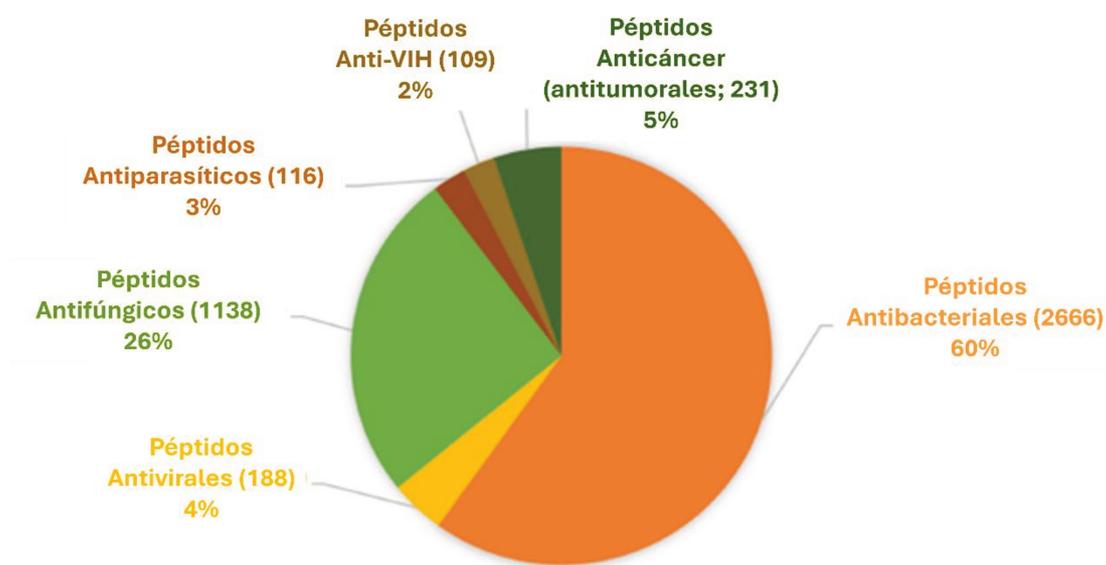


Figura 9. Principales funciones de PDHs. Los péptidos antibacterianos representan la mayor proporción, aproximadamente el 60%, seguidos de los péptidos antifúngicos, que representan el 26%. Los péptidos antivirales, antiparasitarios, anticancerígenos y contra el VIH representan aproximadamente el 2-5% (Modificado de Huan *et al.*, 2020).

Mecanismos de acción de los PDHs

La actividad novedosa de los PDH se debe principalmente a su naturaleza catiónica, ya que les permite interactuar con las membranas de bacterias u hongos, que están cargadas negativamente y poseen lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico (Hancock y Sahl, 2006; Bechinger y Gorr, 2017; Belloti y Remelli, 2021). La farmacodinámica de los PDH es compleja porque sus efectos varían según parámetros, como la concentración de péptidos, la localización en los tejidos, el patógeno objetivo, la fase de crecimiento y el entorno local. En consecuencia, la forma de ejercer su acción puede ser dirigida directamente a la membrana del microorganismo (Figura 10) o ingresando al agente extraño por penetración directa o endocitosis y ejerciendo diversos mecanismos que afecten la actividad de este (Mahlapuu *et al.*, 2020).

Mecanismos de orientación a membrana

-Modelo tipo alfombra: Los PDHs están dispuestos paralelamente a la membrana celular. Su extremo hidrófilo mira hacia la solución y su extremo hidrófobo mira hacia la bicapa de fosfolípidos, de esta manera cubrirán la superficie de la membrana de manera similar a una alfombra y destruirán la membrana celular de una manera similar a un "detergente". Sin embargo, este mecanismo de formación de poros requiere un cierto umbral de concentración y la concentración requerida de PDH es alta (Oren y Shai, 1998).

-Modelo de duelas de barril: Los PDHs se agregan entre sí, penetran en la bicapa de la membrana celular en forma de multímeros y forman canales que conducen a la salida citoplasmática (Lohner y Prossnigg, 2009).

-Modelo de poro toroidal: En este modelo, los PDHs incrustados verticalmente en la membrana celular se acumulan y luego se doblan para formar un orificio anular con un diámetro de 1 a 2 nm (Matsuzaki *et al.*, 1995, 1996), comprometiendo la barrera de la membrana al crear dominios fluidos (Omardien *et al.*, 2018).

Debido a la composición diferencial de las membranas de bacterias, hongos y mamíferos, estos mecanismos de direccionamiento a la membrana pueden ser optimizados y así mejorar los efectos ejercidos por estos (Huan *et al.*, 2020).

Mecanismos de no-focalización en la membrana

-Inhibición de la biosíntesis de proteínas: Los PDHs afectan la transcripción, la traducción y el ensamblaje a través del plegamiento de chaperonas moleculares al interferir con enzimas relacionadas y moléculas efectoras. Las chaperonas son proteínas clave para plegar y ensamblar correctamente las proteínas recién sintetizadas y su estereoisomería (Huan *et al.*, 2020).

-Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos: Los PDHs pueden afectar enzimas clave o inducir la degradación de moléculas para inhibir la biosíntesis de ácido nucleico (Huan *et al.*, 2020).

-Inhibición de la actividad de la proteasa: Muchos PDHs pueden inhibir diversas actividades metabólicas al inhibir la actividad de las proteasas bacterianas (Huan *et al.*, 2020).

-Inhibición de la división celular: Los PDHs inhiben la división celular al inhibir la replicación del ADN y la respuesta al daño del ADN (respuesta SOS),

bloqueando el ciclo celular o provocando el fallo de la separación cromosómica (Lutkenhaus, 1990).

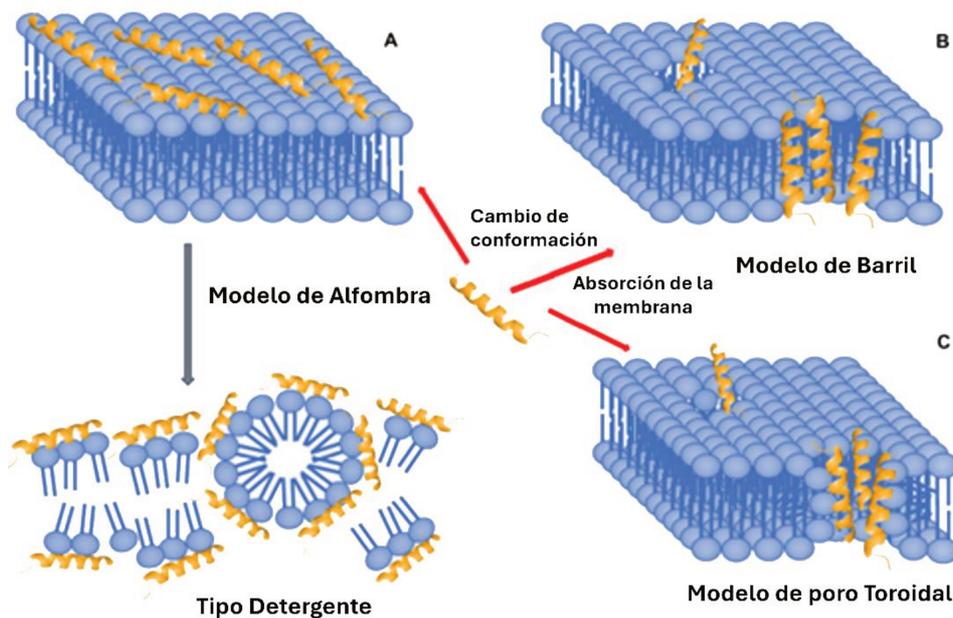


Figura 10. Mecanismos de acción de PDHs focalizados en la membrana bacteriana (Modificado de Huan *et al.*, 2020).

PDHs en cocodrilianos

En cocodrilianos se han estudiado en menor medida aspectos evolutivos y estructurales de los PDHs, si se compara con el extenso número de investigaciones realizadas en anfibios y serpientes. A pesar de que en diversas investigaciones se resalta el sistema inmune de estos y la capacidad de reconocimiento de amplio espectro de microorganismos y patógenos que poseen. En la mayoría de los organismos los genes del sistema inmunitario suelen ser los que evolucionan más rápidamente en el genoma; debido a la coevolución de los hospedadores y sus patógenos (Chakraborty *et al.*, 2022). Esto se refleja en algunos PDHs reportados, de los cuales pueden existir paralogías. La duplicación de genes de PDHs podría deberse a la relajación de las restricciones sobre los genes duplicados, favoreciendo la neofuncionalización y la diversificación sin ser restringidos a retener las funciones originales para permitir la adaptación a conjuntos de patógenos (Tenessen, 2005; Peschel y Sahl, 2006; Mylonakis *et al.*, 2016).

Hasta la fecha se han descrito algunos PDHs de cocodrilidos (Tabla 2), los más estudiados en estos animales han sido las catelicidinas, que serán descritas con mayor detalle en próximos capítulos y, las defensinas. Sin embargo, se ha informado de la presencia de hepcidinas, leucrocinas, lisozimas y otros compuestos que pueden considerarse potenciales PDHs.

Las defensinas, han sido reportadas no sólo en la familia Alligatoridae sino también en la familia Crocodylidae, específicamente en *C. porosus*. Santana *et al.*, (2021) identificaron cinco nuevas variantes de beta-defensinas de cocodrilianos de *A. mississippiensis* (Am2HR, Am11R, Am17RV, Am23SK) y *C. porosus* (Cp13QK). Los péptidos lineales se sintetizaron, plegaron, purificaron y evaluaron por su actividad antimicrobiana y antibiofilm contra patógenos bacterianos relevantes para la biología de los cocodrilos y la salud humana: *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*. La variante Am23SK mostró una prometedora actividad contra células planctónicas y biofilm de bacterias, superando a la beta-defensina 3 humana en las condiciones experimentales. Además, Am23SK no mostró citotoxicidad frente a células de mamíferos y ejerció efectos inmunomoduladores *in vitro*.

La beta-defensina 13 de *C. porosus* (CpoBD13) fue descrita por Williams *et al.*, (2023). CpoBD13 presentó una potente actividad antifúngica dependiente del pH del medio. Se dirige a la membrana y es más eficaz en un entorno ácido. Esto se debe al uso de residuos de histidina para el enganche del ácido fosfolípido fosfatídico, lo que permite a CpoBD13 mostrar una actividad diferencial en un rango de valores de pH ambiental. CpoBD13 muestra una actividad membranolítica dependiente del pH, lo que indica que los reptiles pueden regular la actividad de la defensina a través de un mecanismo natural de "interruptor de histidina". Esto significa que los residuos de histidina pueden cargarse para activar o desactivar la actividad antifúngica en función del pH ambiental.

En *A. sinensis* Tang *et al.*, (2018) informaron de 20 nuevos genes de beta-defensina (AsBDs) (Tabla 2) y distinguieron seis ortólogos en aves y nueve AsBDs parálogos que sufrieron eventos de duplicación génica. La alineación de aminoácidos muestra que los AsBD parálogos, al igual que las alfa-defensinas, codifican un fragmento crítico en la secreción más largo en

comparación con los ortólogos y experimentan una presión selectiva significativamente mayor que los ortólogos, pero una fuerza evolutiva similar a la de las alfa-defensinas.

Los científicos han explorado y notificado la diversidad de PDHs expresados en *C. siamensis* en busca de nuevas estructuras y funciones. Por ejemplo, la presencia en el extracto de leucocitos de cocodrilo de una proteína similar a la lisozima (Pata *et al.*, 2007); el compuesto Crocosin que no contiene aminoácidos (Preecharram *et al.*, 2010); los péptidos activos en fragmentos de la cadena de globina alfa y beta (Srihongthong *et al.*, 2012; Anwised *et al.*, 2013); las proteínas P50 y P80 del extracto de proteína hepática parcialmente purificada (Anwised *et al.*, 2022), entre otros.

En el caso de las hepcidinas en *C. siamensis* (Cshepc), Hao *et al.*, (2012) examinaron su actividad antibacteriana, y se obtuvo que pudo inhibir significativamente el crecimiento de las bacterias Gram negativas *E. coli* y *Aeromonas sobria*, así como las bacterias Gram positivas *S. aureus*, y *Bacillus subtilis in vitro*, lo que sugiere que Cshepc, al igual que la hepcidina humana podría desempeñar un papel en la función antibacteriana en la respuesta inmune innata de los huéspedes.

En otra investigación, se purificaron extractos de glóbulos blancos de *C. siamensis* y se obtuvieron las leucocinas I-IV (Pata *et al.*, 2011), las cuales mostraron una potente actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, dirigida a las membranas externa y citoplasmática. También se probó el efecto hemolítico frente a glóbulos rojos humanos. Las leucocinas I, III y IV mostraron menos toxicidad contra los glóbulos rojos humanos que la leucocina II. Las leucocinas I y II no mostraron homología con ningún péptido antimicrobiano en las bases de datos, lo que indica que son nuevos péptidos antimicrobianos.

Tabla 2. Clases, secuencias aminoacídicas y propiedades fisicoquímicas de PDHs reportados en cocodrilianos (Modificado de Cordero *et al.*, 2024).

	Clase PDH	Péptido	Secuencia	Peso molecular (Da)	Hidrofobicidad (H, %, Kcal ^o mol ⁻¹)	Carga neta	Actividad
<i>A. sinensis</i>	Beta defensiva	AsBD105α	HCKRNDNSCRHTPCPEERIGWCLSTHVCCKALL	4208.94	28.56 (Kcal ^o mol ⁻¹)	+8	Antimicrobiano
		AsBD105β	HCKEKERTGLCTVNVVYVCL	2327.78	20.99	+4	
		AsBD105γ	KCGRKEHVGTCPKGLICRRL	2428.03	17.18	+8	
		AsBD105δ	RCLRNEHTIGSCSSNHA CCKRH	2512.84	26.65	+5	
		AsBD106α	CSSNEVMAGKCYGSLVCCVPR	2270.65	21.65	+2	
		AsBD106β	CUSEVMAGKCYGSLVCCVPR	2281.76	28.45	+2	
		AsBD107α	FCFGGEVKLGSFCALRPCKCKELPGL	2675.24	24.93	+4	
		AsBD107γ	CTGHEVMMGKCYGTFCVVRM	2337.85	36.11	+3	
		AsBD107β	FCFRGEVKLGSCTFLHPCKKELLG	2688.23	29.64	+1	
		AsBD13	LCFHGERWIGNCGHQHCCK	2399.73	37.23	+4	
		AsBD12	TCLSGEVRIGDCTFVILCKCKYLARKTTGELGGGA	3832.52	35.87	+3	
		AsBD101	DCEAGEEQIGTCYRQTMVCCRDEE	2789.01	50.65	-4	
		AsBD102	VSLCDGITIRLLGNCSSSH	2094.46	12.28	0	
		AsBD104	GSCRPGSWPVRCPYRTVCCRRR	2622.14	33.74	+6	
		AsBD10	TCPTFEASGTCHNALLCCKVPGV	2593	24.42	+2	
		AsBD5	SCRPOFVSFGTCTRECMCIRRTD	2966.46	25.59	+6	
		AsBD8	ICPPNTKYGSKQLGNCQQRV	2425.88	29.92	+5	
		AsBD14	LCPIFMAIGTCYDGAACKCRRCI	2637.27	21.59	+4	
AsBD108	TLCHSLEKYVGRCHHGLRNCCVDDYVLYKYM	3685.33	36.55	+3			
<i>A. mississippiensis</i>	Beta defensiva	Am2HR	HCKRNDNSCRHTPCPEERIGWCLSTHVCCK	3820.48	-0.78	+4.9	Antimicrobiano Antibiofilm
		Am11RR	RCKRGLFCRPGKQKHEVGTCPKGLICCR	3391.17	-0.36	+6.8	
		Am17RV	RCNLLNGVCRHTLCHSLEKYGRCHHGLRNCCV	3828.55	-0.22	+5.0	
		Am23SK	SCRFSGGYIWNVERCRSGHFLVALCPFRKRCCK	4070.82	-0.21	+5.8	
<i>C. porosus</i>	Beta defensiva	Cp13QK	QCRRNHGHCRRLLCFHGEQWGNCGNRHQHCCK	3833.32	-1.32	+4.1	Antifúngico
	Beta defensiva13	Cp0BD13	SYYSTLQCRNHHGHCRRLLCFHGEQWGNCGNRHQHCCK	4548.09	26.21 (Kcal ^o mol ⁻¹)	+2.7	
<i>A. mississippiensis</i>	Catelicidina	AM-CATH36	GLFKLRRKIKKGFKIFKRLPPIGVVSIPLAGKR	4058.14	0.314	+13	Antimicrobiano
		AM-CATH28	KIKKGFKIFKRLPPIGVVSIPLAGKR	3076.90	0.340	+9	
		AM-CATH21	GLFKLRRKIKKGFKIFKRL	2633.37	0.149	+11	
<i>A. sinensis</i>	Catelicidina	As-CATH1	RRSGWVNGHKRRRGGSGSRHGQYSSTKYGG RKRPRKPGSGSWLSHDTPHVAPIAKGHVYG	6630.4	0.037	+14	Antimicrobiano Antibiofilm Antiinflamatorio
		As-CATH2	RRSGWVNGHKRRRGGSGSRHGQYSSTKYGG GGRKGHERIA	4334.8	-0.058	+11	
		As-CATH3	PAKPKPRPGKLSFSLHLAGSDGKPRCHYP	3535.2	0.281	+5	
		As-CATH4	RRLGFKLRRKIKKGFKIFKRLPPIGVVSIPLAGRR	4402.5	0.228	+15	
		As-CATH5	TRRKFWKVLNGLAKIAPFLG	2257.2	0.485	+6	
		As-CATH6	TRWVLLRGLLKAAGWIRAHLRNNO	3044.6	0.458	+5	
<i>C. siamensis</i>	Catelicidina	RN15	RNCTWLFSTKLKLP	1778.14	46 %	+3	Antimicrobiano Antibiofilm
As-CATH7		KRVNWRKVRNTALGASYVLSFLG	2693	-0.15	+4.76		
As-CATH8		KRVNWRKVRNTALGASYVLSFLG	2431	0.06	+4.76		
AsBD108		TLCHSLEKYVGRCHHGLRNCCVDDYVLYKYM	3685.33	36.55	+3		
Gg-CATH5		TRRKFWKVLNGLAKIAPFLG	2670	-0.39	+4.76		
Gg-CATH7		KRVNWRKVRNTALGASYVLSFLG	2308	-0.11	+3.76		
<i>C. siamensis</i>	Hepcidina	Cshepc	FNSHFPICSYCCNCRNKGCGLCRT	2933.46	27.76 (Kcal ^o mol ⁻¹)	+1.3	Antimicrobiano
	Leucrocina	I	NGVQPKY	806.99	11 %	+1	
	Hemocidina	II	NAGSLLSGVG	956.3	40 %	+0	
		Alfa1	VLSDDKCNVAVWCKVAG	2022.37	52 %	+1	
		Alfa2	VLSDDKCNVAVWCKVAG	1377.58	46 %	0	
		Alfa3	KVAGHLEEYGA	1173.29	36 %	0	
		Beta4	WHKVDVAH	991.12	50 %	+2	
		Alfa5	HEAVNH	705.73	33 %	+1	
		Beta6	ASFGEAVKHLDS	1260.37	41 %	0	
		Beta7	ASFGEAVKHLDSIR	1529.72	42 %	+1	
		Alfa8	VVAIHHPGSLTPEV	1554.81	46 %	+1	
		Alfa9	VVAIHHPGSLTPEVHAS	1850.11	44 %	+2	
		Alfa10	VVAIHHPGSLTPEVHASLDF	2353.71	45 %	+2	
		Alfa11	AIHHPGSLTPEVHA	1465.63	35 %	+2	
Alfa12	AIHHPGSLTPEVHASLDFL	2169.47	40 %	+2			
Beta13	AAHYPKDFGL	1118.26	40 %	+1			

Alternativas computacionales en el diseño, desarrollo y modificación de PDHs. Definición y ejemplos en cocodrilianos

La implementación de enfoques computacionales para desarrollar compuestos racionales y novedosos con actividad antimicrobiana mejorada también se ha aplicado en las investigaciones de PDHs en cocodrilianos. Han surgido diversas estrategias basadas en machine learning (ML) para diseñar nuevos PDHs y modificar los ya existentes. El ML emplea modelos o algoritmos capaces de clasificar información procedente de bases de datos y predecir la estructura y la actividad de estos péptidos, a partir de rasgos tanto a nivel de aminoácido como de péptido. En este último caso, los rasgos considerados incluyen aspectos relacionados con la secuencia y con la estructura (El Naqa y Murphy, 2015; Aronica *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022).

Los modelos de predicción para los PDHs incluyen k-nearest neighbor, support vector machine, redes neuronales artificiales, random forest y otros algoritmos. Estos modelos pueden entrenarse utilizando características como la composición de aminoácidos, la longitud, el peso molecular, la carga y la hidrofobicidad (Aronica *et al.*, 2021).

Como se ha mencionado anteriormente, ML se aplica no sólo para predecir secuencias de PDHs, sino también para predecir la estructura tridimensional de éstos (Figura 11). La técnica de codificación de la estructura general puede aplicarse a la predicción de PDHs, ya que proporciona información de la estructura del péptido completo, convirtiendo estos datos en una representación numérica y finalmente describe la estructura del péptido mediante la forma tridimensional basada en su potencial electrostático (Spänig y Heider, 2019; Sowers *et al.*, 2023). La estructura del péptido ayuda a identificar descriptores, que incluyen la anfipicidad, carga neta y longitud. Estos descriptores ayudan a definir clasificadores y se utilizan para clasificar los péptidos en función de su eficacia (Torres *et al.*, 2021), además esta predicción es una herramienta útil para comprender la unión de moléculas a los PDHs, que desempeña un papel importante en el descubrimiento de fármacos (El Naqa y Murphy, 2015; Aronica *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022; Sowers *et al.*, 2023).

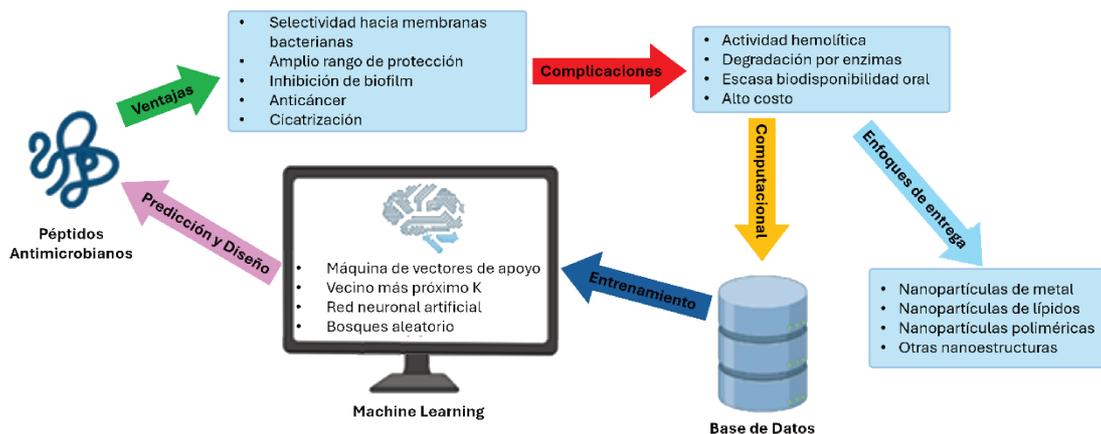


Figura 11. Esquema general de las ventajas de los PDHs y diferentes enfoques para mejorar los retos asociados a las aplicaciones terapéuticas. ML ha demostrado ser un enfoque prometedor para utilizar modelos de predicción y diseño de PDHs con menos complicaciones terapéuticas. Las bases de datos ayudan a entrenar modelos de ML para mejorar los métodos de predicción de PDHs (Modificado de Sowers *et al.*, 2023).

Se ha llevado a cabo el diseño y la modificación de péptidos, incluyendo catelicidinas y leucrocinas en algunas especies de cocodrilianos; en *C. siamensis* Tankrathok *et al.*, (2019) identificaron el primer gen de la catelicidina y el péptido RN15 derivado del dominio de la catelina en esta especie, que presenta actividad antibacteriana. Posteriormente, para mejorar su potencia, el péptido antibacteriano fue modificado. La secuencia de aminoácidos del péptido nativo fue sustituida por lisina y triptófano. Como resultado, el péptido RN15m4 expresa actividad antimicrobiana contra la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos; el ensayo de tiempo de muerte muestra que RN15m4 elimina en menor tiempo las bacterias comparado al péptido nativo, con una baja actividad hemolítica y citotóxica. El estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró la destrucción de la membrana celular bacteriana causada por el péptido (Jangpromma *et al.*, 2023).

Otro estudio en *C. siamensis* realizado por Sosiangdi *et al.*, (2023) aisló un péptido del hidrolizado de hemoglobina: QL17, que demostró tener actividad antimicrobiana. En QL17, algunos aminoácidos fueron reemplazados por lisina y triptófano. Además, se hicieron modificaciones para: controlar su mecanismo de acción a través de la disrupción de la membrana bacteriana; mejorar su actividad antimicrobiana; y asegurar que tuviera baja citotoxicidad contra células eucariotas. Las variantes se denominaron IL15. De este modo, IL15.3

resultó ser un potente agente antimicrobiano y mostró una excelente selectividad frente a bacterias. A través de SEM se confirmó que IL15.3 actúa contra las bacterias alterando la integridad de la membrana celular y penetrando en ella. Además, la IL15.3 también puede interactuar con el ADN, lo que sugiere que podría tener un doble modo de acción

A partir del péptido antibacteriano natural Leucrocina I (Pata *et al.*, 2011) obtenido de glóbulos blancos de *C. siamensis* se derivaron los péptidos KT2 y RT2 (Anunthawan *et al.*, 2013). Estos se diseñaron mediante sustituciones de lisina, triptófano o arginina para mejorar sus propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas. También se realizó la amidación en el extremo C-terminal de la leucrocina I. Los péptidos resultantes mostraron la capacidad de eliminar bacterias con un amplio espectro, así como de inhibir la formación de biopelículas (Anunthawan *et al.*, 2015). Finalmente, se informó de que los péptidos KT2 y RT2 pueden inhibir las células de cáncer de cuello uterino HeLa y CaSki (Theansungnoen *et al.*, 2016) y provocar la supresión, proliferación o migración de las células de cáncer de colon humano HCT-116 (Maijaroen *et al.*, 2018).

Otro péptido diseñado y sintetizado a partir de la secuencia de Leucrocina I de *C. siamensis* fue NY15. Se añadieron aminoácidos hidrófobos (Alanina)⁴, (Leucina)⁶, (Fenilalanina)⁷, (Valina)⁸, (Fenilalanina)¹¹ a la parte central de la secuencia de Leucrocina I para construir un dominio rico más hidrofóbico. Además, para aumentar la carga positiva en la estructura de los péptidos, se añadió lisina (K) a los extremos N y C-terminal (dominio hidrofílico lisina) (K², K³, K¹³) de esta secuencia. La síntesis de NY15 se realizó a partir de todos los L-NY15 (L-aminoácidos) y todos los D-NY15 (D-aminoácidos). Los resultados mostraron que el péptido elaborado a partir de todos los D-aminoácidos fue más activo que el correspondiente L-enantiómero, la membrana era la diana de acción de los péptidos y, tanto el L-NY15 como el D-NY15 no eran tóxicos para las células de mamíferos a concentraciones bacteriolíticas (Yaraksa *et al.*, 2014).

Las investigaciones mencionadas anteriormente en la cuales se realizó la predicción, obtención, modificación y optimización de péptidos resaltan la importancia de las herramientas bioinformáticas durante la ejecución de todos estos procesos. A continuación, se describen algunas herramientas

disponibles y de fácil acceso que son indispensables en el estudio de péptidos. La APD (URL: <http://aps.unmc.edu/AP/>), ahora APD3 (Wang *et al.*, 2015), se utiliza para calcular las propiedades fisicoquímicas, predecir la potencia antimicrobiana y el diseño de péptidos. Otro recurso, es la Base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos (DBAASP) (URL: <https://dbaasp.org/home>) que se ha creado para proporcionar a los usuarios información detallada sobre péptidos probados experimentalmente en cuanto a su estructura química y actividad contra dianas específicas (Pirtskhalava *et al.*, 2021).

Para las representaciones helicoidales de péptidos, son útiles el programa EmbossPepwheel(<https://emboss.sourceforge.net/apps/release/6.6/emboss/apps/pepwheel.html>) y el servidor web HeliQuest (URL: <https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (Gautier *et al.*, 2008). Existen numerosas herramientas disponibles para predecir la estructura tridimensional de un péptido. El servidor PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/#Usage>) (Thevenet *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2014) tiene un alto grado de precisión, ya que su última evolución mejora el rendimiento para péptidos lineales de hasta 36 aminoácidos. También se encuentra disponible AlphaFold, el cual es un sistema de inteligencia artificial desarrollado por Google DeepMind que predice la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos que incluso alcanza regularmente una precisión que compite con los experimentos (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2024).

Por último, para estudiar el posicionamiento del péptido en cualquier membrana, el servidor PPM3 (URL: https://opm.phar.umich.edu/ppm_server) (Lomize *et al.*, 2012; Lomize *et al.*, 2022) ofrece la funcionalidad de posicionar proteínas en membranas curvas o planas, simples o múltiples, ya que funciona con 17 tipos de membranas biológicas y 4 tipos de bicapas artificiales. Además, puede definir las regiones incrustadas en lípidos de una proteína que abarca simultáneamente varias membranas o determinar la posición óptima de un péptido en una micela esférica.

Es evidente que la atención no sólo se centra en encontrar nuevos PDHs, sino también en modificarlos y hallar configuraciones óptimas que incrementen la susceptibilidad de las bacterias, lo que convierte al proceso en más específico

y eficaz en el tiempo, el coste y otros recursos de producción. Sin embargo, todavía existen retos en el diseño computacional de péptidos antimicrobianos, como el desarrollo de avances en los predictores de hemólisis y toxicidad de los péptidos y la precisión de la predicción de la actividad antimicrobiana mediante algoritmos.

Hasta el momento, Plisson *et al.*, (2020) desarrollaron modelos para predecir la actividad hemolítica, que predijeron que el 30% de los PDHs no eran hemolíticos, donde el 91% de las predicciones se consideraron fiables. Estos modelos de aprendizaje automático proporcionaron información sobre secuencias de PDHs no hemolíticos, lo que puede ayudar a los investigadores a desarrollar PDHs con efectos tóxicos mínimos. Junto con otras técnicas como la ingeniería de péptidos, las formulaciones y la nanotecnología, los investigadores pueden identificar nuevos PDHs con propiedades y biodisponibilidad mejoradas para futuras aplicaciones (Lai *et al.*, 2022). Timmons y Hewage, (2020) elaboraron un novedoso clasificador de red neuronal artificial para la predicción de la actividad hemolítica a partir de la secuencia primaria de un péptido. El clasificador logra el mejor rendimiento de su clase, con una precisión validada cruzada del 85,7%. Está disponible y es de uso gratuito como servidor web en <https://research.timmons.eu/happenn>.

También, mediante ML el diseño racional de los PDHs ha logrado reducir la longitud aminoacídica de los péptidos, pero manteniendo sus propiedades antimicrobianas (Deslouches *et al.*, 2013). Del mismo modo, a medida que se acumulan datos en las bases de datos, los algoritmos de ML se encuentran continuamente realizando ensamblajes en una cadena de predicción de secuencias para superar problemas como la degradación de los PDHs por enzimas, la escasa biodisponibilidad oral y la actividad hemolítica (Wang *et al.*, 2015).

Para los futuros PDHs, es importante adoptar un diseño impulsado por la función y establecer una conexión entre los tópicos de estructura y evolución para obtener una comprensión global de ambos aspectos. Por ejemplo, estudios recientes han relacionado PDHs con proteínas (IDPs) y regiones (IDRs) intrínsecamente desordenadas, las cuales se caracterizan por carecer de una estructura tridimensional definida, son generalmente más extendidas y exhiben un comportamiento dinámico extremo (Tompa, 2005; Van Der Lee *et*

al., 2014). Recientemente, Latendorf *et al.*, (2019) reportaron que cualquier péptido catiónico lineal que contenga un alto porcentaje de aminoácidos promotores del desorden y un bajo porcentaje de aminoácidos promotores del orden podría considerarse antimicrobiano. Informes similares se hicieron para defensinas (Mattar *et al.*, 2016), NK-lisinas (Yacoub *et al.*, 2017) y catelicidinas (Yacoub *et al.*, 2016), estos destacan que el desorden intrínseco es importante para la funcionalidad de los PDHs. La base de datos MobiDB (URL: <https://mobidb.org/>) ofrece respuestas a preguntas sobre la relación entre IDPs y PDHs. Esta base de datos agrega anotaciones de desorden derivadas de la literatura y de pruebas experimentales junto con predicciones para todas las secuencias de proteínas conocidas. Además, genera nuevos conocimientos y capta el significado funcional de las regiones desordenadas procesando y combinando fuentes complementarias de información (Piovesan *et al.*, 2023). En consecuencia, la hipótesis de esta investigación está basada en que las catelicidinas del yacaré overo (*Caiman latirostris*) poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro, por lo que pueden ser aplicadas terapéuticamente dentro de medicina veterinaria. Dicha hipótesis se corroboró a través de los siguientes objetivos de investigación:

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar aspectos estructurales y funcionales de las catelicidinas del yacaré overo, *Caiman latirostris*.

Objetivos específicos

- Identificar similitudes y diferencias entre las catelicidinas obtenidas del genoma de *Caiman latirostris* y el de otras especies para deducir relaciones estructurales y evolutivas.
- Obtener por síntesis química las catelicidinas identificadas en *Caiman latirostris*.
- Detectar las diferentes actividades antimicrobianas de las catelicidinas.
- Realizar inferencias sobre el uso de la información recolectada para el desarrollo de elementos terapéuticos con posibilidad de utilización en medicina veterinaria.

CAPÍTULO 1. FACTOR DE VENENO DE COCODRILIANOS



1.1 Introducción

Las toxinas son principalmente péptidos y/o proteínas codificadas por genes que evolucionaron a partir de moléculas ancestrales que desempeñan funciones no relacionadas con la producción de veneno en el organismo (Casewell *et al.*, 2013). Se considera que los genes que codifican péptidos, proteínas y toxinas evolucionan rápidamente bajo selección darwiniana positiva, potenciadas por una redundancia genética generada a través de eventos de duplicación génica; en consecuencia, los taxones venenosos han evolucionado múltiples veces durante la evolución de los metazoos (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013; Sunagar y Moran, 2015).

Otros estudios sugieren que la evolución de toxinas y genes similares a toxinas (TTL) está determinada por la selección purificadora en linajes venenosos antiguos como cnidarios, coleoideos y artrópodos (Pineda *et al.*, 2014; Jouiaei *et al.*, 2015). Por el contrario, los análisis de los genomas del ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) y las avispa parásitas (*Nasonia vitripennis*, *Trichomalopsis sarcophagae*) mostraron en estos linajes que la cooptación de genes de una sola copia es el proceso dominante que da forma a la evolución de las toxinas (Wong *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2017). Otros autores propusieron que los procesos que contribuyen a la evolución de las toxinas venenosas en la mosca *Dasygogon diadema*, son multimodales e incluyen (i) cooptación dependiente de la expresión de genes de mantenimiento, (ii) neofuncionalización después de eventos de duplicación de genes, y (iii) genes huérfanos específicos de linaje altamente expresados (Drukewitz *et al.*, 2019). Más recientemente, un análisis comparativo a gran escala de la distribución de la familia de genes TTL en múltiples genomas de metazoos reveló la presencia de múltiples genes TTL en todos los linajes investigados, incluidos los conocidos como no venenosos. Estos linajes no venenosos, sin embargo, tienen menos genes TTL en comparación con los linajes venenosos (Surm *et al.*, 2019). Además, gran parte de la diversidad de familias de genes TTL observada en Metazoa es específica de cada linaje (43%, 29 de 68 familias de genes) y está asociada con orígenes independientes de taxones venenosos (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013).

El factor venenoso (FV) es un componente inusual del veneno de algunas serpientes pertenecientes a la familia Elapidae (Birdsey *et al.*, 1971; Eggertsen

et al., 1981; Takahashi y Hayashi, 1982). Dado que el FV fue descrito por primera vez en diferentes especies de cobra, inicialmente se conoce como factor de veneno de la cobra (*Naja sp.*) (FVC). Este componente no es tóxico, sino que es una proteína que se encuentra en el veneno de la serpiente que facilita la entrada de los elementos tóxicos del veneno en el torrente sanguíneo, induciendo la activación del complemento en el lugar de la envenenación al escindir C3 y C5, liberando localmente las anafilatoxinas C3a y C5a altamente activas (Krishnan *et al.*, 2009; Vogel y Fritzing, 2017).

Estructuralmente, el FV es una glicoproteína de 149 kDa, compuesta por tres cadenas: cadena alfa (68,5 kDa), cadena beta (48,5 kDa) y cadena lambda (32,0 kDa), las cuales se encuentran unidas por enlaces disulfúricos. Esta última cadena puede exhibir heterogeneidad de tamaño en su extremo C-terminal (Vogel y Fritzing, 2010). La estructura secundaria consta de un 11% de alfa-hélice, un 47% de beta-hojas, un 18% de beta-vueltas y un 20% restante. Además, tiene una estructura elipsoidal irregular y alargada con unas dimensiones de 137 Å por 82 Å y, - 7,4% (p/p) de contenido en carbohidratos (Vogel *et al.*, 1996).

La actividad anticomplemento del FV se describió por primera vez a partir del FVC en 1903 (Flexner y Noguchi, 1902). Durante varios años, los esfuerzos de investigación sobre el FV se centraron en describir el efecto anafilotóxico así como su actividad anticomplemento (Friedberger *et al.*, 1913; Vogt y Schmidt, 1964; Müller-Eberhard *et al.*, 1966; Ballou y Cochrane, 1969; Müller-Eberhard y Fjellström, 1971). Finalmente, se propuso que el FVC puede activar el sistema del complemento de los mamíferos porque es un homólogo funcional del componente del sistema del complemento: C3b, un fragmento activado de C3 (Krishnan *et al.*, 2009). Tanto el C3b como el FVC comparten el propósito común de activar el sistema del complemento e incluso comparten los primeros pasos para desencadenar ese propósito. Al igual que el C3b, el FVC se une al factor B del suero en presencia de Mg²⁺. El complejo resultante es una convertasa C3 de baja actividad (Xu *et al.*, 2001), pero la división posterior del factor B da lugar a la CVFBb, una eficiente convertasa C3 que tiene como objetivo el mismo enlace de C3 que las auténticas convertasas del sistema del complemento. Esto es posible porque el FVC y el C3b tienen el dominio

proteico CUB, necesario para la formación de convertasas (Krishnan *et al.*, 2009; Vogel y Fritzing, 2017).

La glicoproteína FV se ha aislado de diferentes especies de Elapidae mostrando estructuras y actividades similares (Eggertsen *et al.*, 1980; Tanaka *et al.*, 2012; Tambourgi y Van den Berg, 2014). Hasta ahora, se ha informado de la presencia del FVC y complemento C3 en cobras (Eggertsen *et al.*, 1981; Vogel *et al.*, 1996). Asimismo, en la serpiente de cabeza de cobre de las tierras bajas (*Austrelaps superbis*) se encontraron dos isoformas de proteínas similares al FVC (AVF-1, AVF-2) y dos isoformas del complemento C3 (AsC3-1, AsC3-2). Esas cuatro isoformas encontradas en *A. superbis* están estrechamente relacionadas, con más de un 96% de similitud de aminoácidos entre las regiones codificantes (Rehana y Kini, 2007).

En cocodrilianos, no se ha informado de la presencia de FV. Sin embargo, al igual que en *A. superbis*, Merchant *et al.*, (2016) informaron de diferentes isoformas C3 codificadas por dos genes del complemento C3 (C3-1, C3-2) en los genomas de *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus porosus* y *Gavialis gangeticus*. Las secuencias de aminoácidos derivadas de las dos proteínas del complemento C3 de las especies de cocodrilianos mencionados mostraron 69% de identidad (Merchant *et al.*, 2016).

La duplicación de genes seguida de la neofuncionalización o subfuncionalización de una de las copias, dando lugar a una nueva función génica (Drukewitz *et al.*, 2019), ha sido una importante fuente evolutiva en eucariotas durante décadas. Algunas investigaciones sugieren que pudo ser fundamental para el éxito de la radiación en los organismos verdaderos (Zhou *et al.*, 2010) que implicó la presencia de una copia extra de un gen que permitió el desarrollo de nuevas funciones sin restricciones funcionales (Malhotra, 2017). El FV puede ser un excelente ejemplo de cómo la evolución ha modificado un gen preexistente (C3) en un potente componente del veneno (FV), aprovechando el sistema del complemento de la presa en beneficio del depredador (Vogel y Fritzing, 2017).

Considerando lo expuesto en los párrafos anteriores, la pregunta que surge es la siguiente: ¿es posible que los cocodrilos posean este componente no tóxico del veneno que sólo poseen algunas serpientes? Para responder esta incógnita e identificar el FV en los cocodrilianos, se amplificaron muestras de

ADN de *C. latirostris* y se estudiaron las relaciones filogenéticas entre el FV y las secuencias del gen del complemento C3 de algunos cocodrilidos junto con las secuencias de los genes: FVC, AVF-1, AVF-2 y del complemento C3 de algunas serpientes Elapidae.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Secuenciación génica

Mediante un estudio bioinformático sobre la caracterización del complemento C3 de *C. latirostris*, basado en un BLAST-n realizado entre la secuencia del complemento C3 de *A. mississippiensis* y el genoma completo de *C. latirostris* (CoGe; <https://genomevolution.org/coge/>), se obtuvieron secuencias que corresponden al FV en cocodrilos según la base de datos Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Para confirmar la presencia de FV en el genoma de *C. latirostris*, se diseñaron dos pares de cebadores específicos (Tabla 3) para amplificar el fragmento del FV en muestras de ADN de la mencionada especie. Para el diseño, se utilizó el software Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012) basado en una secuencia de *C. latirostris* con un 100% de identidad respecto al FV de *A. mississippiensis* (XM_014610875.2).

Tabla 3. Cebadores específicos utilizados para amplificar el FV de *C. latirostris*.

Nombre del Cebador	Secuencia 5'-3'
VF7-F	GCAAACAACCTTCCCTCTGCCT
VF7-R	CACGTACCACAACCTTCAGC
VF10-F	GCATTTTTCTCAGGTCCGAT
VF10-R	CGTACCACAACCTTCAGCTCT

Se amplificaron siete muestras de ADN de *C. latirostris* utilizando los cebadores específicos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de:

- 25 µl con 1X tampón estándar
- 2,5 µl de cada cebador (0,1 nM/µl)
- 1 µl de MgCl 50 mM

- 2,5 µl de mezcla de dNTP (200 mM)
- 0,10 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen®)
- 50 ng de ADN
- En cada serie de reacciones de PCR se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Bioer Life Express® de 96 pocillos, con 30 ciclos incluyendo paso de desnaturalización de 1 min a 94 °C, paso de recalentamiento de 1 min a 63 °C (para VF7) y 58 °C (para VF10), y paso de extensión a 72 °C de 2 min en cada ciclo iterativo. Además, se utilizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% y, a continuación, se purificaron y secuenciaron (Applied Biosystems, Macrogen Inc., Corea).

La confirmación de que se aisló correctamente el FV en cocodrílidos se realizó comparando las secuencias obtenidas de la secuenciación con las secuencias disponibles en Genbank utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, (1990)).

1.2.2 Análisis filogenéticos

Las secuencias del FV y el complemento C3 de *Caiman yacare*, *C. latirostris*, *Crocodylus niloticus*, *C. porosus* y *Crocodylus siamensis* se obtuvieron de la base de datos Comparative Genomics (CoGe; <https://genomeevolution.org/cogel/>). Las secuencias pertenecientes al FV/FVC y complemento C3 de *Chelonia mydas*, *Chelonoidis abingdonii*, *Chrysemys picta bellii*, *Dermochelys coriacea*, *Gopherus evgoodei*, *Mauremys reevesii*, *Terrapene carolina triunguis*, *Anolis carolinensis*, *Gekko japonicus*, *Alligator sinensis*, *A. mississippiensis*, *Ophiophagus hannah*, *Naja naja*, *Naja kaouthia* y *A. superbus* (Tabla 4) se obtuvieron de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabla 4. Secuencias de GenBank incluidas en los análisis filogenéticos.

Especies	Identificador de secuencia FV/FVC	Identificador de secuencia complemento C3
<i>Chelonia mydas</i>	XM_037888109.1	XM_037888055.2
<i>Chelonoidis abingdonii</i>	XM_032790562.1	XM_032783234.1
<i>Chrysemys picta bellii</i>	XM_005310165.3	XM_008174762.3
<i>Dermochelys coriacea</i>	XM_038379131.2	XM_038378509.2
<i>Gopherus evgoodei</i>	XP_030403321.1	XM_030547452.1
<i>Mauremys reevesii</i>	XM_039514221.1	XM_039514933.1
<i>Terrapene carolina triunguis</i>	XM_026660649.1	XM_029913718.1
<i>Anolis carolinensis</i>	XM_003216808.3	XM_003216747.3
<i>Gekko japonicus</i>	XP_015278269.1	XP_015281276.1
<i>Alligator sinensis</i>	XM_025203981.1	XM_006023345.3
<i>Alligator mississippiensis</i>	XM_014610875.2	XM_006265601.3
<i>Ophiophagus hannah</i>	JQ418342.1	ETE59418.1
<i>Naja naja</i>	CQ985772.1	L02365.1
<i>Naja kaouthia</i>	U09969.2	AY588977.1
<i>Austrelaps superbus</i>	AY903291.1, DQ110889.1	DQ149984.1, DQ149985.1

Todas las secuencias estudiadas se alinearon mediante MAFFT (Kato *et al.*, 2019) y se visualizaron y editaron mediante MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Las secuencias del FV y complemento C3 se analizaron por separado utilizando haplotipos únicos de especies de cocodrilos, serpientes, tortugas y lagartos.

En primer lugar, se analizaron las siete secuencias de *C. latirostris* obtenidas por secuenciación (CI1_7, CI2_7, CI3_7, CI1_10, CI2_10, CI3_10, CI4_10) junto con las secuencias similares al FV de *A. mississippiensis* y *A. sinensis*, utilizando *Pterocles gutturalis* como grupo externo (XM_010081900.1). A continuación, se analizaron las secuencias del FV obtenidas del Genbank junto con las secuencias del FV de *C. latirostris* y *C. yacare* obtenidas de sus genomas mediante métodos bioinformáticos, utilizando el mismo grupo externo que en el análisis anterior.

Utilizando el procedimiento anteriormente descrito, se realizó el análisis filogenético del C3 utilizando *Gallus gallus* (NM_001396143.1) como grupo externo.

El modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste para el análisis del FV (TVM+G) y el análisis del C3 (HKY) se obtuvo utilizando JModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012) considerando el Criterio de Información de Akaike (AIC). Para establecer el marco temporal en el que los cocodrilianos pueden haber adquirido proteínas similares al FV o una secuencia ancestral similar, se estimaron los tiempos de divergencia (tiempo hasta el ancestro común más reciente, TMRCA) entre las secuencias analizadas.

Los análisis del FV y el complemento C3 se realizaron utilizando “Constant Size” como probabilidad anterior del árbol y una datación estricta por reloj implementada en BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012), que permite estimar los tiempos de divergencia incorporando simultáneamente la heterogeneidad de tasas y la incertidumbre de los parámetros de sustitución, la topología del árbol y las edades de calibración considerando un marco bayesiano (Drummond *et al.*, 2006; Brandley *et al.*, 2010).

Se realizó la calibración de los tiempos de divergencia tomando como dato de referencia la divergencia entre aves y cocodrilianos, datada hace unos 240 Ma (Green *et al.*, 2014). A partir de esta referencia, se estimó el TMRCA mediante una distribución normal con una media de 240 Ma y una desviación estándar de 5,0 Ma. La estimación para el FV incluyó 600 millones de generaciones muestreadas cada 1000 generaciones y para el complemento C3 incluyó 400 millones de generaciones muestreadas cada 1000 generaciones. La convergencia y la estacionariedad se evaluaron utilizando Tracer v.1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) (Rambaut *et al.*, 2018). Luego, el 10% de las generaciones se descartaron como burn-in y se resumió la distribución posterior utilizando un árbol consenso de regla mayoritaria y árboles de probabilidades posteriores. Los cladogramas se visualizaron utilizando el programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

También se realizó un análisis conjunto de las secuencias del FV y del complemento C3 utilizando la opción implementada en BEAST 2.4.5, STARBEAST, un modelo coalescente multiespecie para estimar el árbol de especies (Bouckaert *et al.*, 2014). Asumimos para ambos genes (FV y C3) un

reloj molecular estricto y el modelo de sustitución de nucleótidos de mejor ajuste (GTR) obtenido por JModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). Se realizó un MCMC bayesiano para 100 millones de generaciones con una frecuencia de muestreo cada 5000 generaciones. El período de Burn-in y la convergencia se visualizaron utilizando Tracer v.1.6 (Rambaut *et al.*, 2018). A través de TreeAnnotator, se identificó un árbol consenso que mejor representó la distribución posterior, y se visualizó utilizando DensiTree (Bouckaert, 2010; Drummond *et al.*, 2012).

1.3 Resultados

Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia del FV en cocodrilianos. El fragmento del FV encontrado en el genoma de *C. latirostris* tiene 209 pb. El mismo tamaño de fragmento se encontró a través de BLASTn en otras especies de cocodrilidos: *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. yacare*, *C. porosus*, *C. niloticus* y *C. siamensis*.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas mediante los cebadores del FV de *C. latirostris* y las secuencias del GenBank (*A. mississippiensis*, *A. sinensis*) mostró dos clados principales: (1) el clado de especies pertenecientes al género Alligator, y (2) el clado que incluía las secuencias obtenidas mediante los cebadores VF7 y VF10 (Figura 12).

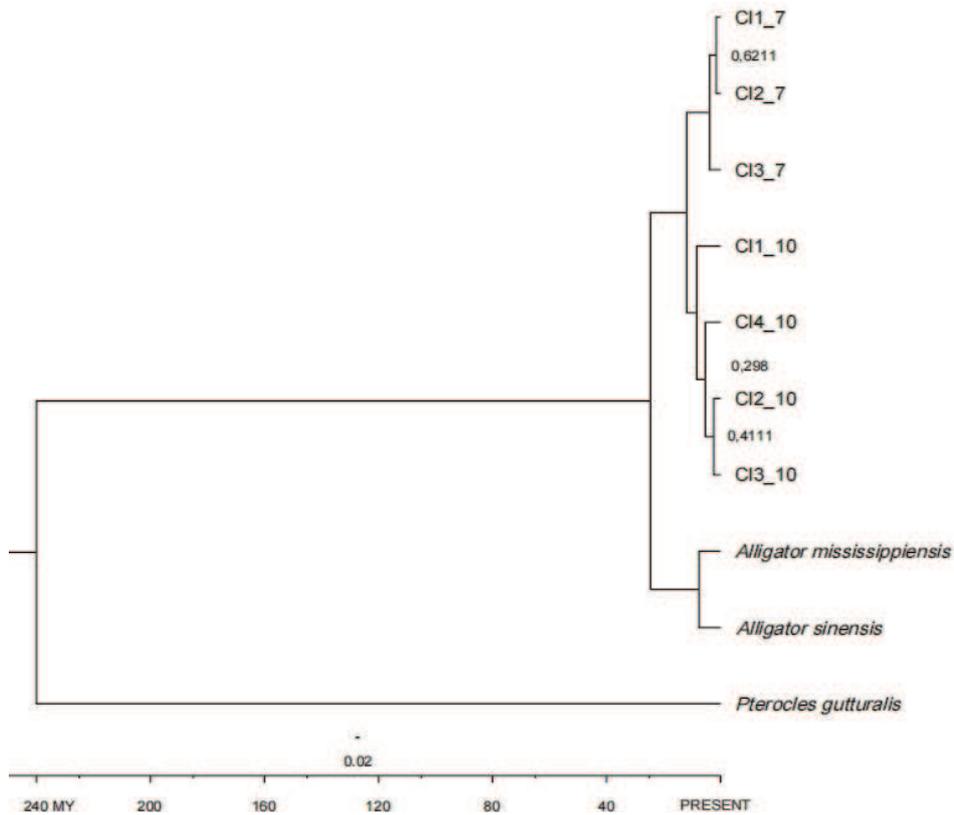


Figura 12. Árbol filogenético experimental del FV. Incluye las secuencias obtenidas de *C. latirostris* y secuencias del GenBank de *A. sinensis* y *A. mississippiensis*. Se utilizó *P. gutturalis* como grupo externo. Las probabilidades posteriores son superiores a 9 para la mayoría de los nodos, a menos que se indique lo contrario. La barra inferior muestra el tiempo de divergencia de la escala temporal en Ma.

El árbol del FV obtenido mediante el análisis de BEAST incluyendo sólo las secuencias de la base de datos genética (Figura 13) mostró una topología similar a la del árbol realizado con las secuencias del complemento C3 (Figura 14). Sin embargo, comparando todas las edades de los nodos de ambos árboles es evidente que los tiempos de divergencia son más tempranos en el gen del complemento C3 que en el gen del FV.

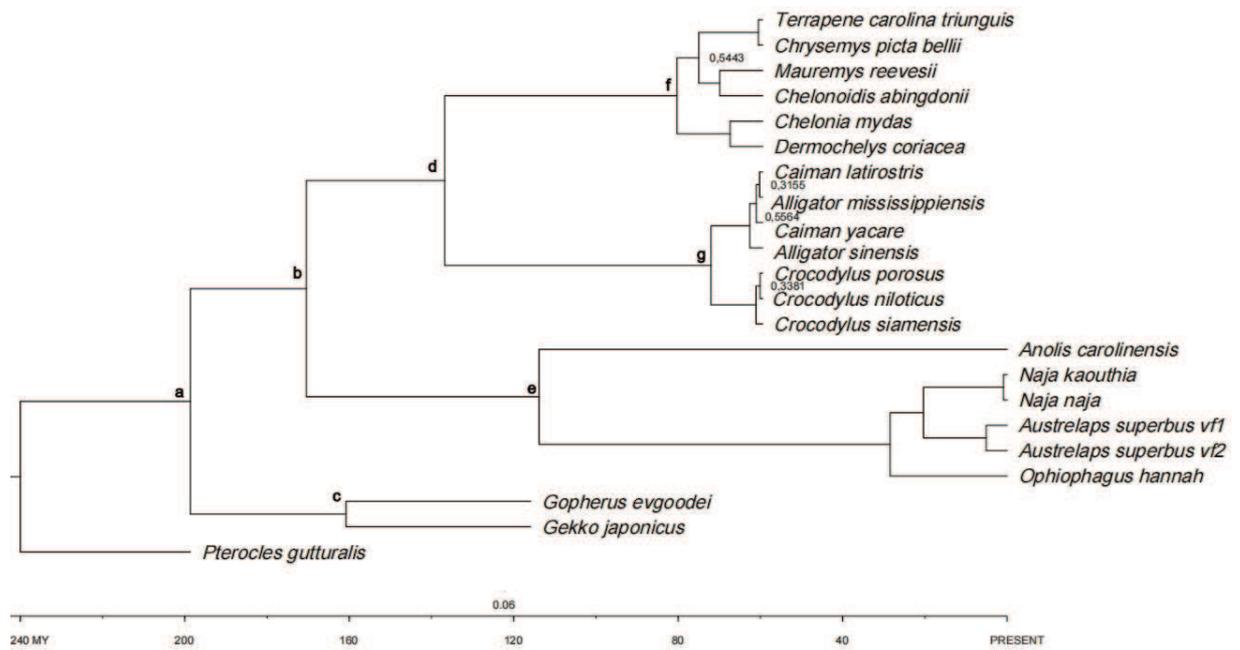


Figura 13. Árbol filogenético del FV. Las probabilidades posteriores son superiores a 9 a menos que se indique lo contrario. La barra inferior muestra la escala temporal en Ma.

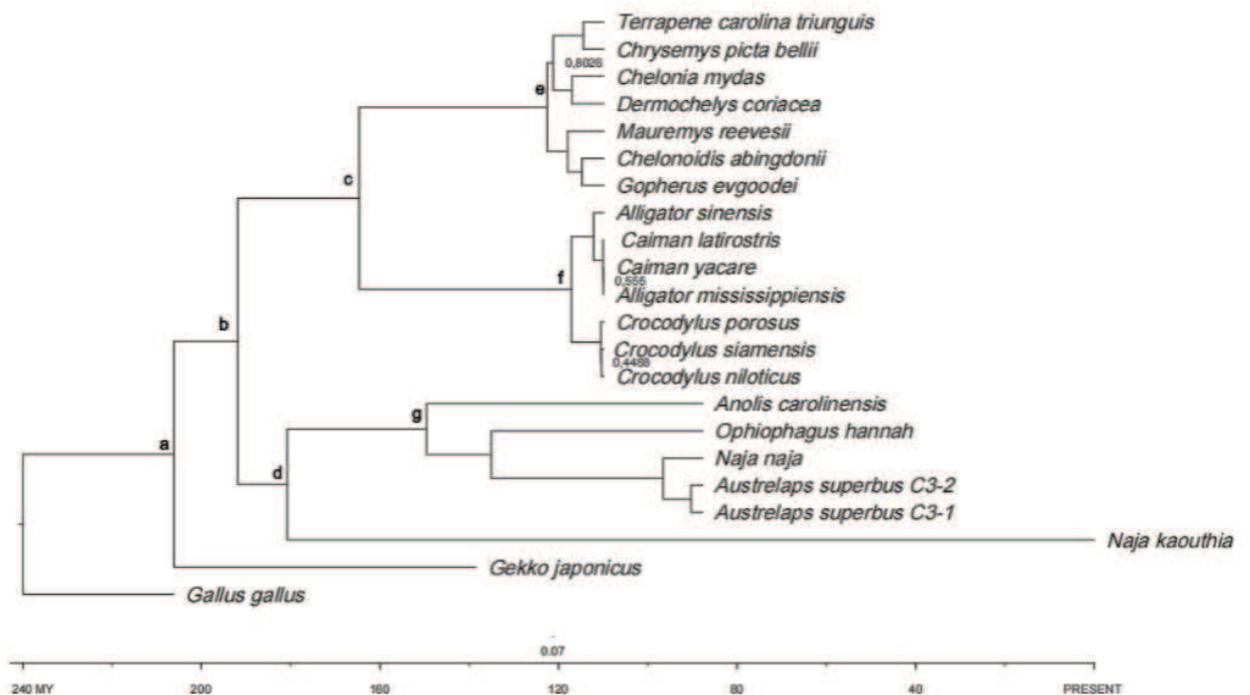


Figura 14. Árbol filogenético del complemento C3. Las probabilidades posteriores son mayores que 9 a menos que se indique lo contrario. La barra inferior muestra el tiempo de divergencia de la escala temporal en Ma.

Ambos árboles filogenéticos se organizaron principalmente en cuatro clados: tortugas, cocodrilianos, serpientes y lagartos. Además, en ambos árboles se observó que el ancestro común más cercano entre cocodrilianos y tortugas (FV: Figura 13, nodo d; complemento C3: Figura 14, nodo c) era diferente del de

serpientes y lagartos (FV: Figura 13, nodo e; complemento C3: Figura 14, nodo d), y la divergencia entre los cocodrilianos y el ancestro común en ambos árboles siempre fue la más reciente (Figura 13, nodo g; Figura 14, nodo f).

El árbol del FV (Figura 13) mostró una baja sustitución de nucleótidos, específicamente en cocodrilianos y tortugas. Por el contrario, las serpientes mostraron la mayor tasa de sustitución de nucleótidos en ambos árboles (FV: Figura 13, nodo e; complemento C3: Figura 14, nodos d, g). Sin embargo, en el árbol del FV, la tasa de sustitución de nucleótidos resultó mayor.

Del mismo modo, el árbol de densidad de las secuencias del FV y el complemento C3 obtenido mediante STARBEAST y visualizado en DensiTree (Figura 15) reflejó en su topología una organización similar a la de los clados mostrados en los árboles filogenéticos anteriores (Figuras 13 y 14), con clados de cocodrilianos, tortugas, serpientes y lagartos. Algunas especies de lagartos son más similares a los cocodrilianos y a las tortugas, y otras especies de lagartos están más próximas a las serpientes (Figura 15). También, en el árbol de densidad es evidente un cierto nivel de incertidumbre, sin embargo, en la raíz del árbol existe una clara división en grupos, igualmente dentro de los clados.

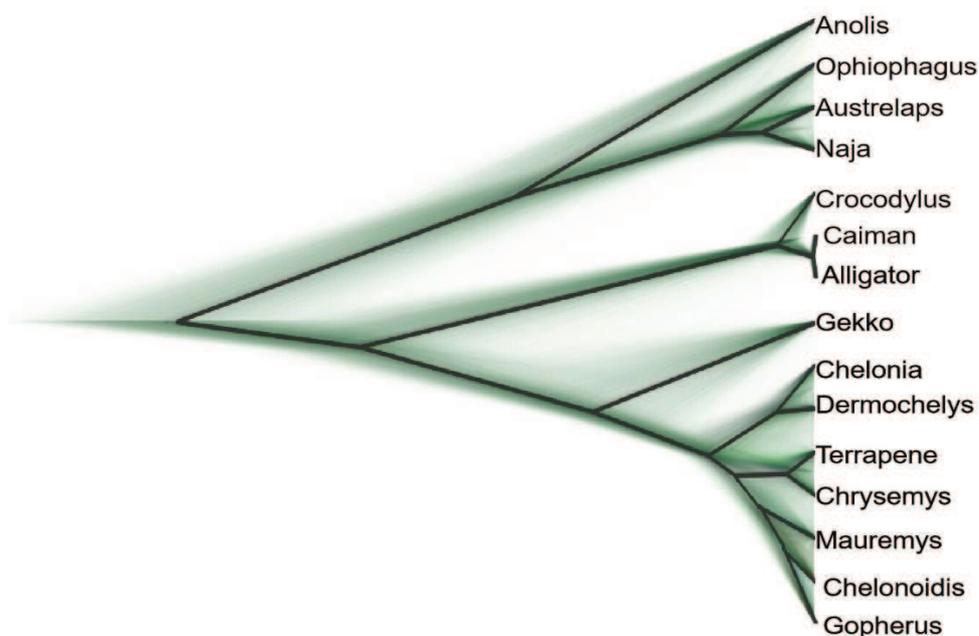


Figura 15. Árbol consenso de densidad del FV y el complemento C3. Basado en el análisis de secuencias del set de datos utilizado y 3712 topologías. Se generaron un total de 26.995 árboles, mostrados en verde. El canal raíz se muestra en negro.

1.4 Discusión

La presencia de la secuencia del FV en especies distintas a las serpientes puede explicarse considerando a la duplicación génica como punto de origen (Fry, 2005), su presencia en los cocodrilianos sugiere la existencia de veneno en los antepasados de estos reptiles. El fenómeno de la duplicación génica promueve la evolución adaptativa permitiendo que un gen duplicado desarrolle una nueva función (modelo de neofuncionalización) y dividiendo las funciones ancestrales entre los duplicados (Malhotra, 2017; Chapal *et al.*, 2019). Sin embargo, según Chapal *et al.*, (2019), la duplicación puede proporcionar un beneficio adaptativo a través de la cooperación en lugar de la divergencia funcional, permitiendo una dinámica de dos factores con propiedades beneficiosas que no se pueden lograr con un solo gen.

De esta forma, la existencia del FV en serpientes que pertenecen a la familia Elapidae es razonable porque la función de defensa no sólo cubre el aspecto inmunológico del depredador (a través de la función del complemento C3) sino también el de mantener a la presa lo suficientemente suprimida como para lograr el éxito de la depredación (a través de la acción del FV). Entonces, surge la pregunta: ¿el FV fue funcional alguna vez en los cocodrilianos o es un vestigio heredado de un antepasado común?

Los procesos de restricción y reclutamiento que siguen a la duplicación de genes también pueden estar implicados en el origen del FV. Según Hargreaves *et al.*, (2014), muchas toxinas venenosas se expresan en una amplia variedad de tejidos corporales, incluida la glándula salival de reptiles no venenosos, por lo que estos genes se han restringido a la glándula venenosa tras la duplicación, no el reclutamiento.

Los resultados obtenidos por secuenciación (Figura 12) confirman la presencia del FV en cocodrilianos, tal vez como un remanente de un ancestro común, tal y como se muestra en los análisis filogenéticos (Figuras 12, 13 y 14). En los árboles de genes del FV (Figuras 12 y 13), la organización de las secuencias de cocodrilianos en diferentes clados indica que el FV ha sufrido algunos cambios específicos de especie que causan esta divergencia observada en la topología de los árboles. Sin embargo, la organización y topología de los árboles: FV (Figura 13), complemento C3 (Figura 14) y DensiTree realizado

con información de ambos genes (Figura 15) fueron similares, probablemente debido a la homología entre el FV y el complemento C3 ya que a nivel proteico tienen un 85% de identidad de secuencia y un 92% de similitud de secuencia (Vogel y Fritzinger, 2017). Esta similitud en la topología y la organización de los clados también sugiere que en los cocodrilianos el complemento C3 puede ser un paralogismo de las proteínas similares al FV. Además, basándose en los eventos mencionados anteriormente (duplicación, restricción y reclutamiento de genes), el complemento C3 está asociado al FV (Xu *et al.*, 2001; Fry, 2005; Krishnan *et al.*, 2009; Hargreaves *et al.*, 2014; Vogel y Fritzinger, 2017).

Aunque Fry, (2005) sugirió que se ha producido una duplicación de un gen del complemento C3 para dar lugar al FV, y también datos de transcriptómica revelan que el complemento C3 se expresa en diversos tejidos corporales de múltiples especies, incluida la glándula salival de reptiles no venenosos, y que una copia paróloga de este gen se ha restringido por tanto a la glándula del veneno tras la duplicación (Hargreaves *et al.*, 2014), aún no existen estudios que hayan evaluado cómo podría aparecer y transmitirse el FV en los cocodrilianos.

Considerando la lenta tasa evolutiva reflejada tanto a nivel molecular como cromosómico (Alfaro *et al.*, 2009; Jetz *et al.*, 2012; Pyron *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2021) y la existencia del FV en los cocodrilianos, los receptores olfativos (OR) pueden ser considerados como un punto clave para su comprensión, debido a la duplicación de genes (Niimura y Nei, 2007), y también porque estos repertorios reflejan casi exclusivamente la retención de genes ortólogos ancestrales presentes en el ancestro común de los cocodrilianos (Green *et al.*, 2014).

Las especies de cocodrilos existentes han mantenido similitudes morfológicas durante casi 100 millones de años (Brochu, 2003; Bronzati *et al.*, 2015; Stubbs *et al.*, 2021); estos reptiles se diversifican 1000 veces más despacio de lo habitual, con una tasa de disparidad baja, siendo unas 10.000 veces más lentos que otros grupos animales (Alfaro *et al.*, 2009; Jetz *et al.*, 2012; Pyron *et al.*, 2013).

El árbol del FV (Figura 13) mostró en cocodrilianos y tortugas el valor de sustitución de nucleótidos más bajo, en comparación al árbol del complemento

C3, lo que concuerda con el hecho de que tortugas y cocodrilos tienen genomas más grandes debido a la tendencia a acumular y conservar ADN (Olmo, 2008). Por el contrario, la mayor tasa de sustitución de nucleótidos en el árbol del FV se observó en las serpientes, esto puede explicarse a partir de la función del veneno porque los genes del veneno de serpiente han estado expuestos a diferentes presiones de selección (Malhotra, 2017), y la evolución del veneno de serpiente se ha caracterizado por al menos 24 eventos de reclutamiento (Fry, 2005).

Existe una gran diversidad de venenos basada en afinidades filogenéticas, localidades geográficas, edad de las serpientes y dieta (Mackessy y Saviola, 2016).

Esta hiperdiversidad no se limita a los genes de las toxinas, sino que se aplica a cualquier gen cuyos productos interactúen con otras especies, como depredadores, presas o patógenos (Malhotra, 2017). En consecuencia, se espera que el FV en las serpientes sea hiperdiverso, porque, aunque no es tóxico, está contenido en el veneno de la serpiente e interactúa con otras especies, proporcionando una función para el depredador y la presa. En los cocodrilianos, se espera que el FV sea menos diverso, debido a que probablemente no lo utilizan o lo utilizan para alguna función diferente a la depredación.

Entonces, considerando la baja diversidad, ¿podrían los cocodrilianos poseer en su genoma el estado ancestral de la secuencia del FV (FVC en serpientes)? Otra pregunta es: ¿fue el FV transferido junto con los otros componentes del veneno, o fue transferido como una sola proteína? Es importante tener en cuenta que, si se transmitió junto con los componentes tóxicos del veneno, es probable que los cocodrilianos posean un antepasado venenoso.

A continuación, se proponen dos hipótesis que pueden explicar cómo el FV pudo transmitirse de un ancestro común a las especies existentes de cocodrilianos.

- *Transferencia horizontal de un elemento transponible y un virus como vector*

La transferencia horizontal (TH) se define como el movimiento de fragmentos de ADN entre organismos de forma diferente a la reproducción (Wallau *et al.*,

2018). Este fenómeno puede ocurrir cuando un fragmento de ADN invade con éxito el genoma de la especie receptora y luego se transmite por transferencia vertical (TV) a la siguiente generación (Schaack *et al.*, 2010). En eucariotas, se ha informado de eventos de TH a través de la transferencia de entidades genómicas conocidas como elementos transponibles (ET) (Daniels *et al.*, 1990). Se trata de secuencias de ADN muy diversas y repetidas que pueden desplazarse dentro de un genoma (Feschotte, 2008; Piskurek y Jackson, 2012). Los ETs se clasifican en: tipo I, que incluye retrotransposones y retrovirus endógenos y tienen un intermediario de ARN en su ciclo de vida; y tipo II, que incluye los transposones de ADN (Boissinot *et al.*, 2019). Dentro del tipo I, hay dos clases basadas en la presencia o ausencia de repeticiones terminales largas (LTR): los retrotransposones LTR más abundantes en los genomas de reptiles son los elementos Gypsy, Copia y DIRS (Alföldi *et al.*, 2011); y los retrotransposones no LTR, que incluyen elementos nucleares intercalados largos (LINEs), elementos nucleares intercalados cortos (SINEs) y los elementos Penélope (Ichihanagi y Okada, 2008). Dentro de los LINEs, los clados L1, L2, CR1 y RTE son los más significativos desde el punto de vista de la evolución genómica de los reptiles (Novick *et al.*, 2009), y los SINE SAURIA están ampliamente distribuidos entre los genomas de los lepidosaurios (Kosushkin *et al.*, 2008; Piskurek *et al.*, 2009).

Los virus como vector de transferencia de ETs han sido una de las alternativas propuestas. Este es el caso de la transferencia del mencionado SINE SAURIA desde el genoma de un reptil (la serpiente *Echis ocellatus*) al genoma del virus taterapox (TATV), el cual puede infectar a numerosos animales y causar morbilidad y mortalidad en algunas cepas inmunocomprometidas (Parker *et al.*, 2018). La transferencia se ha demostrado en las subfamilias de SINEs de lagartos y serpientes, ya que se identificó una serpiente altamente venenosa (*E. ocellatus*) como la especie más cercana a partir de la cual la secuencia de SINE descubierta en el genoma del TATV (TATV-SINE) se transfirió al virus (Piskurek y Okada, 2007). Además, se descubrieron repeticiones directas derivadas del virus flanqueando el TATV-SINE, y la ausencia de ADN derivado de la serpiente flanqueando el SINE, haciendo evidente su transferencia dentro del genoma de la serpiente por retrotransposición (Piskurek y Okada, 2007).

En particular, los cocodrilianos tienen genomas similares al paisaje genómico ancestral de ETs de los reptiles, esto significa que la prevalencia de ETs en sus genomas es alta (Wan *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2014; Rice *et al.*, 2017). Sus genomas se componen de grandes proporciones de transposones de ADN, incluidos los elementos hAT y PIF-Harbinger (~ 7% del genoma), así como elementos LTR Gypsy (~ 3%) (Green *et al.*, 2014) y la recién descubierta secuencia de retrovirus endógenos: ERV4, que parece ser común en cocodrilianos y tortugas (Chong *et al.*, 2014).

Por ello, se propone que una determinada región del FV o un componente proteico ancestral genéticamente similar al FV de serpientes se movilizó a través de ETs a cocodrilos, y el vector podría ser un virus del tipo poxvirus, lo cual no es inusual porque ha habido informes de caimanes, cocodrilos y serpientes infectados por estos vectores (Penrith *et al.*, 1991; Huchzermeyer, 2003; Piskurek y Okada, 2007). Aunque colonizar la línea germinal y que la transferencia tenga éxito es proceso complejo, debido a que los cocodrilos y algunas serpientes son amniotas (el embrión se desarrolla en el huevo amniótico) (Boissinot *et al.*, 2019), se ha propuesto que los virus, y en particular los poxvirus, pueden desempeñar un papel en el proceso de colonización de la línea germinal (Piskurek y Okada, 2007), así como se ha demostrado que algunos parásitos comparten ETs con su hospedador, lo que sugiere que un tipo de interacción íntima podría facilitar la transmisión (Suh *et al.*, 2016).

- *Transferencia horizontal a través de interacción depredador-presa*

Los cocodrilianos son carnívoros (Gabrey, 2010; Finger *et al.*, 2020) descritos como depredadores oportunistas (Delany y Abercrombie, 1986; Wolfe *et al.*, 1987). Se caracterizan por tener una dieta diversa, que es diferente en cada clase de tamaño (Delany y Abercrombie 1986; Wolfe *et al.*, 1987), por lo general, las crías comienzan alimentándose de pequeños invertebrados acuáticos como insectos, crustáceos y caracoles, y más tarde incluyen renacuajos, ranas pequeñas y peces en su dieta; a medida que crecen, el tamaño de las presas aumenta e incluye aves y pequeños mamíferos (Huchzermeyer, 2003).

Además, el consumo de reptiles en la dieta de los cocodrilianos representa entre el 15 y el 31% (Gabrey, 2010), las serpientes constituyen más del doble,

tanto en número como en peso, en relación con las tortugas (Wolfe *et al.*, 1987). Aunque no constituyen una gran proporción de la dieta de los cocodrilianos, las serpientes venenosas (*Agkistrodon piscivorus*, "Boca de algodón") y no venenosas también forman parte de la dieta de los cocodrilidos (Wolfe *et al.*, 1987; Saalfeld *et al.*, 2011).

Por otra parte, las serpientes son estrictamente carnívoras, y el tamaño de su cuerpo influye en la elección de sus presas. Se alimentan de insectos, gusanos, caracoles, peces, huevos, aves, pequeños mamíferos, ranas, otras serpientes, lagartos e incluso cocodrilos juveniles (Ernst y Ernst, 2003). Aunque las serpientes no son las presas más comunes de los cocodrilos y viceversa, existe una relación depredador-presa entre ellos que no puede ignorarse (Ernst y Ernst, 2003; Saalfeld *et al.*, 2011), porque los costes de fitness asociados a la envenenación pueden estimular una "carrera armamentística" coevolutiva entre depredador y presa (Dawkins y Krebs, 1979; Thompson, 1999).

En consecuencia, a través de la relación depredador-presa existente entre ambos grupos de reptiles, el FV o una secuencia proteica ancestral similar al FV podría haberse transmitido por TH a partir de ETs de serpientes a cocodrilos.

Varias investigaciones han propuesto la transmisión de cepas particulares de bacterias intracelulares por TH desde una presa infectada a sus depredadores (Yun *et al.*, 2011; Hurst *et al.*, 2012). Un estudio reciente describe un evento de TH en el que un gen que codifica para proteínas inactivas del ribosoma (RIP) se transfirió de una planta al ancestro de una especie de mosca blanca conocida como *Bemisia tabaci*. Las vías que los autores proponen para facilitar la transferencia son (1) Debilidad de la barrera de Weisman: el principio de que la información hereditaria se mueve sólo de las células de la línea germinal a las células somáticas, entonces, la retroalimentación del soma a la línea germinal es imposible debido a la separación física entre las células somáticas y germinales en los organismos multicelulares (Lapadula *et al.*, 2020), y (2) Alimentación de las moscas, ya que en sus primeros estadios de desarrollo tienen una fase larvaria e ingieren la savia de las plantas, lo que es coherente con la adquisición de un gen RIP (Lapadula *et al.*, 2017; 2020).

De esta forma, demostrando que a través de una relación depredador-presa, podría haber sido posible la transferencia de un gen RIP; adquiere credibilidad

la hipótesis propuesta de que el FV podría haber sido transferido por TH utilizando esta dinámica entre cocodrilianos y serpientes.

Futuras investigaciones serán necesarias para profundizar en cómo los cocodrilos adquirieron el FV y su posible existencia en otras especies de cocodrilos.

**CAPÍTULO 2. CATELICIDINAS. UNA FAMILIA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
CONSERVADA Y DIVERSA**

**Búsqueda, detección y aislamiento de catelicidinas en yacaré overo.
Relaciones evolutivas/estructurales**



2.1 Introducción

Las catelicidinas son una familia de PDHs cuya secuencia de aminoácidos es variable en su región C-terminal. Se almacenan en los gránulos secretores de neutrófilos y macrófagos y pueden liberarse extracelularmente tras la activación de los leucocitos. También se ha encontrado su expresión en células no leucocitarias, por ejemplo, en células epiteliales (Boman, 1995; Zanetti *et al.*, 1995; Zanetti, 2005).

Tal como se mencionó en capítulos anteriores, la existencia de las catelicidinas se estableció sobre la base de la presencia de un dominio “catelina” conservado (Kosciuczuk *et al.*, 2012). Este término significa inhibidor de la catepsina L, por lo que le fue asignado este nombre para reconocer dicha propiedad (Tomasinsig y Zanetti, 2005).

Esta familia de PDHs fue reconocida por primera vez a principios de los años 90, su descubrimiento ocurre a partir de la clonación del ADNc de bactenecina5 (Bac5), un péptido antimicrobiano con dominio N-terminal conservado, que había sido aislado previamente de neutrófilos bovinos (Zanetti *et al.*, 1993; Gennaro y Zanetti, 2000; Tomasinsig y Zanetti, 2005).

Luego de Bac5, fue identificado Bac7. Ambas catelicidinas constan de 43 y 60 residuos de aminoácidos, que conforman secuencias diferentes y policatiónicas, con un motivo repetido de prolina (Gennaro *et al.*, 1989; Kościuczuk *et al.*, 2012). Actualmente, se sabe que ejercen su efecto bactericida sin producir una lisis significativa de la membrana y son más selectivos a las bacterias Gram negativas en comparación a las Gram positivas (Tomasinsig *et al.*, 2010).

De esta manera, se han identificado progresivamente catelicidinas en las siguientes especies.

- Humanos, catelicidina LL37 (Sørensen *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Kościuczuk *et al.*, 2012). Esta catelicidina inicialmente aislada de mielocitos y metamielocitos, se localizó en gránulos específicos de neutrófilos (Frohm Nilsson *et al.*, 1999). También se encontró en células epiteliales de testículos, piel (Frohm *et al.*, 1996; 1997), tracto gastrointestinal y respiratorio, células “natural killer” (NK), células

gamma delta, células beta y macrófagos (Bals *et al.*, 1998). Además de la acción antimicrobiana, se han identificado otras funciones de LL37, tales como la unión de LL37 a FPRL1 en células mieloides y otros tipos de células (Yang *et al.*, 2000), la actividad quimiotáctica para leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, monocitos y linfocitos T CD4 (Agerberth *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000) y la estimulación de mastocitos para liberar histamina (Niyonsaba *et al.*, 2001).

- Ratones, catelicidina CRAMP. Este péptido activado, actúa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gallo *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002).
- En cobayas CAP11 (Nagaoka *et al.*, 1997), monos RL 37 (Bals *et al.*, 2001) y ratas rCRAMP (Termen *et al.*, 2003), son las únicas catelicidinas que se han descrito en estas especies.

Por el contrario, en las siguientes especies se han reportado más de una catelicidina:

- Caballos, catelicidinas eCATH-1 y eCATH-3. Las cuales poseen actividad antimicrobiana dependiente de la concentración de sodio (Scocchi *et al.*, 1999; Skerlavaj *et al.*, 2001).
- Cerdos, protegrinas y PR-39 (Kokryakov *et al.*, 1993). Las protegrinas actúan en bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y algunos virus (Kokryakov *et al.*, 1993; Yasin *et al.*, 1996; Ramanathan *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2007) y, se consideran potenciales antibióticos de amplio espectro (Shi y Ganz, 1998; Bals y Wilson, 2003). Mientras que, PR-39, está presente en el líquido de las heridas y es muy activo contra bacterias Gram negativas (Agerberth *et al.*, 1991; Boman *et al.*, 1993).
- Ovejas, catelicidinas SMAP29, Bac5, 6, 7.5 (Shamova *et al.*, 1999; Brogden *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004) y OaBac5, 6, 7.5 y 11 (Huttner *et al.*, 1998) con actividad contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y frente a *Candida albicans* (Anderson *et al.*, 2004).
- Cabras, catelicidinas ChBac5 (Shamova *et al.*, 1999) con actividad contra bacterias Gram negativas.
- Pollos, fowlicidinas (chCATH-1, -2 y -3) (Zhao *et al.*, 2001b; Lynn *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006), CMAP27 (Van Dijk *et al.*, 2005) y chCATH-B1

(Mukhopadhyaya *et al.*, 2010). Las cuales son catelicidinas efectivas en cepas bacterianas resistentes a antibióticos y, además, desempeñan una función importante en la defensa innata de los pollos.

- En perros (Sang *et al.*, 2007), ciervos (de Mera *et al.*, 2008), algunas especies de peces (Uzzell *et al.*, 2003; Dürr *et al.*, 2006) y serpientes (Wang *et al.*, 2008), también han sido reportadas varias catelicidinas.

En cocodrilianos, las catelicidinas descritas se han aislado principalmente de la familia Alligatoridae. Barksdale *et al.*, (2017) en *Alligator mississippiensis*, identificaron, sintetizaron y caracterizaron una catelicidina y dos fragmentos cortos de AM-CATH21, AM-CATH28, AM-CATH36. Mediante herramientas bioinformáticas y difracción circular, predijeron que el péptido de la catelicidina de longitud completa tiene una hélice alfa N-terminal y una bisagra Pro-central. Además, se determinó que la catelicidina y los dos fragmentos tienen una fuerte actividad contra múltiples bacterias Gram negativas, incluidos aislamientos clínicos resistentes a múltiples fármacos, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. Se observó que estos péptidos permeabilizaban la membrana bacteriana y no eran hemolíticos frente a los glóbulos rojos de oveja, ni significativamente citotóxicos frente a las células epiteliales pulmonares humanas A549. Estos péptidos tienen una actividad similar a otros PDH de reptiles como los de *Naja atra*. Sin embargo, AM-CATH36 (o sus fragmentos) es posiblemente la catelicidina del *A. mississippiensis*. La misma tiene una fuerte actividad contra algunas bacterias Gram negativas y no es significativamente citotóxica para las células de mamíferos.

Chen *et al.*, (2017) identificaron en *Alligator sinensis* seis nuevas catelicidinas (As-CATH1~6) que se expresan principalmente en órganos inmunitarios y tejidos epiteliales. Estas mostraron amplio espectro y rápida actividad antimicrobiana al inducir la alteración de la integridad de la membrana celular. También mostraron capacidad para impedir la formación y erradicar las biopelículas bacterianas, exhibieron una potente actividad antiinflamatoria al inhibir la producción de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias inducida por lipopolisacáridos en macrófagos peritoneales de ratón; fueron estables a la sal, la degradación térmica y la disolución. Sin embargo, como la mayoría de las

catelicidinas estudiadas, las As-CATH4~6 presentaron inestabilidad en el plasma, lo que implica su rápida degradación tras haber ejercido su función en el huésped.

Posteriormente, Santana *et al.*, (2022) identificaron nuevas catelicidinas en *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *Crocodylus porosus* y *Gavialis gangeticus*, las que demostraron actividades antimicrobianas y antibiofilm de amplio espectro *in vitro* contra varias cepas bacterianas, incluidos aislamientos clínicos de bacterias ESKAPE, las cuales constituyen un grupo de seis principales patógenos responsables de infecciones de tipo nosocomial peligrosas y difíciles de tratar (Mulani *et al.*, 2019). Además, caracterizaron las propiedades antibiofilm de estas catelicidinas. En particular, la catelicidina As-CATH8 demostró potentes perfiles de actividad *in vitro* similares a los de los antibióticos vancomicina y polimixina B, una rápida eliminación de células planctónicas y de biopelículas, mostró una mayor actividad antibiofilm que la catelicidina humana LL37 contra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina y, fuertes efectos antimicrobianos en un modelo de absceso murino de infecciones bacterianas de alta densidad contra aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Acinetobacter baumannii*. En conjunto, estos estudios amplían el repertorio de catelicidinas conocidas en cocodrilianos que desempeñan un papel importante a nivel del sistema inmunitario innato de estos animales, al igual que el LL37 en los seres humanos.

Más allá de las características generales de las catelicidinas, y considerando la notable diversidad molecular, en cuanto a tamaño, secuencia y estructura, y la preservación del carácter catiónico y anfipático típico de los péptidos antimicrobianos (Tomasinsig y Zanetti, 2005); es evidente el dinamismo de los procesos evolutivos con el fin de seguir generando familias de genes con moléculas efectoras tales como los PDHs. Además, basándose en la presencia de estos en vertebrados existentes primitivos, la familia de genes de la catelicidina puede remontarse a la evolución temprana de los vertebrados, aproximadamente hace 300-500 Ma (Tomasinsig y Zanetti, 2005), lo que justifica su amplia distribución y sugiere que este tipo de PDH desempeña un papel relevante en la protección del huésped frente a infecciones microbianas. En este capítulo se describen las herramientas, métodos bioinformáticos y espectroscópicos aplicados, que permitieron identificar y definir química y

estructuralmente a las dos catelicidinas contenidas en el genoma de *Caiman latirostris* estudiadas en esta tesis. También se caracterizan filogenéticamente ambos péptidos, estableciendo similitudes y diferencias con respecto a otras especies con el propósito de identificar relaciones estructurales y evolutivas. También, se describe el proceso de aislamiento, previo a la secuenciación y síntesis química, de plcat1lat y plcat2lat.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Búsqueda y selección de péptidos

En el marco de una serie de proyectos llevados a cabo por el LEMA-ICIVET con la Universidad de Florida (Estados Unidos), se realizaron estudios de transcriptómica en *Caiman latirostris* durante los años 2017 y 2018. Estos estudios sirvieron como base para la búsqueda de péptidos a partir de las bibliotecas génicas generadas en dichas investigaciones (Tabla 5). Los trabajos de transcriptómica proporcionaron una base sólida para la identificación y caracterización de péptidos de interés, permitiendo avanzar en la investigación de manera sistemática y fundamentada.

Tabla 5. Bibliotecas producto de transcriptómica. Los desafíos se realizaron con suspensiones de *E. coli*. La exposición del año 2017 se realizó con el herbicida Glifosato y la del año 2018, con el insecticida Cipermetrina.

Año	Biblioteca	Órgano	Desafío			Exposición		
			Inicio	Final	Ninguno	Inicio	Final	Ninguno
2017	1	Hígado			X			
	2	Sangre			X			
2018	3	Sangre			X			X
	4	Sangre	X	X				X
	5	Sangre	X	X		X	X	
	6	Sangre	X	X			X	

A partir de estas bibliotecas, se seleccionaron péptidos detectados en *Alligator mississippiensis* y para confirmar la presencia de estos en yacaré overo se realizaron dos tipos de alineamientos básicos locales de secuencias, conocidos como BLAST en CoGe (<https://genomevolution.org/coge/>, Lyons y Freeling, 2008; Lyons *et al.*, 2008), que es la plataforma de genómica comparada donde se encuentra disponible el genoma completo de *C. latirostris*.

El primer BLAST que se realizó fue de nucleótidos, debido a que las secuencias de los péptidos de interés se encontraban en esta forma. Luego, se hizo un BLAST de proteínas, en el cual la búsqueda y alineamientos de las secuencias de los péptidos de interés se hace con respecto a los aminoácidos que componen la secuencia.

2.2.2 Predicción del potencial antimicrobiano y otras propiedades relevantes de los péptidos

Una vez confirmada la presencia de diversos péptidos en *C. latirostris*, y considerando el potencial antimicrobiano de éstos, se seleccionaron dos péptidos a los que se denominó: plcat1lat y plcat2lat. Para determinar el potencial antimicrobiano de estos péptidos se utilizaron los predictores AMPA (<https://tcoffee.crg.eu/apps/ampa/do>, Torrent *et al.*, 2012) y CAMP_{R4} (<https://campsign.bicnirrh.res.in/>), Gawde *et al.*, 2023). Estos algoritmos proporcionan información sobre regiones antimicrobianas del péptido: número y localización en la secuencia, índice antimicrobiano medio de la proteína y los tramos predichos, así como un valor de probabilidad de clasificación errónea, es decir, la probabilidad de que el tramo predicho como antimicrobiano se encuentre en una proteína no antimicrobiana.

También, se evaluaron otras propiedades relevantes de los dos péptidos seleccionados a través de predictores desarrollados por Timmons Research (<https://research.timmons.eu/>). Entre las propiedades evaluadas se encontraron: actividad hemolítica (Happenn, Timmons y Hewage, 2020), actividad anticancerígena (Ennaact, Timmons y Hewage, 2021) y actividad antiviral (Ennavia, Timmons y Hewage, 2021). Igualmente, se determinaron en la región madura de ambos péptidos, la cantidad de residuos aminoácidos que favorecen al desorden de su estructura tridimensional (Latendorf *et al.*, 2019).

2.2.3 Determinación de propiedades fisicoquímicas de plcat1lat y plcat2lat

Se obtuvieron datos de propiedades fisicoquímicas de los péptidos empleando ProtParam Tool-ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger *et al.*,

2005). Ésta es una herramienta que permite calcular varios parámetros físicos y químicos para cualquier proteína almacenada en [UniProtKB](#) o de una secuencia particular. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, el punto isoeléctrico teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción, la vida media estimada, el índice de inestabilidad, el índice alifático y el promedio general de hidropaticidad. También se obtuvieron datos sobre su hidrofobicidad, momento hidrofóbico, y carga neta con el servidor HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>, Gautier *et al.*, 2008), que se explicará su función en un próximo apartado.

2.2.4 Determinación de regiones de plcat1lat y plcat2lat

Las regiones de los péptidos comprendidas por péptido señal y dominio fueron delimitadas a través de HMMER: Análisis de biosecuencias mediante modelos ocultos de Markov (<http://hmmer.org/>, Finn *et al.*, 2011; Potter *et al.*, 2018). HMMER se utiliza para buscar secuencias homólogas en bases de datos y para realizar alineaciones de secuencias. Sin embargo, también está diseñado para detectar homólogos remotos con la mayor sensibilidad posible, basándose en la fuerza de sus modelos de probabilidad subyacentes.

También, con PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/, Gasteiger *et al.*, 2005), se determinaron las regiones escindidas por elastasa en los péptidos en particular.

2.2.5 Predicción del comportamiento y desempeño de plcat1lat y plcat2lat en membranas y micelas bacterianas

Mediante el servidor OPM-PPM (<https://opm.phar.umich.edu/>, Lomize *et al.*, 2012; Lomize *et al.*, 2022), se examinó el posicionamiento de los péptidos plcat1lat y plcat2lat en membranas (planas o curvas, artificiales o naturales) de bacterias Gram positivas, Gram negativas y micelas minimizando su energía de transferencia, se calcularon los modos de unión y afinidad de membrana de los péptidos teniendo en cuenta la influencia del emparejamiento hidrofóbico y la tensión de curvatura de membrana y, se predijeron deformaciones de

membrana inducidas por los péptidos. Detalladamente, los parámetros que se determinaron fueron los siguientes:

- **Profundidad/espesor hidrofóbico (Å)**, es un parámetro que indica el espesor hidrofóbico o la profundidad máxima de penetración de los átomos de proteína en el núcleo hidrocarbonado lipídico.
- **Ángulo de inclinación**, se calcula entre la normal de la membrana (eje Z) y el eje de la proteína. El eje de la proteína se calcula como la suma de los vectores de los segmentos de la estructura secundaria TM (para proteínas transmembrana) o como el eje principal de inercia (para proteínas periféricas).
- **Transferencia de ΔG (membrana curva) (kcal/mol)**, esta energía corresponde aproximadamente a la energía real de unión a la membrana de las proteínas periféricas.

2.2.6 Determinación de estructura secundaria y terciaria de plcat1lat y plcat2lat

Las estructuras secundarias y el cribado de las alfa-hélices para los péptidos plcat1lat y plcat2lat se generaron y determinaron mediante HeliQuest. Este servidor calcula sus propiedades fisicoquímicas y su composición en aminoácidos a partir de una secuencia de aminoácidos de una hélice (alfa-hélice, 3-10 hélice, 3-11 hélice o π hélice), y utiliza los resultados para cribar cualquier banco de datos con el fin de identificar segmentos proteicos que posean características similares.

Posteriormente, el modelado de la estructura tridimensional de los péptidos se realizó con la herramienta de predicción de estructura disponible en ChimeraX (Goddard *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2023) generados mediante ColabFold (<https://github.com/sokrypton/ColabFold>, Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022), la cual es una plataforma que ofrece la predicción de estructuras y complejos proteicos combinando búsquedas rápidas de homologías de MMseqs2 con AlphaFold2 o RoseTTAFold. De esta manera, se obtuvieron dos archivos en formato .PDB. Éste es el formato de archivo del Banco de Datos de Proteínas y contiene las coordenadas atómicas de los péptidos estudiados.

2.2.7 Validación de la estructura tridimensional de *plcat1lat* y *plcat2lat*

La validación de la estructura tridimensional de los péptidos *plcat1lat* y *plcat2lat* modelados se realizó en el servidor de modelado de homología de estructura de proteínas Swiss-Model (Waterhouse *et al.*, 2018) mediante la herramienta de evaluación de estructuras (Waterhouse *et al.*, 2024) que integra varias herramientas y anotaciones con visores de secuencias y estructuras para simplificar la exploración de la calidad y las características estructurales de los modelos macromoleculares.

Luego de validar las estructuras tridimensionales de los péptidos se procedió a renderizarlos y visualizarlos a través de Mol* Viewer (<https://molstar.org/>, Sehnal *et al.*, 2021), un kit de herramientas de código abierto para la visualización y análisis de datos moleculares a gran escala. Éste renderiza modelos a detalle atómico y genera gráficos de alto rendimiento.

2.2.8 Detección, aislamiento, secuenciación y síntesis química de *plcat1lat* y *plcat2lat*

Para evaluar la presencia real de ambos péptidos en *C. latirostris*, se diseñaron dos pares de cebadores específicos (Tabla 6) para amplificar los fragmentos correspondientes a las regiones activas de estos en muestras de ADN de yacaré overo. Para el diseño de estos, se utilizó el software Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012) basados en el genoma de yacaré overo disponible en CoGe.

Tabla 6. Cebadores específicos diseñados para la detección de los péptidos de *C. latirostris*.

Cebador	5'-3' Secuencia
p1-F	CTCCTTGTCCTGCCTAGCCG
p1-R	TCTTCTCCCTCTCTCCAGCCT
p2-F	CCGCCCTATGCAAAAAGGAGA
p2-R	AGGGATCACAGATGGGCGT

Fueron amplificadas cinco muestras de ADN de *C. latirostris* utilizando los cebadores específicos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 24 μ l con 1X tampón estándar; 2 μ l de cada cebador (0,1 nM/ μ l); 1 μ l de MgCl 50 mM; 2,5 μ l de mezcla de dNTP (200 mM); 0,10 μ l de Taq ADN polimerasa (5 U/ μ l) (Invitrogen®) y 50 ng de ADN. En cada serie de

reacciones de PCR se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Bioer Life Express® de 96 pocillos, con 30 ciclos incluyendo paso de desnaturalización de 1 min a 94 °C, paso de recocido de 1 min a 58 °C (para plcat1lat) y 62 °C (para plcat2lat), y extensión a 72 °C de 2 min en cada ciclo iterativo. Además, se utilizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% y, a continuación, se purificaron y secuenciaron (Applied Biosystems, Macrogen Inc., Corea).

Una vez confirmadas las secuencias aminoacídicas de los péptidos, la empresa Biomatik Corporation realizó la síntesis química de estos con el extremo C-terminal amidado (-NH₂), esta es una modificación post-traducciona que mejora la estabilidad del péptido, mimetiza al péptido sintético como natural, mejora la actividad biológica y reduce la inmunogenicidad de estos (Hymel *et al.*, 2024).

2.2.9 Análisis por UV-Vis y dicroísmo circular de plcat1lat y plcat2lat

Con la finalidad de determinar la presencia de alfa hélices en ambos péptidos, los análisis de UV-Vis fueron realizados en el Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC), Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Se enviaron seis viales eppendorf conteniendo cada uno aproximadamente 1.5 ml de cada péptido, correctamente rotulados (plcat1lat, plcat2lat) por triplicado. El equipamiento utilizado consistió en un espectrofotómetro de absorción UV-visible Shimadzu 1800 y un espectropolarímetro Jasco J-810.

Las muestras originales fueron analizadas por UV-visibles, para lo cual fue necesario realizar medidas de espectroscopia de absorción y obtener muestras adecuadas para realizar las medidas de dicroísmo circular (CD). Las condiciones de espectroscopia fueron:

- Rango de longitud de ondas (nm.): 190.00 a 300.00
- Velocidad de escaneo: Rápido
- Intervalo de muestreo: 1,0
- Modo de Escaneo: Único

- Celda: Cuarzo con paso óptico 10 mn

Posteriormente se tomó 1 ml de cada péptido y se lo diluyó a un volumen final de 5 ml con agua Milli Q. Las soluciones obtenidas se analizaron por CD, con las siguientes condiciones:

- Ancho de banda: 1 nm
- Respuesta: 4 segundos
- Sensibilidad: Estándar
- Rango de medida: 400 - 210 nm
- Intervalo de toma de datos: 0.2nm
- Velocidad de escaneo: 100 nm/min
- Accumulaciones: 4
- Celda: Cuarzo con paso óptico de 5mn.

Una vez obtenidos los resultados se analizaron los cromatogramas, distinguiendo la presencia de picos positivos y negativos, así como sus rangos de ocurrencia.

2.2.10 Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos que se realizaron para determinar relaciones evolutivas/estructurales estuvieron basados en filogenia convencional y filogenia estructural. En el primer tipo de filogenia, se incluyeron las secuencias en formato .FASTA de plcat1lat y plcat2lat. Para la filogenia estructural se utilizaron los archivos .PDB de ambos péptidos. En ambos tipos de filogenias se incluyeron en formato correspondiente una lista de especies (Tabla 7) producto de un BLAST en UNIPROT ([UniProt](#)), donde se seleccionaron aquellas secuencias que tuviesen un porcentaje de similitud ≥ 80 % y que además tuvieran una estructura terciaria con una Prueba de diferencia de distancia local prevista (pLDDT) > 40 (Moi *et al.*, 2023). La pLDDT es una medida usada por AlphaFold para indicar la confiabilidad de las estructuras de las proteínas predichas. Altos puntajes de pLDDT indican alta confiabilidad y precisión de la predicción.

Tabla 7. Secuencias genéticas incluidas en los análisis filogenéticos secuenciales y estructurales de *plcat1lat* y *plcat2lat*. **CATH:** Catelicidina. **CATH-like:** Similar a catelicidina. **CAMP:** Catelicidina antimicrobiana. **Protegrina-like:** Similar a protegrina.

Clase	Catelicidina	Especie	Identificador secuencia .FASTA	Identificador archivo .PDB	
Sauropsida	CATH1	<i>A. sinensis</i>	A0A1U7S6I2	AF-A0A1U7S6I2-F1	
	CATH2	<i>A. mississippiensis</i>	A0A1U7S9K4	AF-A0A1U7S9K4-F1	
	CATH2-like	<i>Pelodiscus sinensis</i>	A0A151P444	AF-A0A151P444-F1	
	CATH3-like	<i>Terrapene triunguis</i>	K7GI28	AF-K7GI28-F1	
	CATH5	<i>Alligator sinensis</i>	A0A674IR34	AF-A0A674IR34-F1	
	CAMP	<i>Crotalus durissus cascavella</i>	A0A1U7RV49	AF-A0A1U7RV49-F1	
		<i>Pseudonaja textiles</i>	U5KJJ0	AF-U5KJJ0-F1	
		<i>Naja atra</i>	U5KJJ1	AF-U5KJJ1-F1	
		<i>Ophiophagus hannah</i>	U5KJM6	AF-U5KJM6-F1	
		<i>A. mississippiensis</i>	B6S2X0	AF-B6S2X0-F1	
			B6S2X2	AF-B6S2X2-F1	
			A0A151P4V6	AF-A0A151P4V6-F1	
			A0A151P502	AF-A0A151P502-F1	
			A0A670JQ75	AF-A0A670JQ75-F1	
			A0A670JNR3	AF-A0A670JNR3-F1	
	Vipericina	<i>Podarcis muralis</i>	A0A670JL75	AF-A0A670JL75-F1	
			A0A670JMF1	AF-A0A670JMF1-F1	
		<i>Notechis scutatus</i>	A0A670JMF1	AF-A0A670JMF1-F1	
		<i>Pantherophis guttatus</i>	A0A611VQM7	AF-A0A611VQM7-F1	
		<i>Thamnophis sirtalis</i>	A0A6P9AWF8	AF-A0A6P9AWF8-F1	
			A0A619Y4P1	AF-A0A619Y4P1-F1	
		<i>Python bivittatus</i>	A0A2P1AGD5	AF-A0A2P1AGD5-F1	
		<i>Thamnophis sirtalis</i>	A0A619YV49	AF-A0A619YV49-F1	
		<i>Notechis scutatus</i>	A0A6J1W4P4	AF-A0A6J1W4P4-F1	
		<i>Thamnophis sirtalis</i>	A0A619XUE0	AF-A0A619XUE0-F1	
			A0A6J1VZF3	AF-A0A6J1VZF3-F1	
		<i>Pantherophis guttatus</i>	A0A6P9AV67	AF-A0A6P9AV67-F1	
			A0A6P9AUW9	AF-A0A6P9AUW9-F1	
		<i>Thamnophis sirtalis</i>	A0A619XF15	AF-A0A619XF15-F1	
		<i>Pseudonaja textilis</i>	A0A670ZGT4	AF-A0A670ZGT4-F1	
		<i>Bungarus fasciatus</i>	B6D434	AF-B6D434-F1	
		<i>Chelonia mydas</i>	M7AXN0	AF-M7AXN0-F1	
		<i>Pogona vitticeps</i>	A0A6J0U5I8	AF-A0A6J0U5I8-F1	
		<i>Anolis carolinensis</i>	H9GST0	AF-H9GST0-F1	
		<i>Pogona vitticeps</i>	A0A6J0U7I6	AF-A0A6J0U7I6-F1	
		<i>Podarcis muralis</i>	A0A670JQ31	AF-A0A670JQ31-F1	
		<i>Pelodiscus sinensis</i>		K7FKZ5	AF-K7FKZ5-F1
				K7FKZ8	AF-K7FKZ8-F1
				K7GID5	AF-K7GID5-F1
				H9GBP9	AF-H9GBP9-F1
				A0A803TW99	AF-A0A803TW99-F1
		<i>Anolis carolinensis</i>			
		Batroxicidina	<i>Bothrops atrox</i>	U5KJC9	AF-U5KJC9-F1
	Lutzicidina	<i>Bothrops lutzi</i>	U5KJT7	AF-U5KJT7-F1	
	Lachesicidina	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	U5KJZ2	AF-U5KJZ2-F1	
	Crotalicidina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	U5KJM4	AF-U5KJM4-F1	
	Proteína no caracterizada	<i>Alligator sinensis</i>	A0A1U7RNC3	AF-A0A1U7RNC3-F1	
<i>Chelonia mydas</i>		M7BBJ0	AF-M7BBJ0-F1		
<i>Pelodiscus sinensis</i>		K7FPA2	AF-K7FPA2-F1		
<i>Gopherus agassizii</i>		A0A452GHE6	AF-A0A452GHE6-F1		
Aves	CATH1	<i>Cephus grylle</i>	A0A7L3R9T9	AF-A0A7L3R9T9-F1	
	CATH2	<i>Nothoprocta ornata</i>	A0A7K7B7Z3	AF-A0A7K7B7Z3-F1	
		<i>Crypturellus soui</i>	A0A7K4KQ66	AF-A0A7K4KQ66-F1	
		<i>Crypturellus undulatus</i>	A0A7K4M140	AF-A0A7K4M140-F1	
		<i>Gallus gallus</i>	Q2IAL7	AF-Q2IAL7-F1	
		<i>Phasianus colchicus</i>	A0A669QJY7	AF-A0A669QJY7-F1	
		<i>Glaucidium brasilianum</i>	A0A7L0S204	AF-A0A7L0S204-F1	
		<i>Caloenas nicobarica</i>	A0A7K6SVC5	AF-A0A7K6SVC5-F1	
		<i>Alopecoenas beccarii</i>	A0A7L4F4N0	AF-A0A7L4F4N0-F1	
		<i>Columba livia</i>	A0A0H3YPL2	AF-A0A0H3YPL2-F1	
		<i>Indicator maculatus</i>	A0A7L1GF20	AF-A0A7L1GF20-F1	
		<i>Onychorhynchus coronatus</i>	A0A7K6A748	AF-A0A7K6A748-F1	
		<i>Furnarius figulus</i>	A0A7K5BES6	AF-A0A7K5BES6-F1	
		<i>Leptocoma aspasia</i>	A0A7L0UZ62	AF-A0A7L0UZ62-F1	
		<i>Gymnorhina tibicen</i>	A0A7L1AL80	AF-A0A7L1AL80-F1	
		<i>Elachura formosa</i>	A0A851UUQ5	AF-A0A851UUQ5-F1	
		<i>Sylvia atricapilla</i>	A0A7K7EG89	AF-A0A7K7EG89-F1	
		<i>Certhia familiaris</i>	A0A851SPQ2	AF-A0A851SPQ2-F1	
		<i>Chloropsis hardwickii</i>	A0A850VDD6	AF-A0A850VDD6-F1	
		<i>Vidua chalybeata</i>	A0A851KXP8	AF-A0A851KXP8-F1	

		<i>Peucedramus taeniatus</i>	A0A852FVL9	AF-A0A852FVL9-F1
		<i>Prunella himalayana</i>	A0A7K5R5L8	AF-A0A7K5R5L8-F1
		<i>Prunella fulvescens</i>	A0A7L2ZQW4	AF-A0A7L2ZQW4-F1
		<i>Taeniopygia guttata</i>	A0A674GXT6	AF-A0A674GXT6-F1
		<i>Hypocryptadius cinnamomeus</i>	A0A7L2PTG3	AF-A0A7L2PTG3-F1
		<i>Loxia curvirostra</i>	A0A7K7IY58	AF-A0A7K7IY58-F1
		<i>Motacilla alba</i>	A0A7K5CJP4	AF-A0A7K5CJP4-F1
		<i>Nesospiza acunhae</i>	A0A7K7RW29	AF-A0A7K7RW29-F1
		<i>Setophaga kirtlandii</i>	A0A7L0Q8H2	AF-A0A7L0Q8H2-F1
		<i>Melospiza melodia</i>	A0A7K4PRP0	AF-A0A7K4PRP0-F1
		<i>Emberiza fucata</i>	A0A7K4VSW0	AF-A0A7K4VSW0-F1
		<i>Rhodinocichla rosea</i>	A0A7K8S0I1	AF-A0A7K8S0I1-F1
		<i>Sitta europaea</i>	A0A7L1UTZ5	AF-A0A7L1UTZ5-F1
		<i>Locustella ochotensis</i>	A0A7L1SEV5	AF-A0A7L1SEV5-F1
		<i>Alaudala cheleensis</i>	A0A7L2BRR9	AF-A0A7L2BRR9-F1
		<i>Cnemophilus loriae</i>	A0A7K8AWG0	AF-A0A7K8AWG0-F1
		<i>Thryothorus ludovicianus</i>	A0A7K7Z3D0	AF-A0A7K7Z3D0-F1
		<i>Oxyabes madagascariensis</i>	A0A7L2R2N6	AF-A0A7L2R2N6-F1
		<i>Eulacestoma nigropectus</i>	A0A7K8CTB6	AF-A0A7K8CTB6-F1
		<i>Bombycilla garrulus</i>	A0A7L1MT11	AF-A0A7L1MT11-F1
		<i>Dasyornis broadbenti</i>	A0A7K6HT88	AF-A0A7K6HT88-F1
		<i>Erythrocerus mcallii</i>	A0A7K5PQZ7	AF-A0A7K5PQZ7-F1
		<i>Sylvietta virens</i>	A0A7L0LLH8	AF-A0A7L0LLH8-F1
		<i>Panurus biarmicus</i>	A0A7K6MTK3	AF-A0A7K6MTK3-F1
		<i>Callaeas wilsoni</i>	A0A7L4KSN4	AF-A0A7L4KSN4-F1
		<i>Aphelocoma coerulescens</i>	A0A7K7BU44	AF-A0A7K7BU44-F1
		<i>Rhabdornis inornatus</i>	A0A7K9KQP7	AF-A0A7K9KQP7-F1
		<i>Cinclus mexicanus</i>	A0A7L2JK02	AF-A0A7L2JK02-F1
		<i>Pomatorhinus ruficollis</i>	A0A7L4JFM7	AF-A0A7L4JFM7-F1
		<i>Falcunculus frontatus</i>	A0A7K6LJS6	AF-A0A7K6LJS6-F1
		<i>Grantiella picta</i>	A0A7K6ELX9	AF-A0A7K6ELX9-F1
		<i>Dicrurus megarhynchus</i>	A0A7L0A661	AF-A0A7L0A661-F1
	CATH2-like	<i>Aythya fuligula</i>	A0A6J3CP19	AF-A0A6J3CP19-F1
		<i>Crotophaga sulcirostris</i>	A0A7K5I8Y5	AF-A0A7K5I8Y5-F1
		<i>Gallus gallus</i>	Q2IAL6	AF-Q2IAL6-F1
		<i>Patagioenas fasciata monilis</i>	A0A1V4J7H8	AF-A0A1V4J7H8-F1
		<i>Caloenas nicobarica</i>	A0A7K6SU81	AF-A0A7K6SU81-F1
		<i>Alopecoenas beccarii</i>	A0A7L4F5H3	AF-A0A7L4F5H3-F1
		<i>Spizaetus tyrannus</i>	A0A7L0CKI0	AF-A0A7L0CKI0-F1
		<i>Pluvianellus socialis</i>	A0A7L3DQQ9	AF-A0A7L3DQQ9-F1
		<i>Glaucidium brasilianum</i>	A0A7L0S3L0	AF-A0A7L0S3L0-F1
		<i>Cochlearius cochlearius</i>	A0A7K8PZZ5	AF-A0A7K8PZZ5-F1
		<i>Balaeniceps rex</i>	A0A7L2UQD4	AF-A0A7L2UQD4-F1
	CATH3-like	<i>Aythya fuligula</i>	A0A6J3CE18	AF-A0A6J3CE18-F1
	CATH	<i>Coturnix japonica</i>	A0A1Q2TSE5	AF-A0A1Q2TSE5-F1
	CAMP	<i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i>	A0A663FBM0	AF-A0A663FBM0-F1
	Proteína no caracterizada	<i>Meleagris gallopavo</i>	G1MVF1	AF-G1MVF1-F1
		<i>Odocoileus virginianus texanus</i>	A0A6J0ZCZ2	AF-A0A6J0ZCZ2-F1
	CATH2	<i>Bos taurus</i>	P19660	AF-P19660-F1
		<i>Bos mutus</i>	L8HMX5	AF-L8HMX5-F1
		<i>Bison bison bison</i>	A0A6P3J7T2	AF-A0A6P3J7T2-F1
	CATH3	<i>Bos mutus</i>	L8HLN9	AF-L8HLN9-F1
		<i>Camelus ferus</i>	S9XBT5	AF-S9XBT5-F1
	CATH3-like	<i>Lipotes vexillifer</i>	A0A340WCK1	AF-A0A340WCK1-F1
	CATH4	<i>Cervus hanglu yarkandensis</i>	A0A833SBW7	AF-A0A833SBW7-F1
	CATH4-like	<i>Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis</i>	A0A341BYW4	AF-A0A341BYW4-F1
		<i>Muntiacus reevesi</i>	A0A5N3XW86	AF-A0A5N3XW86-F1
		<i>Bison bison bison</i>	A0A6P3JB74	AF-A0A6P3JB74-F1
		<i>Bos mutus grunniens</i>	A0A097ITK0	AF-A0A097ITK0-F1
		<i>Bos taurus</i>	P54228	AF-P54228-F1
		<i>Bos mutus</i>	L8HMa4	AF-L8HMa4-F1
		<i>Bos indicus x Bos taurus</i>	A0A4W2BU30	AF-A0A4W2BU30-F1
		<i>Camelus ferus</i>	S9XMK0	AF-S9XMK0-F1
	CATH6-like	<i>Odocoileus virginianus texanus</i>	A0A6J0ZDR8	AF-A0A6J0ZDR8-F1

	<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i>	A0A452C7A1	AF-A0A452C7A1-F1	
	<i>Delphinapterus leucas</i>	A0A7F8K2X6	AF-A0A7F8K2X6-F1	
		A0A7F8KAY7	AF-A0A7F8KAY7-F1	
	<i>Monodelphis domestica</i>	A0A5F8GP44	AF-A0A5F8GP44-F1	
		K7E365	AF-K7E365-F1	
CATH7-like	<i>Odocoileus virginianus texanus</i>	A0A6J0ZBV9	AF-A0A6J0ZBV9-F1	
CATH18	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	P25230	AF-P25230-F1	
Protegrina2-like	<i>Vicugna pacos</i>	A0A6J3B614	AF-A0A6J3B614-F1	
Protegrina5-like	<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i>	A0A383ZS81	AF-A0A383ZS81-F1	
Vipericina	<i>Delphinapterus leucas</i>	A0A2Y9NC06	AF-A0A2Y9NC06-F1	
	<i>Loxodonta africana</i>	G3UA57	AF-G3UA57-F1	
CAMP	<i>Fukomys damarensis</i>	A0A091DS15	AF-A0A091DS15-F1	
	<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	A0A619LNS4	AF-A0A619LNS4-F1	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	G1T9L4	AF-G1T9L4-F1	
	<i>Neovison vison</i>	U6CSV2	AF-U6CSV2-F1	
	<i>Trichechus manatus latirostris</i>	A0A2Y9D6N3	AF-A0A2Y9D6N3-F1	
		A0A2Y9R4G3	AF-A0A2Y9R4G3-F1	
		G3SUH7	AF-G3SUH7-F1	
		G3UBB9	AF-G3UBB9-F1	
		A0A7E6E3Y9	AF-A0A7E6E3Y9-F1	
		A0A6J2M814	AF-A0A6J2M814-F1	
		<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	A0A671ENA0	AF-A0A671ENA0-F1
		<i>Myotis myotis</i>	A0A7J7UBJ1	AF-A0A7J7UBJ1-F1
		<i>Myotis davidii</i>	L5LFA3	AF-L5LFA3-F1
		<i>Ovis aries</i>	P49928	AF-P49928-F1
		<i>Delphinapterus leucas</i>	A0A2Y9NI68	AF-A0A2Y9NI68-F1
	CAMP-like	<i>Phascolarctos cinereus</i>	A0A6P5LDT9	AF-A0A6P5LDT9-F1
<i>Trichechus manatus latirostris</i>		A0A2Y9QK17	AF-A0A2Y9QK17-F1	
Proteína no caracterizada		F7A8G5	AF-F7A8G5-F1	
		F7D165	AF-F7D165-F1	
	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	F7ARW0	AF-F7ARW0-F1	
		A0A6I8PM85	AF-A0A6I8PM85-F1	
	<i>Bos taurus</i>	E1B8Q6	AF-E1B8Q6-F1	
	<i>Loxodonta africana</i>	G3TU61	AF-G3TU61-F1	

Para la filogenia convencional, se utilizó el servidor web IQ-TREE (Trifinopoulos *et al.*, 2016); que permite hacer inferencias filogenéticas, análisis rápido de grandes conjuntos de datos y utilizar plataformas informáticas de alto rendimiento, facilita la inclusión de nuevos modelos (filogenómicos) y tipos de datos de secuencias e implementa una amplia gama de análisis de máxima verosimilitud de uso común.

Previo a la inferencia del árbol, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) utilizando MAFFT (Kato *et al.*, 2019). Luego, dicho alineamiento fue visualizado y editado en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). También, el modelo de sustitución de nucleótidos mejor ajustado para la filogenia convencional se obtuvo utilizando IQ-TREE selección de modelo (Trifinopoulos *et al.*, 2016) considerando el criterio de información de AIC y Bayesiano (BIC).

Para realizar las filogenias estructurales se utilizó FoldTree (https://github.com/DessimozLab/fold_tree?tab=readme-ov-file, Moi *et al.*,

2023). Este repositorio crea árboles filogenéticos a partir del alineamiento de estructuras proteicas y la generación de matrices de distancias utilizando Foldseek, el cual es un programa informático que permite comparar grandes conjuntos de estructuras de proteínas utilizando diversas bases de datos y parámetros (Van Kempen *et al.*, 2024). Tal como se mencionó anteriormente las secuencias utilizadas en este tipo de filogenia fueron las mismas que se utilizaron en la filogenia convencional, con la excepción de que los archivos de entrada no son secuencias FASTA sino archivos de coordenadas PDB. Luego, la visualización de los árboles obtenidos y la comparación de las topologías se realizó con Phylo.io (<https://beta.phylo.io/viewer/>).

2.3 Resultados

2.3.1 Potencial antibacteriano predicho y otras propiedades relevantes de plcat1lat y plcat2lat

La ubicación de los péptidos plcat1lat y plcat2lat, así como su sentido de inserción en el genoma de *C. latirostris* fueron determinados. Ambos se encuentran en la región que comprende los 30 mil pares de bases (pb) y se insertan en el mismo sentido (Tabla 8). Igualmente, mediante predictores se determinó que plcat1lat posee potencial antimicrobiano y antiviral; mientras que plcat2lat es antimicrobiano, anticancerígeno y antiviral. Además, se estableció que la actividad hemolítica es mayor en plcat1lat en comparación a plcat2lat (Tabla 8).

Tabla 8. Propiedades terapéuticas predichas de los péptidos plcat1lat y plcat2lat.

	plcat1lat	plcat2lat
Ubicación en genoma <i>C. latirostris</i> (pb)	39959-37667	31347-28004
Sentido inserción	3'-5'	3'-5'
Potencial AMPA (%) *	6	2
Potencial CAMP_{R4} **	0.93	0.93
Happen **	0.828	0.046
Ennaact **	0.096	1.0
Ennavia **	0.99	1.0

Potencial AMPA:** hace referencia al valor de probabilidad de clasificación errónea, es decir, la probabilidad de que la región predicha se encuentre por casualidad en una proteína no antimicrobiana. *Potencial** antimicrobiano según **CAMP_{R4}**, actividad hemolítica según **Happen**, potencial anticancerígeno de acuerdo con **Ennaact** y antiviral por **Ennavia**; en estos potenciales la proximidad al valor 1 indica una mayor probabilidad de la acción predicha

2.3.2 Propiedades fisicoquímicas de plcat1lat y plcat2lat

Las propiedades fisicoquímicas de plcat1lat y plcat2lat demostraron ser similares para los valores de punto isoeléctrico, carga, momento hidrofóbico, hidrofobicidad y acidez (Tabla 9). Mientras que el peso molecular de plcat1lat resultó ser mayor al de plcat2lat. También, entre ambos péptidos el porcentaje de aminoácidos básicos fue mayor en plcat2lat y el porcentaje de aminoácidos neutros fue mayor en plcat1lat, así como la cantidad de aminoácidos que favorecen al desorden de la estructura.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la región madura de los péptidos plcat1lat y plcat2lat.

	plcat1lat	plcat2lat
Longitud péptido maduro (aminoácidos)	19	12
Aminoácidos que favorecen desorden	8	7
Peso molecular (g/mol)	2342.86	1487.87
Punto isoeléctrico	12.247	11.39
Carga	5.0	6.0
Momento hidrofóbico (μH)	0.355	0.562
Hidrofobicidad (H)	0.524	0.4167
Acidez (%)	0	0
Basicidad (%)	26.316	50
Neutralidad (%)	26.32	8.33

2.3.3 Regiones de plcat1lat y plcat2lat

La longitud total de plcat1lat fue de 166 aminoácidos y de plcat2lat 158 aminoácidos. Las regiones correspondientes al péptido señal, dominio y sitios de escisión por elastasa se determinaron en ambos péptidos (Tabla 10). El péptido señal, tanto en plcat1lat y plcat2lat, se encontró entre los primeros 30 pb, seguido por el dominio catelina de aproximadamente 100 pb. Respecto a los sitios de escisión por elastasa, se encontraron 35 sitios en plcat1lat y 29 en plcat2lat. La región del sitio maduro (ó sitio activo) en ambos péptidos coincidió con el sitio de corte de elastasa, ubicado uno o dos residuos antes de iniciar la región madura del péptido.

Tabla 10. Regiones de las secuencias aminoacídicas de plcat1lat y plcat2lat.

	Región (pb)			Sitios de escisión por elastasa (pb)
	Péptido señal	Dominio "catelina"	Péptido maduro	
plcat1lat	1-32	40-140	145-163	35 (2, 9, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 38, 40, 47, 49, 50, 51, 52, 64, 70, 83, 97, 103, 114, 122, 129, 132, 144, 147, 152, 156)
plcat2lat	1-22	32-132	138-153	29 (13, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 34, 39, 40, 43, 44, 56, 62, 74, 75, 82, 86, 90, 106, 121, 123, 124, 136, 145, 149, 153)

2.3.4 Desempeño de los péptidos en membranas y micelas bacterianas

El comportamiento y desempeño de los péptidos plcat1lat y plcat2lat fue similar entre la misma especie de bacteria, ya sea Gram negativa o Gram positiva (Tabla 11). No se evidenció un comportamiento diferencial de los péptidos de acuerdo con el tipo de membrana (interna o externa). De esta manera, plcat1lat demostró ser más hidrofóbico, pero posee el potencial de insertarse en la membrana bacteriana con un menor ángulo de inclinación que plcat2lat. Además, plcat1lat resultó tener una mayor energía de transferencia (energía libre de Gibbs) en membranas curvas, planas y micelas en comparación al plcat2lat. No obstante, plcat2lat, también presenta valores negativos de energía de transferencia, lo cual favorece la interacción del péptido con distintos tipos de membranas.

Tabla 11. Predicción del comportamiento de plcat1lat y plcat2lat en membranas Gram positivas, Gram negativas y micelas bacterianas.

Condición	Péptido	Profundidad/espesor hidrofóbico (Å)	Ángulo de inclinación	Transferencia de ΔG (membrana curva) (kcal/mol)	Transferencia de ΔG (membrana plana) (kcal/mol)
Membrana interna Gram negativa	plcat1lat	4.2	67°	-8.2	-8.2
	plcat2lat	2.9	89°	-5.2	-4.8
Membrana externa Gram negativa	plcat1lat	4.2	66°	-8.2	-8.2
	plcat2lat	2.4	90°	-5.3	-4.9
Membrana interna Gram positiva	plcat1lat	3.8	65°	-8.2	-8.2
	plcat2lat	2.6	90°	-5.2	-4.9
Micela	plcat1lat	N/A	N/A	-6.9	N/A
	plcat2lat	N/A	N/A	-5.1	N/A

2.3.6 Validación de la estructura tridimensional de los péptidos plcat1lat y plcat2lat

Las estructuras tridimensionales de los péptidos plcat1lat y plcat2lat fueron validadas para asegurar la estabilidad energética de éstas, predecir su desempeño, y determinar los aspectos que podrían optimizarse en estos.

En la validación del péptido plcat1lat (Tabla 12), los criterios evaluados resultaron ser buenos, pero no óptimos. La puntuación MolProbity resultó alta en comparación al valor del mismo criterio en plcat2lat, indicando interferencias estructurales que deben ser optimizadas. Además, en el estudio de Ramachandran se determinaron tres residuos que pueden generar inestabilidad en la estructura del péptido, estos son no favorecidos energéticamente (RNF), los cuales fueron: A2 arginina, A3 valina, A4 asparagina.

También, la estructura presentó enlaces no favorecidos (ENF), que también generan inestabilidad en el péptido: A2 arginina-A3 valina, A6 prolina, A14 arginina-A15 fenilalanina, A11 treonina-A12 valina, A3 valina-A4 asparagina, A16 leucina-A17 prolina, A5 triptófano-A6 prolina, A10 arginina-A11 treonina, A1 lisina-A2 arginina, A17 prolina, A17 prolina-A18 tirosina. Así como también ángulos de torsión no favorecidos (ATNF): (A1 lisina-A2 arginina), (A2 arginina-A3 valina), (A3 valina-A4 asparagina), (A17 prolina-A18 tirosina), (A4 asparagina-A5 triptófano).

Los resultados de los criterios de validación para el péptido plcat2lat (Tabla 12) resultaron mejores en comparación a los de plcat1lat, debido a que la puntuación MolProbity fue menor y no presentó RNF. Además, los ENF (A1 arginina-A2 lisina, A6 lisina-A7 lisina, A9 leucina-A10 lisina, A3 lisina-A4 fenilalanina, A7 lisina-A8 valina) al igual que los ATNF (A1 arginina-A2 lisina), (A5 triptófano-A6 lisina) resultaron ser menores en número en comparación a los obtenidos para plcat1lat.

Tabla 12. Criterios para la validación de las estructuras tridimensionales de plcat1lat y plcat2lat.

Criterios	plcat1lat	plcat2lat	Estimado
Puntuación MolProbity	2,76	1,46	Menor valor posible
RF	76,47 %	100 %	≥ 98%
RNF	17,65 %	0 %	≤ 0.05%
Rotámeros atípicos	0 %	0 %	≤ 0.3%
ENF	11/71	5/107	< 0.01%
ATNF	8/231	4/138	< 0.1%

2.3.7 Dicroísmo circular de plcat1lat y plcat2lat

Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia de ambos péptidos en yacaré overo. Sin embargo, en los espectros de absorción UV-visibles de los péptidos sintetizados y reconstituidos en el solvente indicado, dimetilsulfóxido (DMSO) (ver Anexo), se obtuvo que en el rango de medición las muestras presentaron absorbancias que superaban el límite de medida del espectropolarímetro (abs: 03-06) debido al DMSO. En consecuencia, los espectros de CD de ambos péptidos se midieron entre 190 y 400 nm. Además, las muestras debieron ser diluidas 5 veces y el paso óptico de la celda fue de 5 mm.

En el cromatograma de plcat1lat (Figura 18A), se observaron fluctuaciones significativas entre 210 nm y 250 nm, con picos tanto positivos como negativos, lo que sugiere la presencia estructural de alfa hélice en el péptido. Igualmente, el cromatograma de plcat2lat (Figura 18B) sugiere la presencia de alfa hélice, con picos negativos entre 210 y 240 nm, seguido de picos positivos alrededor de 230-240 nm, para luego estabilizarse alrededor de 0 mdeg con fluctuaciones menores, lo que podría indicar que la mayoría de las características estructurales relevantes se encuentran por debajo de esta longitud de onda.

Tanto plcat1lat como plcat2lat poseen características que sugieren la presencia de estructuras de alfa hélice, lo cual coincide con las predicciones bioinformáticas obtenidas, con algunas diferencias en la magnitud y presencia de picos positivos y/o negativos. Detalladamente, plcat1lat tiene un pico negativo más profundo, alcanzando casi -20 mdeg, mientras que plcat2lat tiene

un pico negativo menos profundo, alcanzando casi -10 mdeg. Además, este último, presenta un pico positivo alrededor de 230-240 nm, el cual no se observa en plcat1lat (Figura 17).

También, es importante señalar que a pesar de que ambos péptidos se estabilizan después de 240 nm, plcat1lat muestra más fluctuaciones negativas comparado con plcat2lat, que se estabiliza alrededor de 0 mdeg (Figura 17).

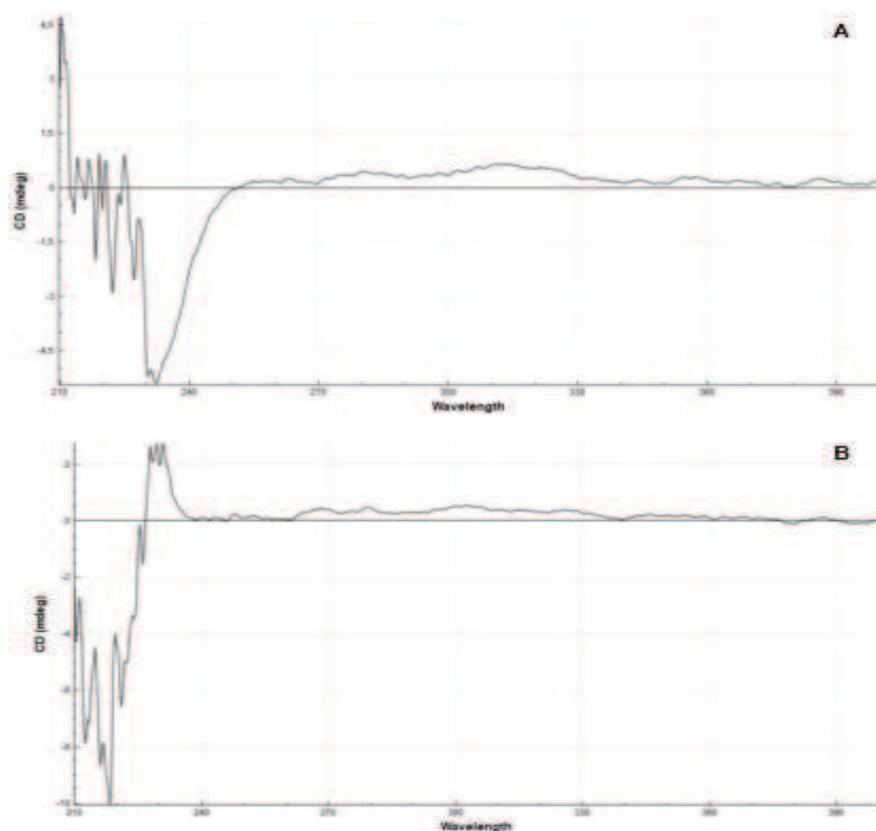
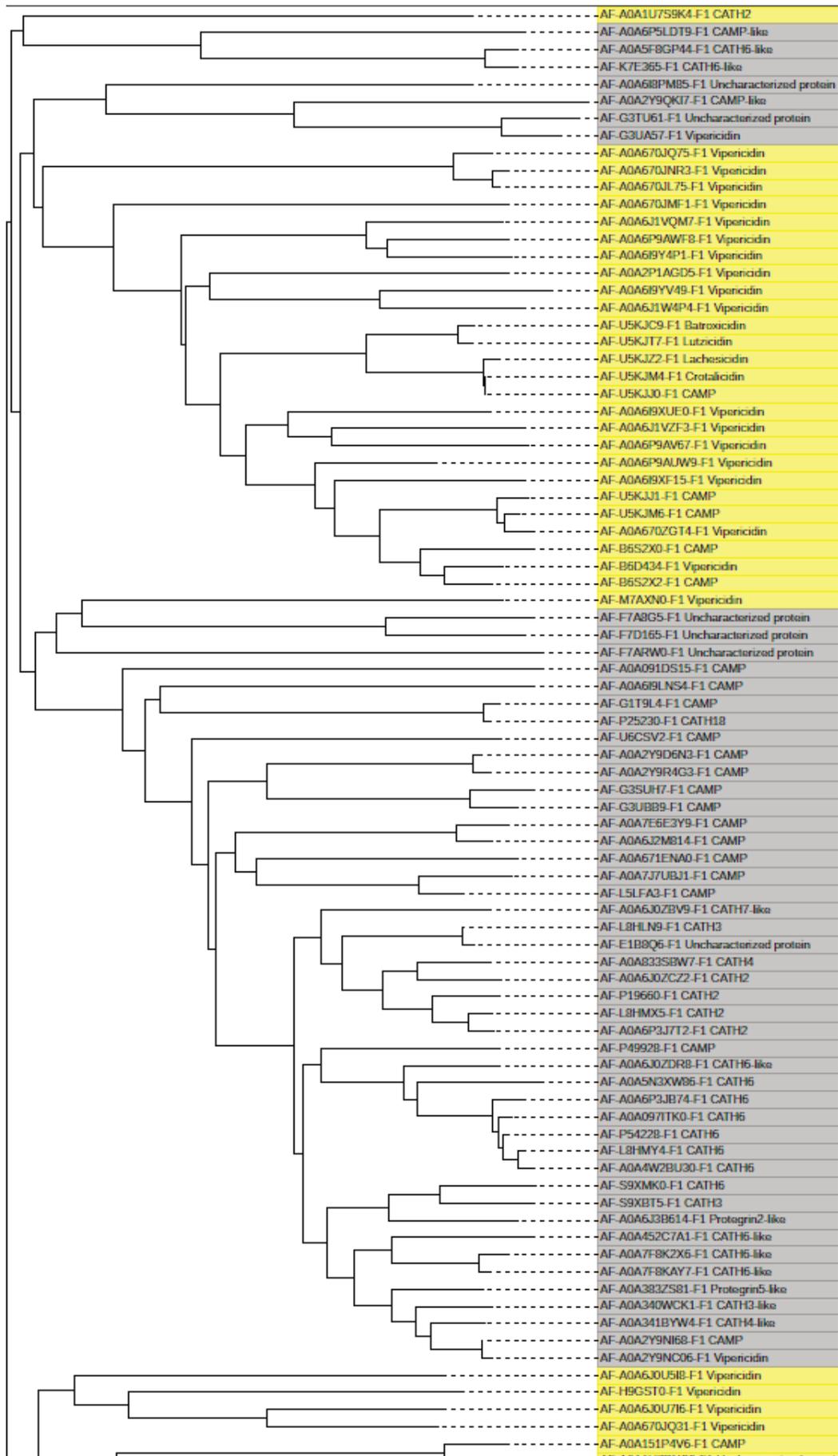


Figura 17. Cromatogramas de **A.** plcat1lat y **B.** plcat2lat, donde se refleja la presencia de alfa hélices a través de picos negativos entre el rango de 190 y 250 nm.

2.3.8 Análisis filogenéticos

En la filogenia estructural obtenida (Figura 18), parte de las especies pertenecientes a la clase Sauropsida se agrupó con las especies pertenecientes a la clase Mamíferos. Igualmente, otra parte de las especies Sauropsida se agrupó con las especies de la clase Aves. En este último grupo, se ubicaron plcat1lat y plcat2lat. Particularmente, plcat1lat se encontró más próximo al péptido antimicrobiano catelicidina (AF-A0A151P502-F1) de *A.*

mississippiensis, mientras que *plcat2lat* se agrupó con la catelicidina-5 (AF-A0A1U7RV49-F1) de *A. sinensis*.



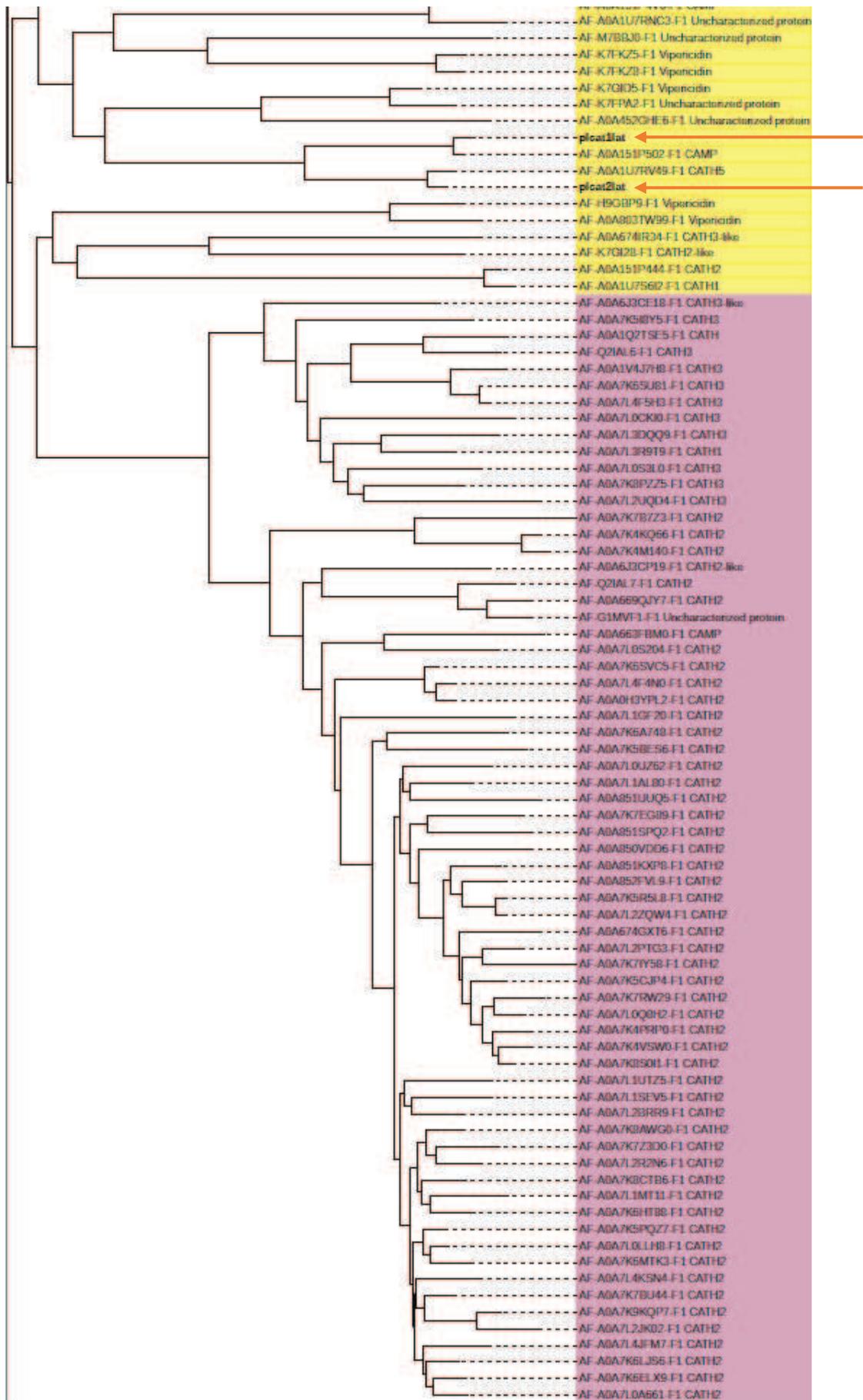
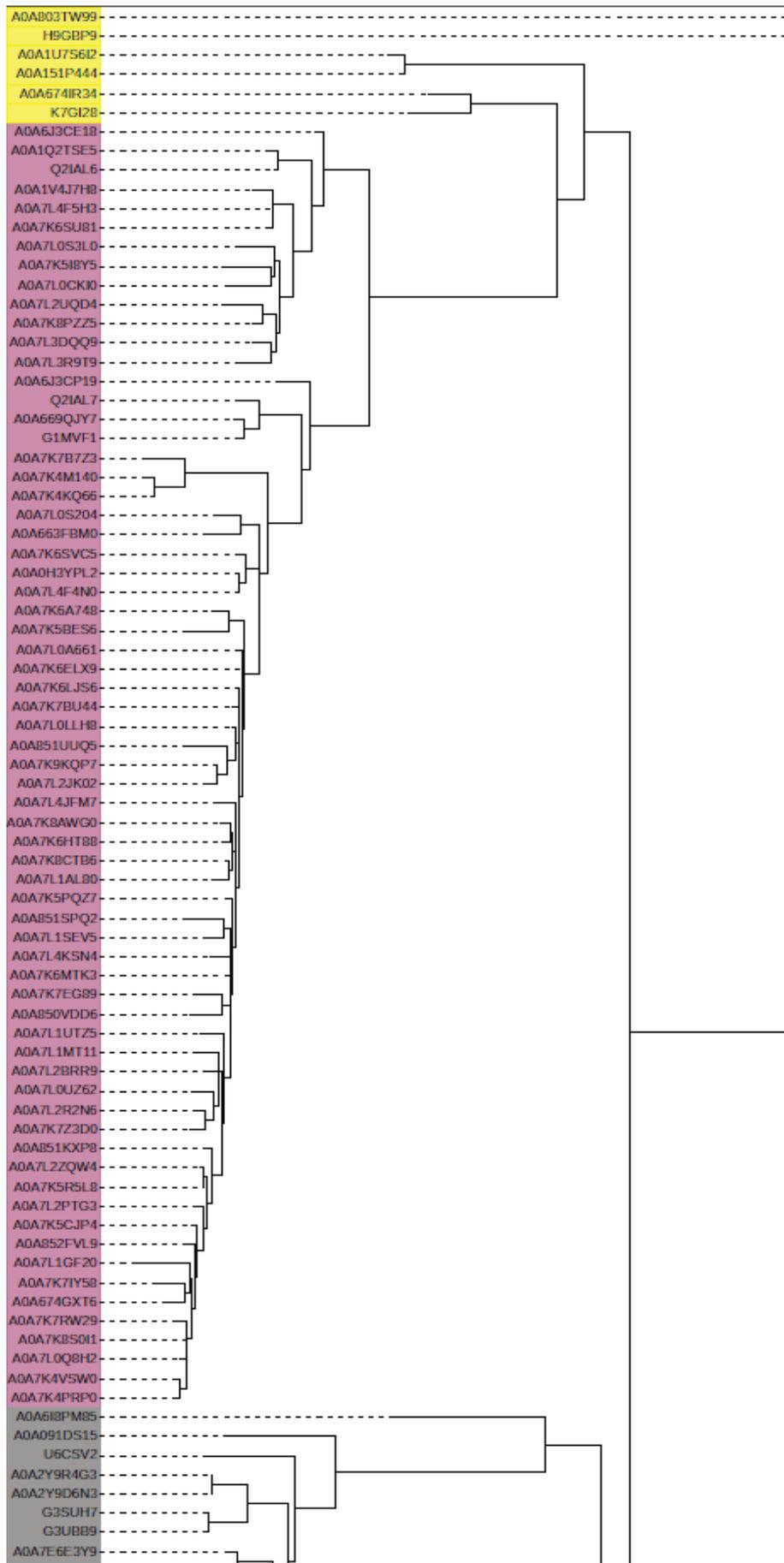


Figura 18. Árbol estructural de catelicidinas, donde se incluye pIcat1lat y pIcat2lat (señalados)

con flechas). Estos se encuentran ubicados en el grupo de los saurópsidos junto a las cateligidinas de las aves.

Igualmente, la filogenia convencional (Figura 19) demostró que un grupo de las especies pertenecientes a la clase Sauropsida se agrupó con las especies de la clase Aves y otra parte de los Sauropsida se ubicó en el mismo nodo que las especies de la clase Mamíferos. En este último nodo, se ubicaron plcat1lat y plcat2lat. También, a diferencia de la filogenia estructural, plcat2lat se encontró más próximo tanto a la cateligidina (AF-A0A151P502-F1) de *A. mississippiensis* como a la cateligidina-5 (AF-A0A1U7RV49-F1) de *A. sinensis*, y plcat1lat se ubicó en una rama distinta al resto de las secuencias mencionadas.



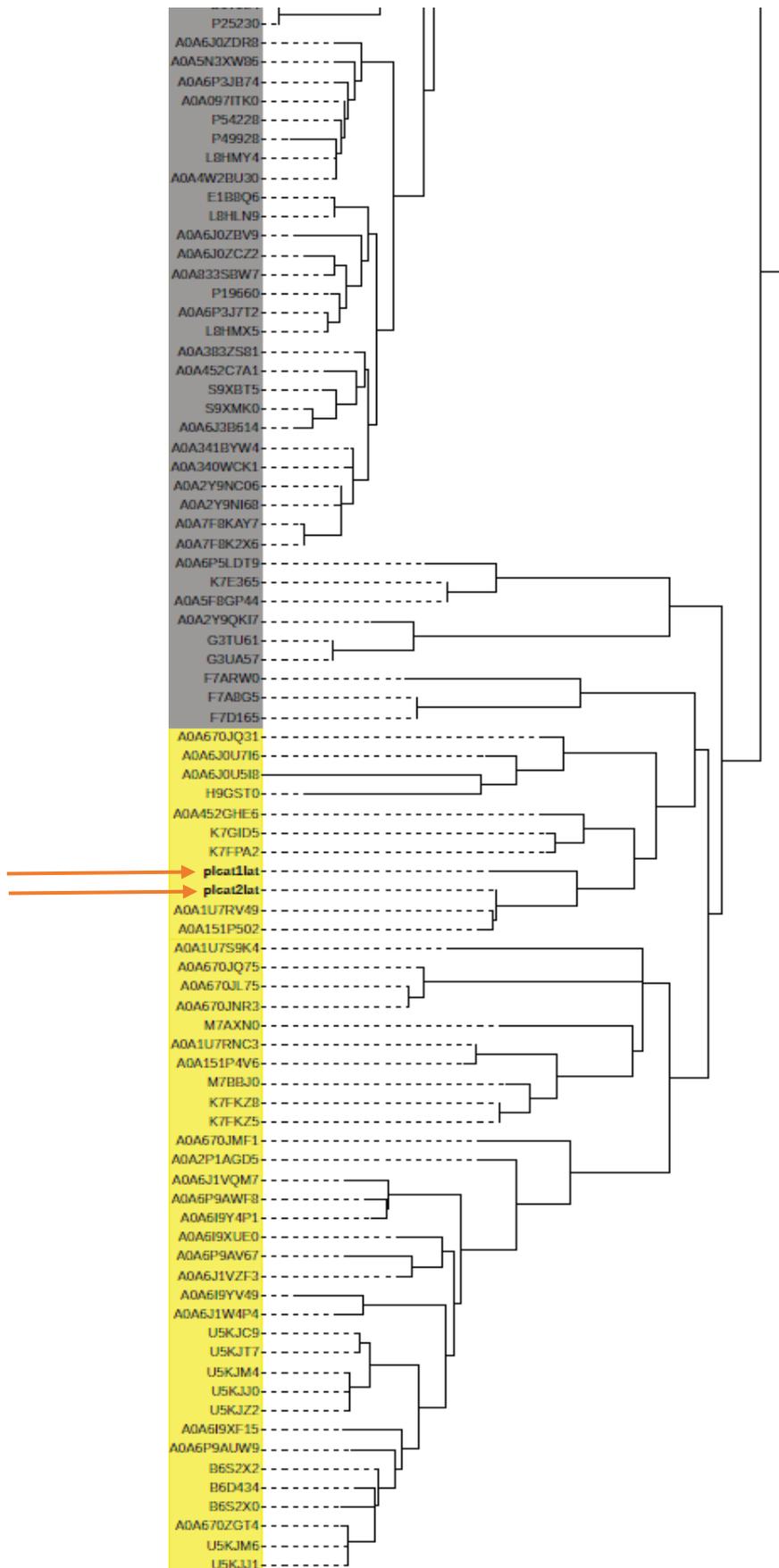


Figura 19. Árbol filogenético convencional de catellicidinas, que incluye *plcat1lat* y *plcat2lat* (señalados con flechas). Estos se encuentran ubicados en el grupo de los saurópsidos junto a las catellicidinas de mamíferos.

La comparación topológica de los árboles obtenidos a través de distintos enfoques filogenéticos (que se muestran colapsados para una visualización más cómoda) (Figura 20), demostró que las ramas representadas en azul oscuro en ambos árboles corresponden a nodos idénticos. Es decir, que poseen la misma topología. En estos nodos idénticos se agruparon plcat1lat, plcat2lat, la catelicidina (AF-A0A151P502-F1) y la catelicidina-5 (AF-A0A1U7RV49-F1). La distancia Robinson-Foulds (RF) fue de 0/0 (NaN%) entre ambos árboles y la distancia Euclidea fue de 0.28. La tasa de sustitución en la filogenia estructural fue de 0.1679 (Figura 20A) y en la filogenia basada en secuencias genéticas fue de 0.8378 (Figura 20B).

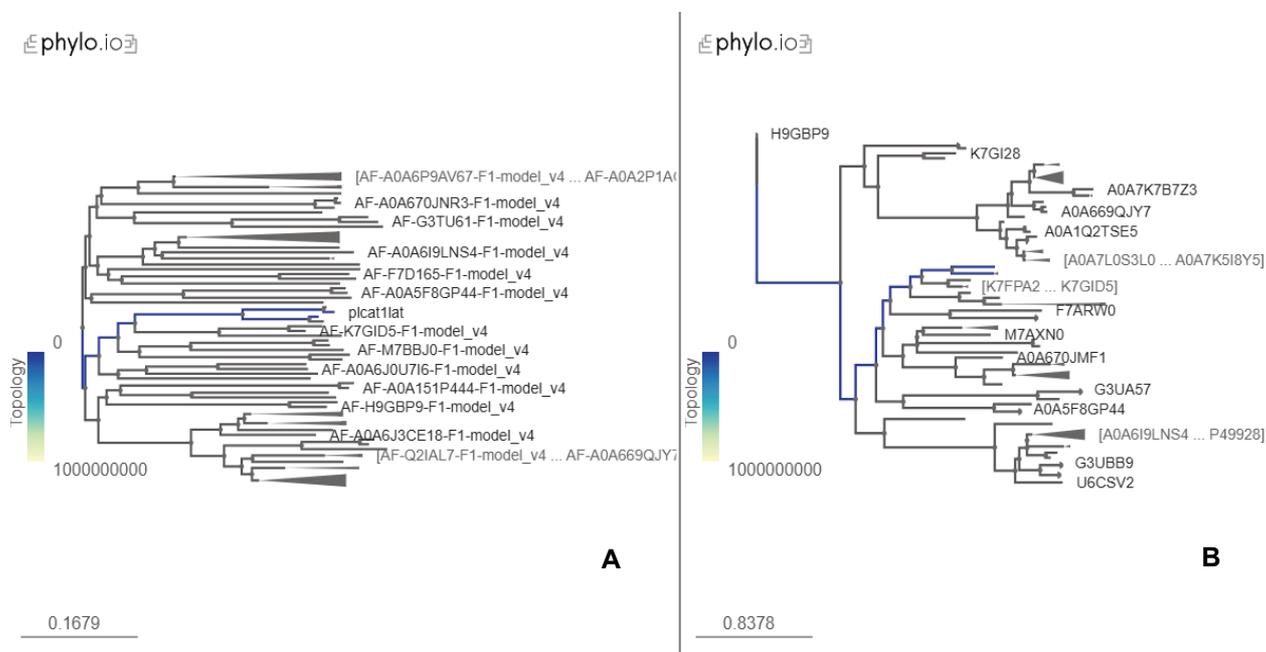


Figura 20. Comparación de la topología de las filogenias **A.** Estructural y **B.** Convencional. Donde se reflejan en color azul los nodos con misma topología.

2.4 Discusión

2.4.1 Aspectos bioquímicos y estructurales predichos

Estudios de relación estructura-actividad han revelado que parámetros fisicoquímicos y estructurales como la cationicidad, la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la propensión estructural, se encuentran entre los determinantes más importantes de las actividades microbicidas y citotóxicas (Takahashi *et al.*, 2010) de los péptidos de defensa. Es por esto, que en la

base de la composición aminoacídica de las catelicidinas y otros PDHs es donde se originan y preservan sus funciones y actividades.

2.4.1.1 Cationicidad

Como se mencionó en capítulos anteriores, los péptidos de defensa del huésped naturales, en este caso las catelicidinas, suelen tener carga positiva neta entre +2 y +13. Este es uno de los factores críticos para su actividad antibacteriana (Takahashi *et al.*, 2010; Ting *et al.*, 2020), debido a que la carga neta de estos regula en gran medida dicha propiedad bioactiva (Islam *et al.*, 2023).

La cationicidad es beneficiosa para las interacciones electrostáticas iniciales entre catelicidinas y los componentes de la membrana bacteriana los cuales están cargados negativamente (Takahashi *et al.*, 2010). Tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, las membranas citoplasmáticas son ricas en fosfolípidos aniónicos fosfatidilglicerol, cardiolipina y grupos con cabezas de fosfatidilserina, los cuales debido a sus cargas resultan muy atrayentes para péptidos antimicrobianos (Kundu, 2020). En consecuencia, varios estudios han revelado una fuerte correlación entre cationicidad y actividad antimicrobiana para péptidos con estructuras alfa helicoidales (Takahashi *et al.*, 2010).

Los péptidos estudiados, plcat1lat y plcat2lat, demostraron tener cargas netas positivas iguales a +5 y +6. Lo cual, de acuerdo a Takahashi *et al.*, (2010) representa el rango óptimo para que exista una correlación positiva entre cationicidad-actividad antimicrobiana. Además, coincide con los valores de carga neta (+1 a +5) en los que se clasifican los péptidos antimicrobianos alfa-helicoidales de diferentes especies de anfibios (Islam *et al.*, 2022), los cuales han sido extensamente estudiados, debido a sus potencialidades, en comparación a las mismas moléculas en reptiles tales como cocodrilianos.

Igualmente, otros estudios han reportado catelicidinas de cocodrilianos con cargas netas similares a las de plcat1lat y plcat2lat. Cheng *et al.*, (2017), reportaron CATH3 (As-CATH3) y CATH6 (As-CATH6) de *A. sinensis* con carga neta +5, así como también CATH5 (As-CATH5) con carga neta +6 en la misma especie de cocodriliano. Estas fueron evaluadas y determinadas como catelicidinas con potencial antibiofilm. Igualmente, Santana *et al.*, (2022)

determinaron que CATH7 y CATH8 de *A. sinensis* (As-CATH7 y As-CATH8) y CATH5 (Gg-CATH5) de *Gavialis gangeticus* poseen carga neta positiva de +4,76 así como también actividad antimicrobiana contra bacterias ESKAPE. Es importante resaltar, que aumentar la cationicidad más allá del rango óptimo no conduce necesariamente a un aumento de la actividad antibacteriana. Por el contrario, se demostró con análogos de la magainina, que un exceso de carga genera un aumento de la citotoxicidad y una pérdida de la selectividad celular (Takahashi *et al.*, 2010). Además, una elevada cationicidad puede causar alteración de la anfipaticidad y, reducción de la hidrofobicidad y propensión estructural, lo que repercute negativamente en la actividad antibacteriana, ya que la presencia de altas concentraciones de cationes en el entorno reduce las interacciones electrostáticas y, por lo tanto, disminuye la potencia antimicrobiana.

2.4.1.2 Anfipaticidad (medida como momento hidrofóbico)

La anfipaticidad es un parámetro esencial en la estructura de los péptidos de defensa del huésped, tanto naturales como artificiales. Esta propiedad caracterizada por la separación espacial de grupos de residuos hidrófobos y polares, tiene un impacto importante en la actividad antimicrobiana y citotoxicidad de las catelicidinas (Takahashi *et al.*, 2010; Bui Thi Phuong *et al.*, 2024), debido a que tras la unión electrostática de las catelicidinas a los grupos de cabeza de los fosfolípidos aniónicos del exterior de las membranas bacterianas, es la anfipatia la que permite que los segmentos hidrófobos de los péptidos se inserten en la bicapa lipídica e interactúen con las cadenas acilo hidrófobas de los fosfolípidos, permeando así la membrana (Takahashi *et al.*, 2010).

El momento hidrofóbico de un péptido es una medida de su anfipaticidad. Como se mencionó anteriormente anfipaticidad se refiere a la distribución de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena peptídica. Esta propiedad es calculada con ángulos de rotación específicos, siendo 100° para una hélice alfa y 160° para una lámina beta. Estos ángulos representan la orientación del péptido en el espacio (Eisenberg *et al.*, 1986).

El péptido p1cat1lat, resultó menos anfipático si se considera que su momento hidrofóbico es menor con respecto al de p1cat2lat (ver Tabla 9). Esto demuestra

que plcat1lat presenta cierto grado de separación entre las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Igualmente, para plcat2lat, el valor del momento hidrofóbico sugiere que entre las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas existe una definición y separación de las regiones mayor que en plcat1lat, haciéndolo más antipático.

De acuerdo con los resultados obtenidos, optimizar la anfipaticidad de plcat1lat y por consiguiente mejorar la interacción del péptido con los lípidos de las membranas bacterianas, es un aspecto importante a tener en cuenta. Sin embargo, la “anfipaticidad perfecta” a pesar de conducir a una gran actividad antimicrobiana de amplio espectro (He *et al.*, 2020) no es sinónimo de una actividad y especificidad óptima (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024), ya que puede estar acompañada simultáneamente de una mayor toxicidad contra células sanas (He *et al.*, 2020), conduciendo a un alto grado de hemólisis y a una baja actividad antibacteriana, tal como se demostró con los análogos de gramicidina S con conformaciones de hoja beta (Takahashi *et al.*, 2010) y para la catelicidina AN-13 de *Gekko japonicus* (Wu *et al.*, 2024).

El cambio de los estilos anfipáticos reorganizando los componentes hidrofílicos e hidrofóbicos o aplicando otras modificaciones químicas puede afectar significativamente la actividad biológica, la selectividad y la interacción entre la catelicidina con otros PDHs y membranas diana (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024). Contrario a lo que podría considerarse, es posible mejorar la selectividad y la potencia antimicrobiana de péptidos de defensa del huésped anfipáticos perfectos mediante la sustitución de aminoácidos con propiedades opuestas en el lado hidrofóbico o hidrofílico de la hélice (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024). Un ejemplo de este tipo de modificaciones fue la realizada por Jangpromma *et al.*, (2023), donde a partir de una catelicidina de *Crocodylus siamensis*, RN15 (Tankrathok *et al.*, 2019) los residuos de las posiciones 4, 8 y 15 de la cara hidrofóbica fueron sustituidos por residuos de lisina. De esta forma se logró mejorar la actividad antimicrobiana del péptido frente a la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos en comparación con el péptido original.

2.4.1.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad es el parámetro estructural crítico que determina la tasa de destrucción bacteriana ejercida por los PDHs alfa-helicoidales (Zhang *et al.*, 2021); considerando que, un estudio de más de 150 PDHs naturales reveló que los residuos hidrófobos representan en estos generalmente entre el 40 y 60% (Tossi *et al.*, 2000).

Con el aumento de la hidrofobicidad, aumentan las tasas de acción de los PDHs, incluyendo la unión bacteriana, la neutralización de lipopolisacáridos y la permeabilización de la membrana externa e interna. Además, los PDHs más hidrofóbicos tienen mayores tasas de eliminación bacteriana debido a que poseen una mejor potencia terapéutica *in vivo* y una menor propensión a inducir resistencia bacteriana (Zhang *et al.*, 2021).

Entre los aspectos negativos de una elevada hidrofobicidad, se encuentran la alteración y mayor penetración de membranas, el compromiso de la selectividad celular (Nordahl, 2004) y la reducción de la especificidad de la membrana al tiempo que favorece las interacciones con los fosfolípidos zwitteriónicos, promoviendo una toxicidad no deseada para las células eucariotas (Takahashi *et al.*, 2010).

La hidrofobicidad de los péptidos plcat1lat y plcat2lat resultó ser mayor en el primero. Evidenciándose el predominio de esta propiedad en plcat1lat no solo en la predicción de su capacidad hemolítica (ver Tabla 8), sino también en los resultados experimentales obtenidos que se describirán en los siguientes capítulos de esta tesis.

Existe la posibilidad de optimizar la hidrofobicidad de los péptidos, considerando que los elementos estructurales que intervienen en esta propiedad son los fragmentos hidrofóbicos de residuos únicos, los segmentos hidrofóbicos y la cara hidrofóbica de la estructura secundaria (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024). Además, la disposición de los componentes hidrófobos dependerá de la posición de los residuos en la secuencia peptídica y de la estructura secundaria (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024).

Una manera novedosa de abordar el diseño y modificación hidrofóbico/anfipático de la alfa-hélice de los PDHs, de acuerdo con Bui Thi Phuong *et al.*, (2024), se basa en caracterizar los componentes hidrofóbicos (e

hidrofílicos) que conforman al péptido, e investigar su impacto en las propiedades biológicas de los PDHs.

De esta manera, al ocurrir la conformación helicoidal los residuos hidrofóbicos suelen agruparse formando distintos modelos anfipáticos (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024). El modelo 2A corresponde a los PDHs que tienen caras hidrófobas e hidrófilas “perfectas”, agrupando los residuos hidrófilos en una cara de la hélice, mientras que los residuos hidrófobos se sitúan en la cara opuesta. Los modelos 2B y 2C se refieren a los que tienen al menos una cara interrumpida por la presencia de al menos un aminoácido con propiedades opuestas. En el modelo 2B, los PDHs tienen la cara hidrófila interrumpida por residuos hidrofóbicos y, en el modelo 2C tienen la cara hidrofóbica interrumpida por residuos hidrofílicos (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024).

De acuerdo con la clasificación establecida por Bui Thi Phuong *et al.*, (2024) plcat1lat corresponde al modelo híbrido 2B & 2C y plcat2lat corresponde al modelo 2C (ver Anexo 3). Por consiguiente y en consecuencia al modelo, si se quisiera mejorar plcat1lat, no es apropiado sustituir sus residuos “rompedores de hélices” tales como prolina o glicina por sus formas D- estereorandomizadas, ya que esto implicaría una pérdida significativa de la potencia antimicrobiana. En el caso de plcat2lat, es posible mejorar su selectividad y potencia antimicrobiana sustituyendo algunos de sus residuos aminoacídicos por otros con propiedades opuestas en la cara hidrofóbica o hidrofílica de la alfa-hélice. Sin embargo, la interrupción de la hidrofobicidad puede reducir la disrupción de la membrana y aumentar la capacidad de penetración celular, haciendo evidente la importancia del equilibrio hidrofobicidad-hidrofiliidad para la actividad biológica de los PDHs (Bui Thi Phuong *et al.*, 2024).

2.4.1.4 Presencia de residuos aromáticos

Los péptidos plcat1lat y plcat2lat presentaron al menos un residuo aromático, tal como triptófano, tirosina o fenilalanina. El triptófano en particular se encuentra con frecuencia en los PDHs y se ubica en la región interfacial de las bicapas lipídicas (Yau *et al.*, 1998). Es capaz de interactuar tanto con las cadenas laterales de aminoácidos cargadas positivamente como con el grupo de cabeza de amino colina de la bicapa lipídica (Dougherty, 2000). Mediante la asociación con triptófano, los residuos catiónicos como arginina se protegen

de la naturaleza altamente hidrofóbica de la bicapa lipídica y penetran más fácilmente en esta (Dougherty, 2000). Además, la forma grande y voluminosa de la cadena lateral indólica del triptófano interrumpe las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas acilo lipídicas, lo que conduce a una mayor inserción de los péptidos en la bicapa lipídica (Yau *et al.*, 1998). Debido a las interacciones catión, la inclusión de triptófano a menudo hace que los péptidos tengan mayor afinidad por las membranas. La sustitución del triptófano suele asociarse a una menor eficacia contra las bacterias, mientras que la inclusión de este aminoácido potencia la actividad antibacteriana (Takahashi *et al.*, 2010).

2.4.2 Relación y análisis entre secuencia-estructura de plcat1lat y plcat2lat

Tal como se describió en el apartado de los resultados, ambos péptidos presentaron cromatogramas (Figura 16) asociados a la presencia de alfa-hélices, de acuerdo con lo predicho por la herramienta ColabFold (<https://github.com/sokrypton/ColabFold>, Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022). Sin embargo, debido a que plcat1lat presentó mayores fluctuaciones negativas es probable que la estructura/configuración de alfa-hélice en este sea más pronunciada e incluso más estable (Tempra *et al.*, 2021) que en plcat2lat. Igualmente, un contenido más alto de alfa-hélice puede afectar cómo el péptido interactúa con otras moléculas y puede influir en su función biológica. Estudios experimentales previos demostraron que la función de los péptidos antimicrobianos está altamente correlacionada a la estabilidad de las estructuras secundarias, como los componentes de la hélice o de la cadena beta (Cao *et al.*, 2023).

La presencia de alfa-hélices en la estructura de péptidos y otras proteínas es importante, en tal medida que Tempra *et al.*, (2021) hallaron que la región correspondiente alfa-hélices parece ser la responsable de la unión a moléculas anfífilas. Además, demostraron la dependencia de la unión proteína-lípido en presencia de una estructura helicoidal, debido a que, si el contenido de hélice

en una proteína es sustancialmente menor, la probabilidad de contacto disminuye.

El solvente en el cual se reconstituyó el péptido es también un aspecto indispensable que considerar, ya que afecta la forma de plegamiento de estos en su estructura. Cao *et al.*, (2023) obtuvieron que la estructura del péptido (A-222) predicha por AlphaFold2 fue sustancialmente diferente de la estructura determinada mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) a pesar de la presencia de hélices alfa en ambas estructuras. La hélice alfa fue más larga en la estructura predicha por AlphaFold2 que en la estructura de NMR, concluyendo que el disolvente afectó al plegamiento del péptido.

En particular, para plcat1lat y plcat2lat los resultados experimentales fueron los esperados. Sin embargo, es necesario complementar con otra técnica aplicada para la detección estructural de proteínas, tal como NMR, que permita describir a profundidad las regiones del péptido, ya que es probable que el DMSO haya afectado el plegamiento de estos a un nivel desconocido a pesar de haber sido utilizado a una concentración menor.

El DMSO, posee ventajas sobre otros disolventes orgánicos, debido a sus propiedades físicas apróticas (constante dieléctrica relativa pequeña ($\epsilon = 46,8$ (2)) y su elevado momento dipolar (4,0 D (2)), que le permiten solubilizar péptidos helicoidales hidrofóbicos (Duarte *et al.*, 2008). No obstante, el DMSO puede influir en la estabilidad de los péptidos de diferentes maneras, dependiendo de las características estructurales de estos, que, a su vez, dan forma a las propiedades de sus capas de hidratación (agua circundante) (Panuszko *et al.*, 2024). Por lo cual, es evidente que existe una complejidad inherente a las interacciones proteína-disolvente, que además es específica y requiere futuras investigaciones para comprender los mecanismos implicados. Mientras sigan siendo desconocidos estos procesos, es recomendable considerar las ventajas y desventajas del DMSO como solvente y hacer uso de éste en concentraciones lo suficientemente bajas como para evitar efectos colaterales.

Por otro lado, existe un enfoque novedoso dentro de los PDHs que centra su atención en el desorden estructural del péptido y en los residuos que benefician su ocurrencia. Este plantea que hay aminoácidos polares promotores del desorden (Glicina/Serina/Treonina/Glutamina/Histidina/Prolina) y aminoácidos hidrófobos promotores del orden (Leucina/Isoleucina/Valina/ácido aspártico/Tirosina/Fenilalanina/Triptófano), los cuales pueden conformar en mayor o menor medida un péptido, generando IDRs o IDPs. Latendorf *et al.*, (2019) plantean que cualquier región proteica intrínsecamente desordenada con una carga neta positiva, y dependiente de su composición en aminoácidos y de la longitud de la cadena peptídica, representa un potencial antimicrobiano.

Considerando lo planteado por Latendorf *et al.*, (2019) es la composición aminoacídica y no las características estructurales de las IDPs catiónicas, las que definirían su actividad antimicrobiana. Esto cuestiona el paradigma estructura-función, reflejado en el dogma de Anfinsen, en el que el plegamiento de una estructura bien definida es un requisito crucial para que una proteína ejerza una actividad biológica definida (Latendorf *et al.*, 2019). La observación de que unos pocos péptidos sintéticos aislados de proteínas desnaturalizadas resultaron ser péptidos antimicrobianos incluso cuando se invertía o aleatorizaba su secuencia aminoacídica original, llevó a suponer que también existen PDHs que carecen de requisitos estructurales (Latendorf *et al.*, 2019).

En consecuencia, los autores denominaron ciertos grupos de PDHs como: péptidos antimicrobianos catiónicos intrínsecamente desordenados (CIDAMP). Si las IDPs catiónicas o regiones proteicas intrínsecamente desordenadas (IDPR) de diversos orígenes, que contienen un alto porcentaje de aminoácidos distintos promotores del desorden son grupos interconectados de antimicrobianos, los tejidos ricos en IDPR catiónicas y, por tanto, fuentes potenciales de CIDAMP, podrían representar una importante barrera antimicrobiana y un sistema de defensa innato en cualquier organismo.

En particular, plcat1lat y plcat2lat son catiónicos, y contienen residuos que favorecen al desorden de sus estructuras. Sin embargo, no poseen los suficientes aminoácidos como para volverlos totalmente desordenados. Siendo este un aspecto a considerar para optimizar la acción antimicrobiana de estos.

2.4.3 Estrategias y posibles modificaciones estructurales de los péptidos

Durante la validación estructural de ambos péptidos (ver Tabla 13), para *plcat1lat* en particular, se obtuvo que posee residuos aminoacídicos no favorecidos energéticamente de acuerdo con el análisis de Ramachandran. Esto indica que tales residuos hacen menos estable al péptido en general. Para compensar dicha inestabilidad no sólo existe la modificación de las propiedades mencionadas anteriormente, sino también se han reportado diversas estrategias que además pueden mejorar la selectividad de los PDHs, tales como: sustitución de residuos por aminoácidos naturales, sustitución de residuos por aminoácidos sintéticos, hibridización, isomerización heteroquiral de L a D, modificación del extremo C/N terminal, ciclización e incorporación con nanopartículas (Ting *et al.*, 2020).

Actualmente, es un hecho que los investigadores utilizan distintas metodologías para el estudio de los PDHs y sus propiedades; ocurriendo una variación significativa en el proceso de preparación del péptido, la selección de microorganismos a testear, la medición de los valores concentración mínima inhibitoria (CMI), entre otros (Islam *et al.*, 2022). De esta manera, es evidente que es un reto significativo comparar todos los datos y metodologías disponibles a la hora de realizar alguna modificación en un péptido pre-existente. Por lo que la unificación de criterios iniciales tales como la utilización de herramientas bioinformáticas, y modificaciones pre y postraduccionales convendrían considerarse como enfoques similares que todo estudio relacionado a los PDHs debe contener.

2.4.4 Análisis filogenéticos de *plcat1lat* y *plcat2lat*

En los dos tipos de filogenias realizadas, ambos péptidos se ubicaron junto a las catelicidinas, indicando el hecho de que ambos pertenecen a esta clase de PDH. Sin embargo, a diferencia de la filogenia convencional, la filogenia estructural demostró ser la más precisa en ubicar los péptidos dentro de la topología del árbol, ya que los posicionó junto a la clase Aves. Esto coincide con la organización taxonómica actual en la que los cocodrilianos, las aves, los dinosaurios y los pterosaurios forman un grupo monofilético conocido como arcosaurios. De este grupo, los cocodrilianos y las aves son los únicos

miembros existentes; así que los cocodrilianos (caimanes, aligátos, cocodrilos y ghariales) son los parientes vivos más cercanos de todas las aves (Green *et al.*, 2014).

Otro aspecto importante de la comparación de ambas filogenias fueron la distancia RF y la distancia Euclídeana. La distancia RF mide el número de divisiones (o particiones) que son únicas para cada árbol (Böcker y Baumbach, 2013). En este trabajo el valor de RF indica que no existen divisiones únicas en ninguno de los árboles comparados, lo que implica que ambos árboles son iguales entre ellos.

Por otro lado, la distancia Euclídeana cuantifica las diferencias en las características evolutivas y estructurales de los árboles, además de reflejar otros aspectos, como la longitud de las ramas (de Vienne *et al.*, 2011). El valor Euclídeano obtenido, reportado en la sección de resultados, sugiere que, aunque los árboles son estructuralmente idénticos (distancia RF), existen diferencias en la longitud de las ramas. Esto significa que las distancias evolutivas representadas por las ramas varían entre los dos árboles.

Visualmente en la Figura 20, donde se comparan la filogenia estructural y la filogenia basada en las secuencias genéticas se observa que la longitud de las ramas es mayor en la filogenia estructural. Sin embargo, en la esquina inferior izquierda de cada filogenia el valor de la tasa de sustitución obtenido, el cual es mayor en la filogenia basada en la secuencia genética, refleja con precisión que las secuencias genéticas acumulan mutaciones más rápidamente comparado a las estructuras (Studer *et al.*, 2013). Esto se debe a que las estructuras de las proteínas suelen estar sometidas a presiones selectivas más fuertes (Tourasse y Li, 2000). En consecuencia, la tasa de sustitución en las filogenias estructurales suele ser menor.

En conclusión, es probable que la mayor longitud de las ramas evidenciada en la filogenia estructural de la Figura 18 sugiere que el método utilizado por FoldTree captura cambios evolutivos más extensos en las estructuras en comparación con las distancias genéticas representadas por IQ-TREE. Esto podría deberse a las diferencias inherentes en cómo evolucionan los datos estructurales y de secuencia (Moi *et al.*, 2023).

CAPÍTULO 3. PROPIEDADES BIOACTIVAS DE PLCAT1LAT Y PLCAT2LAT

Evaluación del potencial antimicrobiano y antibiofilm de catelicidinas del yacaré overo



3.1 Introducción

Los PDHs se encuentran incluidos dentro un grupo de péptidos aún más amplio, definidos como péptidos bioactivos. Estos a pesar de poseer características muy similares a los PDHs, abarcan una gama de funciones que van más allá de la inmunidad, ya que pueden provocar cambios fisicoquímicos en procesos corporales normales (Quintal y Segura, 2021), los cuales son el resultado de una composición única de aminoácidos, estructura y peso molecular (Quintal y Segura, 2021). Dado que la mayoría de las funciones corporales son el resultado de interacciones entre aminoácidos (ya sea como interacciones entre pequeños fragmentos peptídicos o como pequeñas cadenas proteicas), los péptidos bioactivos poseen un gran potencial terapéutico para un amplio espectro de aplicaciones (Fields *et al.*, 2009; Purohit *et al.*, 2024).

Desde el punto de vista estructural, los péptidos bioactivos ocupan un espacio único entre el espectro de los pequeños compuestos químicos y los biofármacos de mayor tamaño. Su tamaño es comparativamente pequeño y presentan una elevada biodisponibilidad oral. Así pues, los péptidos bioactivos son moléculas con gran especificidad y potencia, y menos efectos secundarios e inmunogenicidad que los biofármacos basados en proteínas (Craik *et al.*, 2013; Purohit *et al.*, 2024).

En las últimas décadas, estos péptidos se han explorado como inmunomoduladores debido a su capacidad para inducir diversas respuestas inmunitarias, tales como: (1) producción de citocinas anti y proinflamatorias; (2) aumento de la expresión de quimiocinas; (3) neutralización de lipopolisacáridos (LPS) y endotoxinas; (4) regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; (5) estímulo de la presentación de antígenos; y (6) activación de la diferenciación leucocitaria (Martell *et al.*, 2021; Leite *et al.*, 2023).

Teniendo en cuenta que los PDHs-catelicidinas pertenecen al grupo de péptidos bioactivos, entre sus múltiples funciones estas también desempeñan un papel fundamental en la modulación de la inflamación, al influir en las respuestas de las citocinas y en el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos enfermos. Consecuentemente, debido a sus múltiples y potentes actividades, muchas catelicidinas de distintas fuentes se han investigado como agentes terapéuticos para enfermedades infecciosas, autoinmunes e

inflamatorias, sugiriendo diversos estudios su potencial como estrategia terapéutica para mitigar estas últimas (Overhage *et al.*, 2008; Boehmer *et al.*, 2011; Nagaoka *et al.*, 2020; Guerra *et al.*, 2024).

Algunas investigaciones realizadas con catelicidinas reportan:

- Reducción de la inflamación del colon y promoción de la cicatrización de heridas y úlceras gástricas (Wu *et al.*, 2010)
- Reducción de la inflamación en artritis reumatoide por un péptido derivado de LL37 (Chow *et al.*, 2014)
- Inhibición de citocinas proinflamatorias en peces cebrá y estímulo de IL-8 para reclutar células inmunitarias (Chen *et al.*, 2019)
- Reducción de la inflamación en colitis ulcerosa debido a niveles altos de vitamina D y LL37 (Gubatan *et al.*, 2020)
- Regulación de la disminución de citocinas proinflamatorias y aumento de IL-10 en macrófagos desafiados con *E. coli* (Peng *et al.*, 2020)
- Supresión de la inflamación, reduciendo óxido nítrico, IL-6, TNF- α e IL-1 β , y mejora de la eliminación bacteriana (Shi *et al.*, 2022)
- Mejora de la función pancreática y reducción de la hiperglucemia en diabetes tipo I (Cristelo *et al.*, 2023)

En cocodrilianos, particularmente *A. sinensis*, también se reportaron las catelicidinas 1, 2, 3, 4, 5, y 6 y con ellas una potente acción antiinflamatoria (Chen *et al.*, 2017) al inhibir la producción de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos en macrófagos peritoneales de ratón.

Con respecto a la acción terapéutica enfocada al *cáncer*, varias catelicidinas de distintos organismos han sido investigadas como posibles agentes antitumorales debido a sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad para alterar las membranas de las células cancerosas (Guerra *et al.*, 2024). Además, se comprobó que combinar catelicidinas con otros agentes quimioterapéuticos ha mostrado eficacia y selectividad mejorada para combatir tumores, minimizando la toxicidad en las células normales (Guerra *et al.*, 2024). Catelicidinas específicas, como CAT del búfalo, crotalicidina del veneno de serpiente de cascabel y BF-30 del *Bungarus fasciatus*, han mostrado resultados prometedores contra diferentes tipos de *cáncer*. Las catelicidinas

del pollo y la LL37 humana también han demostrado actividades anticancerígenas significativas (Baxter *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019; Perez-Peinado *et al.*, 2020; Qi *et al.*, 2020; Carrera-Aubesart *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2022; Agbaria *et al.*, 2023; Chernov *et al.*, 2024). Por otro lado, no se han reportado catelicidinas de cocodrilianos que hayan demostrado potencial anticáncer. Contrariamente en otro tipo de PDHs en estos animales, como lo son las leucocinas se ha confirmado su actividad en células de cáncer de cuello de útero HeLa y CaSki (Theansungnoen *et al.*, 2016) y en células de cáncer de colon humano HCT-116 (Maijaroen *et al.*, 2018).

Las acciones antimicrobianas y antibiofilm de las catelicidinas, también resaltan como unas de sus principales actividades bioactivas, ya que debido a su diversidad estructural pueden interactuar con una amplia gama de dianas microbianas, tales como membranas, componentes de la pared celular, ADN, ARN, proteínas específicas y complejos proteicos (Raheem y Straus, 2019).

El mecanismo principal de acción antimicrobiana de las catelicidinas implica la interacción con las bicapas lipídicas. Los modelos clásicos que describen dichas interacciones incluyen modelos transmembrana (barril-estaca y poro toroidal), que ocasionan agujeros en la estructura y modelos sin poros (modelo de alfombra/detergente y modelo de aglutinación) (Neville *et al.*, 2006, Mookherjee *et al.*, 2020), los cuales fueron descritos en un capítulo anterior. Además, es importante resaltar que más allá de sus mecanismos de acción independientes, la interacción entre catelicidinas de distintas clases puede aumentar la permeabilización de la membrana (Rashid *et al.*, 2016) y, aunque los mencionados procesos que conducen a la disrupción de las membranas se explican por separado, podrían existir diferentes mecanismos para un mismo péptido, ya que incluso cada catelicidina puede posicionarse de manera diferente en las membranas (Shahmiri *et al.*, 2016; Mookherjee *et al.*, 2020; Sancho-Vaello *et al.*, 2020; Guerra *et al.*, 2024).

En cocodrilianos, existen investigaciones relacionadas a las acciones antimicrobianas de las catelicidinas; sin embargo, estos estudios no superan a las investigaciones existentes en anfibios anuros (principalmente ranas). Estos son la mayor fuente de péptidos antimicrobianos encontrados en los registros de la base de datos bibliográfica, representando aproximadamente 30% del total de los PDHs de anfibios (Valera-Rodríguez *et al.*, 2024). Hasta el

momento en cocodrilianos se han reportado catelicidinas en *A. mississippiensis* (AM-CATH21, 28, 36) (Barksdale *et al.*, 2017), *A. sinensis* (As-CATH1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) (Chen *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2022), *A. siamensis* (RN15) (Tankrathok *et al.*, 2019) y *G. gangeticus* (Gg-CATH5, Gg-CATH7) (Santana *et al.*, 2022).

Por lo tanto, los recientes avances en la terapéutica mediada por catelicidinas contra las infecciones microbianas sugieren que estas moléculas serían prometedoras candidatas a futuros agentes antimicrobianos, capaces de controlar varios tipos de infecciones bacterianas y víricas. Además, el uso de tecnologías novedosas como la nanoencapsulación y/o los sistemas de administración potencian la eficacia antimicrobiana, contribuyendo al desarrollo de terapias basadas en la catelicidina con una toxicidad reducida en comparación con la terapia PDH única.

En el siguiente capítulo, se describen las técnicas experimentales utilizadas para evaluar las acciones bioactivas de las catelicidinas de *C. latirostris*, plcat1lat y plcat2lat, específicamente antibacteriana y antibiofilm. Además, se exponen no sólo los resultados microbiológicos, sino también las micrográficas SEM donde se pueden observar los efectos causados por plcat1lat y plcat2lat sobre las bacterias testeadas. Finalmente, se incluye un análisis de citotoxicidad en células de mamífero (línea celular VERO), como aproximación inicial a la seguridad de estos péptidos, lo cual constituye un paso esencial para valorar su potencial aplicación terapéutica.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reconstitución de los péptidos plcat1lat y plcat2lat

Ambos péptidos fueron reconstituidos de acuerdo con las indicaciones de la hoja técnica proporcionada por Biomatik® (ver Anexo 2). El solvente indicado para la reconstitución fue el DMSO. Considerando que el uso de DMSO en soluciones acuosas de proteínas por encima de una determinada concentración puede provocar el desdoblamiento del péptido, debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno intramoleculares del esqueleto (Duarte *et al.*, 2008), se utilizó DMSO a una concentración del 5% (Ciandrini *et al.*, 2018).

De esta manera, se prepararon alícuotas stocks (Turner *et al.*, 2011) de ambos péptidos a una concentración final de 1 mg de péptido en 1 ml de DMSO (5%) (1 mg/ml). Posterior a la reconstitución, las alícuotas fueron conservadas en ultrafreezer de acuerdo a la indicación del fabricante.

3.2.2 Activación de cepas bacterianas provenientes de ATCC y aislados clínicos

Para evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat se dispuso de bacterias provenientes de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y de bacterias aisladas provenientes de mastitis y endometritis bovina (Tabla 13).

Tabla 13. Bacterias utilizadas para evaluar propiedades bioactivas de plcat1lat y plcat2lat..

Bacteria	ATCC	Aislado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	23235	Mastitis bovina
<i>Escherichia coli</i>	25922	Endometritis

Las cepas bacterianas inicialmente fueron activadas en caldo de tripteína de soja (TSB) durante 24 horas a un rango de temperatura de 33-37 °C. Transcurrido el tiempo indicado, se realizaron las siembras de cada cepa en placas de Petri que contenían agar nutritivo. En este medio las cepas bacterianas permanecieron otras 24 h a 33-37 °C. Luego, a partir de estas siembras se aislaron entre 1-3 colonias de cada bacteria y se inocularon en caldo Mueller Hinton (MHB) estéril (Balouiri *et al.*, 2016), obteniendo de esta manera cuatro soluciones bacterianas, dos correspondientes a cepas ATCC y dos provenientes de los aislados clínicos.

A continuación, cada solución bacteriana fue estandarizada y ajustada a una densidad óptica entre 0,08-0,12 medido a 625 nm en un lector de microplacas nano CLARIOstar (BMG LABTECH), conteniendo cada suspensión bacteriana una concentración de (1-2) x 10⁸ CFU/mL (Balouiri *et al.*, 2016).

3.2.3 Evaluación de actividad antimicrobiana de *plcat1lat* y *plcat2lat*

3.2.3.1 Método de microdilución en caldo

El método de microdilución en caldo se realizó siguiendo los estándares aprobados por el CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio), contenidos en los manuales M07 (Métodos para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen aeróbicamente, 2012), M100 (Estándares de rendimiento para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, 2016) y de acuerdo con el protocolo expuesto por Balouiri *et al.*, (2016).

Inicialmente, se agregaron 50 µl de MHB estéril desde el pocillo 2A al 6A de la placa de microtitulación. Luego, a partir de una de las alícuotas stocks de 1 mg/ml de los péptidos se preparó otra con una concentración inicial de 512 µg/ml y se agregaron 100 µl en los pocillos de la columna 1 de la placa de microtitulación. A partir de allí se comenzaron a traspasar 50 µl de la dilución peptídica desde el pocillo 1A al 2A, se homogeneizó la dilución peptídica con el MHB y se traspasaron 50 µl de la mezcla desde el pocillo 2A al 3A. Esto se realizó sucesivamente hasta el pocillo 6A para obtener las concentraciones de los péptidos (512, 256, 128, 64, 32 µg/ml).

A continuación, la suspensión bacteriana fue diluida 1/150 en MHB, obteniendo una concentración final de 10E6 CFU/ml. Luego, se agregaron 50 µl de esta desde el pocillo 1A al 6A.

Tras la mezcla en los pocillos la placa de microtitulación fue incubada en estufa por 16-20 horas a 35 °C. La CMI para cada ensayo se determinó comparando la turbidez de los pozos control con aquellos que contenían los péptidos de cada placa utilizada para cada microorganismo evaluado. Este procedimiento se hizo primero visualmente, para luego ser medida su densidad óptica a 655 nm en un lector de microplacas nano - CLARIOstar (BMG LABTECH). La CMI se reportó como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento de microorganismos, tal como lo define el CLSI (2012).

El mismo procedimiento se llevó a cabo con las 4 cepas bacterianas, los controles y el control realizado con albúmina sérica. Además, todas las condiciones y concentraciones se realizaron por triplicado.

3.2.3.1.1 Controles

Se realizaron controles positivos, negativos, controles con antibióticos y controles con albúmina sérica. Los controles positivos se ubicaron en la columna 12 de las placas de microtitulación y, consistieron en MHB y suspensión microbiana. Los controles negativos también se realizaron en placas de microtitulación, y contenían MHB y el agente antimicrobiano (plcat1lat o plcat2lat). Igualmente, los antibióticos utilizados como controles fueron: ampicilina (específico para las cepas de *S. aureus*), gentamicina (específico para las cepas *E. coli*) y albúmina sérica. Esta última, fue usada como control para descartar un efecto de enmascaramiento de la acción antimicrobiana ejercida por el solvente y no por el agente antimicrobiano.

3.2.3.1.2 Análisis estadísticos

Para evaluar la distribución de los datos, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de ANOVA de dos vías, y la comparación por pares de Bonferroni para analizar la actividad antibacteriana de los péptidos diseñados en función de su concentración, frente a las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, tanto para las cepas ATCC, como para las cepas aisladas. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software comercial SPSS versión 25 (IBM Corp Ibm, 2017), y se estableció un nivel de significación estadística de alfa 0,05.

3.2.4 Evaluación de la actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat

3.2.4.1 Identificación de las condiciones óptimas de crecimiento del biofilm

Antes de iniciar el protocolo de inhibición de biofilm se identificaron y establecieron las condiciones que favorecen el crecimiento del biofilm producido por las bacterias ATCC *S. aureus* y *E. coli* de acuerdo a Haney *et al.*, (2021) y con modificaciones tomadas de Stepanovic *et al.*, (2007). Las condiciones óptimas de crecimiento identificadas permanecieron constantes para el ensayo de inhibición del biofilm.

Inicialmente se sembraron las cepas bacterianas ATCC en placas con agar Mueller Hinton (MHA) y se incubaron en estufa durante 16-20 h a 37 °C. Luego, 2-3 colonias de las dos cepas de bacterias obtenidas en MHA fueron inoculadas en TSB e incubadas en estufa durante 16-20 h a 37 °C. Obteniendo dos soluciones bacterianas una correspondiente a *S. aureus* ATCC y otra a *E.coli* ATCC.

Transcurrido el tiempo indicado y evitando usar los pocillos externos de la placa de microtitulación para muestras de biofilm, debido al alto intercambio de gas y evaporación en estos, se agregaron 100 µl de TSB estéril y 10 µl de solución bacteriana en cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación seleccionados para obtener el biofilm. Luego, se incubó en estufa durante 16-20 h a 37 °C, para después registrar la densidad óptica de la placa en un lector de microplacas nano CLARIOstar (BMG LABTECH) a 600 nm (OD600), y cuantificar el crecimiento bacteriano general en cada pocillo.

Posterior a la medición, se desechó el medio de crecimiento utilizado invirtiendo suavemente las placas y realizando dos lavados consecutivos con agua destilada. Luego de escurrir, se agregó a cada pocillo 150 µl de metanol durante 20 minutos, se desechó el metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente overnight. Se tiñó la biomasa adherida en cada pocillo agregando 150 µl de una solución de cristal violeta (CV) al 2% (p/v), y dejándolas teñir a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez descartada la solución de tinción de CV de todos los pocillos, se realizaron dos lavados a las placas con agua destilada, cuidando de no rociar el agua con demasiada fuerza, para no desprender parte de la muestra.

Una vez realizados los lavados, se solubiliza el CV unido al biofilm adherido con 150 µl de etanol al 95% (vol/vol) y se incubaron las microplacas durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se registró la absorbancia de estas a 595 nm (A595) en un lector de microplacas.

3.2.4.2 Ensayo de Inhibición de Biofilm por *plcat1lat* y *plcat2lat*

Para evaluar la acción de inhibición de formación del biofilm ejercida por *plcat1lat* y *plcat2lat* se probaron las concentraciones de 512, 256, 128 y 64 µg/ml. Con el fin de obtener las soluciones bacterianas correspondientes a *S.*

aureus ATCC y *E. coli* ATCC, se sembraron las cepas bacterianas ATCC en placas con MHA y se incubaron en estufa durante 16-20 h a 37 °C. Luego, 2-3 colonias de las dos cepas de bacterias obtenidas en MHA fueron inoculadas en TSB e incubadas en estufa durante 16-20 h a 37 °C.

Antes de inocular las placas de microtitulación, se determinó la densidad óptica de las soluciones bacterianas a 600 nm (OD600) utilizando un lector de microplacas nano - CLARIOstar (BMG LABTECH) y se diluyó en un volumen apropiado de TSB para obtener a una OD600 final de 0,01.

En paralelo, a partir de las alícuotas stocks de 1 mg/ml de los péptidos se preparó otra con una concentración inicial de 512 µg/ml y se añadieron 20 µl de esta en el pocillo 2 de cada fila de la microplaca; correspondiendo a la concentración más alta a evaluar de plcat1lat o plcat2lat. Luego se añadieron 10 µl de agua estéril a partir del pocillo 3 de cada columna, y con una pipeta multicanal se realizaron diluciones dobles en serie tomando 10 µl de la solución de mayor concentración y mezclándola con 10 µl de agua en el pocillo adyacente (pocillo 3) de la microplaca, mezclando abundantemente para garantizar una solución homogénea. Esto se realizó seriadamente hasta el pocillo 5, el cual correspondió a la menor concentración (64 µg/ml) probada en este protocolo.

Tras la dilución final, en cada pocillo quedan 10 µl de solución peptídica. También, se añadieron 90 µl de la solución bacteriana de DO = 0,01, a cada pocillo de las diferentes concentraciones de plcat1lat o plcat2lat para, *a posteriori*, ser incubadas en estufa durante 16-20 h a 37 °C.

Después del tiempo indicado, se registró la DO600 de cada microplaca para cuantificar el crecimiento bacteriano total en cada pocillo. Se desecharon los medios de crecimiento gastados, se realizaron dos lavados con agua destilada, se eliminó el exceso de agua y se agregó a cada pocillo 150 µl de metanol dejando reposar por 20 min; luego se vaciaron y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche (overnight).

La biomasa adherida en cada pocillo de las microplacas fue teñida, una vez transcurrido el tiempo indicado, agregando 150 µl de una solución CV 2% (p/v), durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez descartada la solución de tinción de CV de todos los pocillos, se lavaron delicadamente dos veces las

placas con agua destilada, se eliminó el exceso de agua y se dejaron secar por unos minutos.

Luego se añadió a cada pocillo 150 µl de etanol al 95% (vol/vol) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con el fin de desteñir el CV. Finalmente, se midió la absorbancia de cada microplaca a 595 nm (A595).

El mismo protocolo de inhibición de biofilm se llevó a cabo en las cepas bacterianas provenientes de aislados clínicos, y para los antibióticos control (ampicilina y gentamicina). Además, todas las condiciones y concentraciones se realizaron por triplicado.

3.2.4.2.1 Controles

Se realizaron controles positivos, controles negativos y controles con antibióticos. Los controles positivos se ubicaron en la columna 11 de las placas de microtitulación y, consistieron en agua destilada, MHB y suspensión microbiana. Los controles negativos también se realizaron en placas de microtitulación, y consistieron en agua destilada, MHB y el agente antimicrobiano (plcat1lat o plcat2lat). Igualmente, con los antibióticos control ampicilina y gentamicina se replicó el ensayo de inhibición de biofilm.

3.2.4.2.2 Análisis estadísticos

Para evaluar la distribución de los datos, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de ANOVA de dos vías, y la comparación por pares de Bonferroni para analizar la actividad antibiofilm de los péptidos diseñados en función de su concentración, frente a las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, tanto para las cepas ATCC, como para las cepas aisladas. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software comercial SPSS versión 25 (IBMCorp Ibm, 2017), y se estableció un nivel de significación estadística de alfa 0,05.

3.2.5 Aplicación de microscopía electrónica de barrido a muestras bacterianas expuestas a plcat1lat o plcat2lat

Con la finalidad de ampliar el espectro de caracterización de los efectos antimicrobianos de los péptidos, se aplicó SEM para visualizar los cambios morfológicos en las células de cepas bacterianas ATCC de *S. aureus* y *E. coli* expuestas a la concentración de 512 µg/ml de alguno de los péptidos, plcat1lat o plcat2lat, durante 0, 10, 20 y 30 min.

Luego de la exposición al péptido en el tiempo determinado (0, 10, 20, 30 min), con un asa de Kolle estéril se tomó una muestra de la bacteria (alguna de las 4 cepas) y se diluyó en solución buffer fosfato, pH 7. De esta dilución se tomaron 200 µl que se mezclaron con una solución fijadora, que consistió en glutaraldehído 2,5% (1800 µl) obteniendo un volumen final de 2 ml.

Transcurridas 2 h y a temperatura ambiente, se procedió a lavar el fijador realizando 3 lavados consecutivos con una duración de 10 minutos cada uno en solución de alcohol 10%. Posteriormente, se deshidrató la muestra en soluciones de etanol de concentraciones crecientes durante 10 minutos en cada una. Las concentraciones utilizadas fueron: 30, 50, 70 y 100%.

Finalizada la deshidratación, se realizó el filtrado de la muestra utilizando un filtro de fibra de vidrio, con poro de 0,22 µm, resistente a solventes. Estos mismos pasos se repitieron para todas las muestras en los tiempos indicados anteriormente. El procedimiento de secado por punto crítico, el metalizado con oro, y la observación de las muestras en el SEM Carl Zeiss Sigma fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Materiales por Espectrometría de Rayos X (LAMARX), ubicado en la Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación, Universidad Nacional de Córdoba.

3.2.6 Determinación de la viabilidad celular en células VERO

La citotoxicidad de plcat1lat y plcat2lat se evaluó en células de mamífero de la línea VERO, cultivadas bajo condiciones estándar. Los péptidos previamente disueltos en DMSO estéril al 5 % y que poseían una concentración final de 1 mg/mL, fueron llevados a un rango de concentración entre 0.5 y 1 %. A partir de estos se prepararon diluciones seriadas de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL en medio de cultivo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos ($1E^4$ células/pocillo) y, tras alcanzar la adherencia, fueron expuestas a cada una de las concentraciones de los péptidos durante 24 y 48 h. Los controles incluyeron un control negativo (células sin tratamiento) y un control de vehículo (DMSO 1 % en medio de cultivo). Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTT, siguiendo protocolos estandarizados (Riss *et al.*, 2016). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (CLARIOstar®, BMG Labtech) luego de 24 h a 570 nm, y 48 h a 655 nm.

3.2.6.1 Análisis estadísticos y parámetros de citotoxicidad

Los datos de viabilidad celular obtenidos en el ensayo de citotoxicidad fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías, considerando como factores el tipo de péptido (plcat1lat y plcat2lat) y la concentración ensayada (200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$), así como su interacción. Además, se aplicó el método de comparaciones múltiples de Bonferroni para la evaluación post hoc. Los análisis se realizaron con el software SPSS versión 25 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.). En todos los casos, se adoptó un nivel de significancia estadística de $\alpha = 0,05$.

Posteriormente, a partir de las curvas dosis–respuesta se estimaron los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de cada péptido, definida como la concentración necesaria para reducir en un 50 % la viabilidad celular, parámetro que permite comparar la potencia citotóxica entre compuestos. Asimismo, se calculó el índice de selectividad (IS), obtenido como la razón entre la IC_{50} en células eucariotas y la CMI frente a bacterias, lo que permite valorar la relación entre citotoxicidad y efectividad antimicrobiana de los péptidos.

3.3 Resultados

3.3.1 Actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat. Cepas ATCC

La actividad antimicrobiana de ambos péptidos y el antibiótico control frente a *S. aureus* ATCC mostró diferencias significativas ($F = 21,858$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

Tanto plcat1lat como plcat2lat son capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC (Figura 21) Sin embargo, en este caso, la actividad antimicrobiana de plcat2lat y del antibiótico control (ampicilina) fue similar entre ellos, aunque menor que la de plcat1lat ($p = 0,001$ y $p = 0,0001$, respectivamente).

La concentración a la cual son empleados plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control, también influyó sobre la inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC ($F = 505,859$; $gl = 5$; $p = 0,0001$; $N = 54$). La actividad antimicrobiana a una concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$ fue superior a la del control positivo ($p = 0,0001$). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de esta última concentración fue menor en comparación a las demás (512, 256, 128, y 64 $\mu\text{g/ml}$) ($p = 0,0001$). Además, la actividad antimicrobiana a 64 $\mu\text{g/ml}$ fue igual a la actividad antimicrobiana a la concentración de 512 $\mu\text{g/ml}$, y sorprendentemente mayor que la de las concentraciones 256 y 128 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,012$, $p = 0,014$). Finalmente, la actividad antimicrobiana a 512, 256, y 128 $\mu\text{g/ml}$ fue similar entre ellas.

La actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC también varió según la interacción entre el tipo de agente antimicrobiano (ya sean los péptidos o el antibiótico control) y la concentración a la cual se emplearon ($F = 12,221$; $gl = 10$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

A concentraciones de 0, 128 y 256 $\mu\text{g/ml}$, plcat1lat, plcat2lat, y el antibiótico control inhibieron el crecimiento de *S. aureus* ATCC de manera similar. Sin embargo, a 32 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat fue mayor que la del antibiótico control ($p = 0,0001$). Asimismo, la actividad antimicrobiana de plcat2lat a 32 $\mu\text{g/ml}$ fue mayor que la del antibiótico control ($p = 0,011$). A 64 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat y del antibiótico control fue similar entre ambos, pero mayor que la de plcat2lat ($p = 0,0001$). Finalmente, a la concentración de 512 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat fue similar entre ambos, pero mayor que la del antibiótico control ($p = 0,0001$) (Figura 21).

La actividad antimicrobiana de los péptidos plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control frente a *E. coli* ATCC (Figura 21) fue diferente entre ellos ($F = 26,893$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

Los péptidos plcat1lat y plcat2lat son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC, sin embargo, su actividad antimicrobiana es menor que la del

antibiótico control ($p = 0,0001$ y $p = 0,003$ respectivamente). No obstante, la actividad antimicrobiana de plcat2lat fue mayor a la de plcat1lat ($p = 0,002$).

La concentración a la cual son empleados ambos péptidos y el antibiótico control es un factor que también influyó sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC ($F = 428,196$; $gl = 5$; $p = 0,0001$; $N = 54$). La actividad antimicrobiana a concentraciones de 512, 256, 128 y 64 $\mu\text{g/ml}$ fue similar entre ellas, pero superior a la mostrada por la concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$ y el control positivo (0 $\mu\text{g/ml}$) ($p = 0,0001$). Asimismo, la actividad antimicrobiana a 32 $\mu\text{g/ml}$ fue mayor que la del control positivo ($p = 0,0001$).

La actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC también varió según la interacción entre el tipo de antibiótico (ya sean los péptidos o el control) y la concentración a la cual se emplearon ($F = 7,233$; $gl = 10$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

A concentraciones de 512, 64, y 0 $\mu\text{g/ml}$, tanto plcat1lat, plcat2lat, y el antibiótico control inhibieron el crecimiento de *E. coli* ATCC de manera similar. Sin embargo, a 256 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat2lat y el antibiótico control fue similar entre ellos, pero mayor que la actividad antimicrobiana de plcat1lat ($p = 0,022$ y $p = 0,011$ respectivamente). A 128 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat2lat fue similar a la del antibiótico control y la de plcat1lat. No obstante, la actividad antimicrobiana del antibiótico control fue mayor que la de plcat1lat ($p = 0,030$). Finalmente, a 32 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat fue similar entre ellos, pero menor que la del antibiótico control ($p = 0,0001$) (Figura 21).

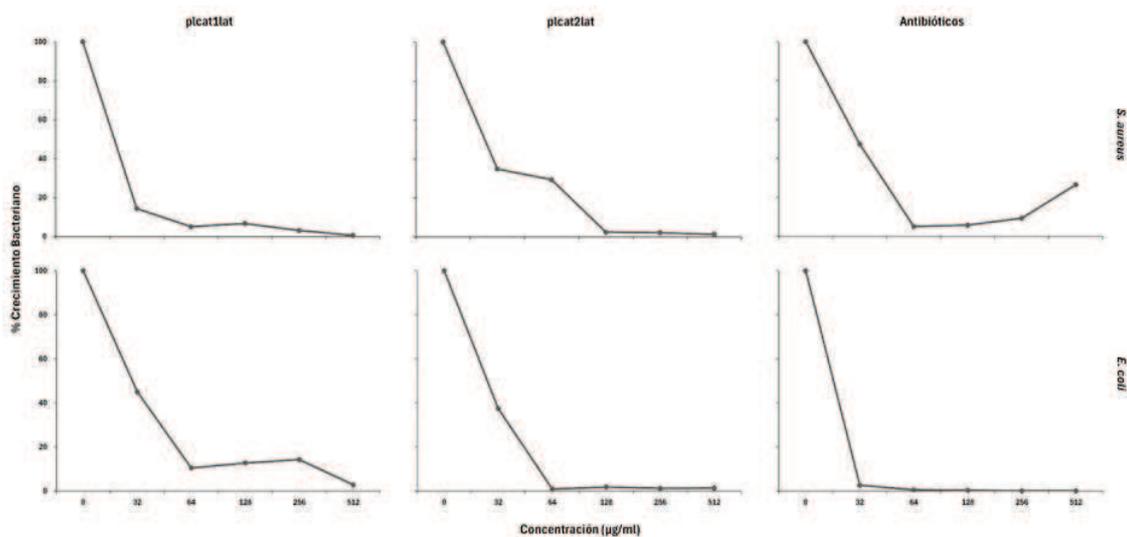


Figura 21. Actividad antimicrobiana de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas ATCC de *S. aureus* y *E. Coli*.

3.3.2 Actividad antimicrobiana de plcat1lat y plcat2lat. Cepas provenientes de aislados clínicos

La actividad antimicrobiana de ambos péptidos y el antibiótico control frente al aislado de *S. aureus* mostró diferencias significativas ($F = 280,030$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 54$). Tanto plcat1lat como plcat2lat fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Figura 22). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de plcat1lat fue mayor que la de plcat2lat ($p = 0,0001$), pero la actividad antimicrobiana del antibiótico control fue mayor que la de plcat1lat y plcat2lat ($p = 0,0001$).

La concentración a la cual son empleados plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control, también influyó sobre la inhibición del crecimiento del aislado de *S. aureus* ($F = 339,639$; $gl = 5$; $p = 0,0001$; $N = 54$). La actividad antimicrobiana a la concentración 512 µg/ml fue similar a la de 256 µg/ml, pero superior a la de 128 µg/ml ($p = 0,003$), 64, 32, y 0 µg/ml ($p = 0,0001$). Asimismo, la actividad antimicrobiana a la concentración de 256 µg/ml fue similar a la de 128 µg/ml, pero mayor a la de 64, 32, y 0 µg/ml ($p = 0,0001$) y, la actividad antimicrobiana a la concentración de 128 µg/ml a la de 64 µg/ml ($p = 0,027$), 32, y 0 µg/ml ($p = 0,0001$). Finalmente, la actividad antimicrobiana a la concentración de 64

$\mu\text{g/ml}$ fue mayor a la de $32 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0001$) y superior a la mostrada por el control positivo ($0 \mu\text{g/ml}$) ($p = 0,0001$).

La actividad antimicrobiana frente a la cepa aislada de *S. aureus* también varió según la interacción entre el tipo de antibiótico (ya sean los péptidos plcat1lat y plcat2lat o el control) y la concentración a la cual se emplearon ($F = 35,542$; $gl = 10$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

A la concentración de $0 \mu\text{g/ml}$, tanto plcat1lat, plcat2lat, como el antibiótico control inhibieron el crecimiento del aislado de *S. aureus* de manera similar. Sin embargo, en el resto de las concentraciones ($32, 64, 128, 256, \text{ y } 512 \mu\text{g/ml}$) la actividad antimicrobiana de plcat1lat y el antibiótico control fue similar entre ellos, e incluso mayor que la actividad de plcat2lat ($p = 0,0001$) (Figura 22).

La actividad antimicrobiana de los péptidos de *C. latirostris* y el antibiótico control frente a la cepa aislada de *E. coli* fue diferente entre ellos ($F = 271,625$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

Los péptidos plcat1lat y plcat2lat son capaces de inhibir el crecimiento del aislado de *E. coli* (Figura 22). La actividad antimicrobiana de plcat2lat fue menor en comparación a plcat1lat y al antibiótico control ($p = 0,0001$). Además, la actividad antimicrobiana de plcat1lat fue igual a la del antibiótico control.

La concentración a la cual son empleados plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control, es un factor que también influyó sobre la inhibición del crecimiento del aislado de *E. coli* ($F = 679,338$; $gl = 5$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

La actividad antimicrobiana a la concentración $512 \mu\text{g/ml}$ fue mayor que la de $256 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,021$), $128, 64, 32, \text{ y } 0 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0001$). Asimismo, la actividad antimicrobiana a la concentración de $256 \mu\text{g/ml}$ fue mayor que la de $128, 64, 32, \text{ y } 0 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0001$). Finalmente, la actividad antimicrobiana a concentraciones de $128, 64, \text{ y } 32 \mu\text{g/ml}$ fue similar entre ellas, pero superior a la mostrada por el control positivo ($0 \mu\text{g/ml}$) ($p = 0,0001$).

La actividad antimicrobiana frente al aislado de *E. coli* también varió según la interacción entre el agente antibiótico (péptidos o antibiótico control) y la concentración a la cual se emplearon ($F = 32,184$; $gl = 10$; $p = 0,0001$; $N = 54$).

A la concentración de $512 \mu\text{g/ml}$, tanto plcat1lat, plcat2lat, y el antibiótico control inhibieron el crecimiento del aislado de *E. coli* de manera similar. Sin embargo, a partir de $256, 128, 64, \text{ y } 32 \mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat y el antibiótico control fue similar entre ellos, y mayor que la de

plcat2lat ($p = 0,0001$). Finalmente, a 0 $\mu\text{g/ml}$, la actividad antimicrobiana de plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control fue similar (Figura 22).

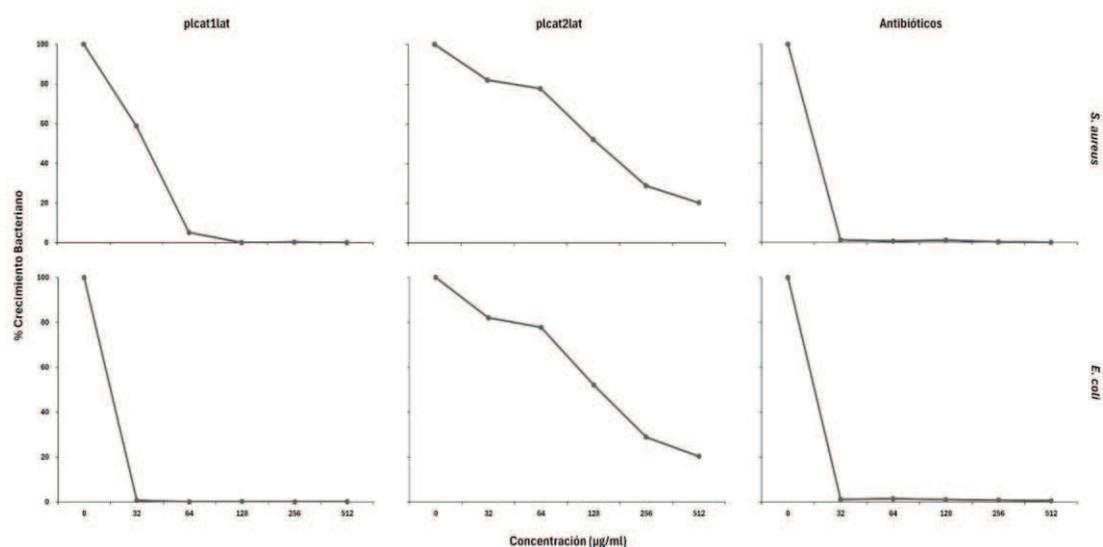


Figura 22. Actividad antimicrobiana de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas provenientes de aislados clínicos de *S. aureus* y *E. coli*.

El análisis de la CMI complementa los hallazgos previos, estableciendo los puntos de corte para la susceptibilidad, resistencia e intermedio de los péptidos. De acuerdo con los criterios interpretativos, plcat1lat presenta una CMI de susceptibilidad para *S. aureus* (ATCC y aislado) de 64 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para *E. coli* ATCC la susceptibilidad inicia ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ y para la cepa proveniente del aislado inicia en ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$.

En contraste, plcat2lat exhibe una CMI de susceptibilidad para *S. aureus* ATCC de 128 $\mu\text{g/ml}$ y para la cepa aislada >512 $\mu\text{g/ml}$; para *E. coli* ATCC la susceptibilidad ocurre a partir de 64 $\mu\text{g/ml}$ y para la cepa aislada ocurre en ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ (ver Tabla 14).

Tabla 14. Criterios interpretativos de CMI para plcat1lat y plcat2lat.

Cepa bacteriana	Criterio	plcat1lat CMI ($\mu\text{g/ml}$)	plcat2lat CMI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. aureus</i> (ATCC)	Susceptible	≥ 64	≥ 128
	Intermedio	32	64–32
	Resistente	< 32	< 32
<i>S. aureus</i> (Aislado)	Susceptible	≥ 64	>512

	Intermedio	32	512–128
	Resistente	< 32	> 32
<i>E. coli</i> (ATCC)	Susceptible	≥ 512	≥ 64
	Intermedio	64–256	32
	Resistente	≤ 32	< 32
<i>E. coli</i> (Aislado)	Susceptible	≥ 32	≥ 512
	Intermedio	–	256–32
	Resistente	< 32	< 32

3.3.3 Actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat. Cepas ATCC

La actividad antibiofilm de los péptidos y el antibiótico control frente a *S. aureus* ATCC mostró diferencias significativas ($F = 209,679$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 45$). Tanto plcat1lat como plcat2lat inhibieron la formación de biofilm en *S. aureus* ATCC, aunque el antibiótico control fue más efectivo que ambos péptidos ($p = 0,0001$), y la actividad de plcat1lat superó a plcat2lat ($p = 0,001$).

La concentración de los péptidos y el antibiótico control tuvieron efectos significativos en la formación de biofilm de *S. aureus* ATCC ($F = 69,186$; $gl = 4$; $p = 0,0001$; $N = 45$). Las concentraciones de 512 y 256 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron una actividad similar entre sí, pero fueron superiores a las de 128, 64 y 0 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,001$). Además, a 128 $\mu\text{g/ml}$ la actividad antibiofilm fue mayor que a 64 y 0 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,01$), y la concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$ fue más efectiva que el control positivo ($p = 0,001$) (Figura 24).

La actividad antibiofilm contra *S. aureus* ATCC también estuvo influenciada por la interacción entre el tipo de agente y la concentración ($F = 17,875$; $gl = 8$; $p = 0,0001$; $N = 45$). A 0 $\mu\text{g/ml}$, todos los agentes mostraron efectos similares; sin embargo, a 64 $\mu\text{g/ml}$ el antibiótico control inhibió el biofilm más eficazmente

que plcat1lat y plcat2lat ($p = 0,0001$), y la actividad de plcat1lat superó a la de plcat2lat ($p = 0,018$). A 128 y 256 $\mu\text{g/ml}$, plcat1lat y plcat2lat presentaron actividades similares entre sí, pero fueron menos efectivos que el antibiótico control ($p = 0,0001$). Finalmente, a 512 $\mu\text{g/ml}$, el antibiótico control fue superior a ambos péptidos ($p = 0,0001$), y la actividad de plcat1lat fue mayor que la de plcat2lat ($p = 0,005$) (Figura 23).

De igual manera, la actividad antibiofilm de los péptidos y del antibiótico control contra *E. coli* ATCC varió significativamente entre tratamientos ($F = 59,506$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 45$). Los péptidos plcat1lat y plcat2lat inhibieron la formación de biofilm en *E. coli* ATCC; sin embargo, la actividad de plcat1lat fue menor que la del antibiótico control y la de plcat2lat ($p = 0,0001$). En contraste, la actividad antibiofilm de plcat2lat superó a la del antibiótico control ($p = 0,0001$).

La concentración de plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control también afectó significativamente la formación de biofilm en *E. coli* ATCC ($F = 279,744$; $gl = 4$; $p = 0,0001$; $N = 45$). La actividad antibiofilm a 512 $\mu\text{g/ml}$ fue superior a la observada a concentraciones de 256, 128, y 64 $\mu\text{g/ml}$, así como al control positivo (0 $\mu\text{g/ml}$) ($p \leq 0,002$). Por otra parte, la concentración de 256 $\mu\text{g/ml}$ mostró una actividad antibiofilm mayor que las concentraciones de 128, 64 y 0 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0001$). La actividad antibiofilm a 128 $\mu\text{g/ml}$ fue superior a la de 64 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,01$), a su vez ambas concentraciones fueron superiores al control positivo ($p = 0,0001$) (Figura 23).

La actividad antibiofilm contra *E. coli* ATCC también dependió de la interacción entre el tipo de agente (péptidos o antibiótico) y su concentración ($F = 48,368$; $gl = 8$; $p = 0,0001$; $N = 45$). A 0 $\mu\text{g/ml}$, todos los agentes presentaron actividades similares, aunque a 64 $\mu\text{g/ml}$, plcat1lat y el antibiótico control inhibieron el biofilm de manera comparable, aunque con menor eficacia que plcat2lat ($p = 0,0001$). En 128 $\mu\text{g/ml}$, plcat2lat mostró mayor actividad antibiofilm que el antibiótico control y plcat1lat ($p = 0,0001$), mientras que el antibiótico control fue más eficaz que plcat1lat ($p = 0,0001$). A 256 $\mu\text{g/ml}$, las actividades de plcat2lat, el antibiótico control y plcat1lat fueron similares; sin embargo, el antibiótico control fue más efectivo que plcat1lat ($p = 0,002$). Finalmente, a 512 $\mu\text{g/ml}$, el antibiótico control superó a ambos péptidos ($p =$

0,025 y $p = 0,0001$, respectivamente), aunque plcat1lat mostró mayor actividad antibiofilm que plcat2lat ($p = 0,001$) (Figura 24).

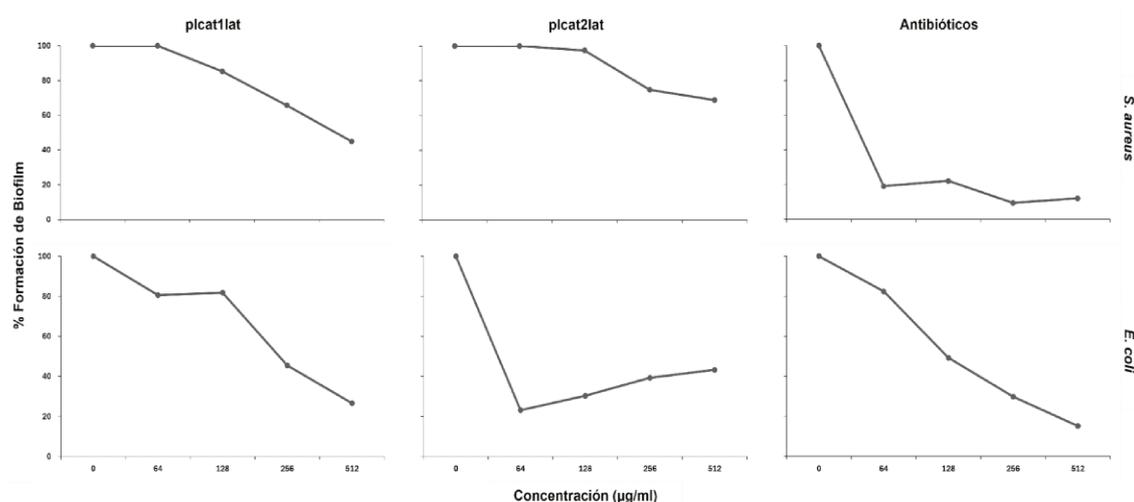


Figura 23. Actividad antibiofilm de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas ATCC de *S. aureus* y *E. coli*.

3.3.4 Actividad antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat. Cepas provenientes de aislados clínicos

Los resultados observados frente a la cepa aislada de *S. aureus* presentaron diferencias significativas en la actividad antibiofilm de los péptidos y el antibiótico de referencia ($F = 104,968$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 45$). Tanto plcat1lat como plcat2lat inhibieron la formación de biofilm en la cepa aislada de *S. aureus*. Sin embargo, la actividad antibiofilm del antibiótico control y plcat1lat fue similar entre ellos, y ambos fueron más efectivos que plcat2lat ($p = 0,0001$). La concentración de plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control también tuvo un efecto significativo en la formación de biofilm de la cepa aislada de *S. aureus* ($F = 230,805$; $gl = 4$; $p = 0,0001$; $N = 45$). La actividad antibiofilm a 512 µg/ml fue superior a la observada a concentraciones de 256, 128, y 64 µg/ml, así como al control positivo (0 µg/ml) ($p \leq 0,012$). A su vez, la concentración de 256 µg/ml mostró una actividad antibiofilm mayor que las concentraciones de 128, 64 y 0 µg/ml ($p \leq 0,001$). La concentración de 128 µg/ml fue superior a la de 64 µg/ml y al control positivo ($p \leq 0,0004$). Por último, la concentración de 64 µg/ml fue superior al control positivo ($p = 0,0001$).

La actividad antibiofilm frente a la cepa aislada de *S. aureus* también dependió de la interacción entre el tipo de agente y la concentración ($F = 9,258$; $gl = 8$; p

= 0,0001; $N = 45$). A 0 $\mu\text{g/ml}$, todos los agentes demostraron efectos equivalentes en la inhibición de biofilm, sin diferencias significativas entre plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control. Sin embargo, a una concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$, la actividad de plcat1lat superó a la de plcat2lat ($p = 0,002$) y fue comparable a la del antibiótico control, mientras que plcat2lat fue más efectivo que el antibiótico control ($p = 0,001$). Esta tendencia continuó a concentraciones de 128, 256 y 512 $\mu\text{g/ml}$, donde plcat1lat mostró una actividad antibiofilm superior a la de plcat2lat ($p = 0,0001$) y fue igualmente eficaz que el antibiótico control, mientras que plcat2lat fue significativamente más efectivo que el antibiótico control en estas concentraciones ($p = 0,0001$) (Figura 24).

La actividad antibiofilm de los péptidos y del antibiótico de referencia frente a la cepa aislada de *E. coli* presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 83,223$; $gl = 2$; $p = 0,0001$; $N = 45$). Los péptidos plcat1lat y plcat2lat mostraron capacidad para inhibir la formación de biofilm en la cepa aislada de *E. coli*. De igual manera, la actividad antibiofilm de plcat2lat fue mayor a la del plcat1lat ($p = 0,025$). Sin embargo, la eficacia del antibiótico control fue mayor en comparación con plcat1lat y plcat2lat ($p = 0,0001$).

Igualmente, la concentración de plcat1lat, plcat2lat y el antibiótico control influyó de manera significativa en la formación de biofilm en la cepa aislada de *E. coli* ($F = 46,307$; $gl = 4$; $p = 0,0001$; $N = 45$). La inhibición a 512 $\mu\text{g/ml}$ fue mayor en comparación con las observadas en concentraciones de 256, 128 y 64 $\mu\text{g/ml}$, así como con el control positivo (0 $\mu\text{g/ml}$) ($p \leq 0,003$). Del mismo modo, la concentración de 256 $\mu\text{g/ml}$ mostró actividad antibiofilm similar a la de 128 $\mu\text{g/ml}$, pero mayor a la actividad de las concentraciones de 64 y 0 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0001$). Por último, la actividad antibiofilm a las concentraciones de 128 y 64 $\mu\text{g/ml}$ fueron similares entre ellas, pero superiores al control positivo ($p = 0,0001$ y $p = 0,020$ respectivamente).

La actividad antibiofilm contra la cepa aislada de *E. coli* también fue afectada por la interacción entre el tipo de agente (péptidos o antibiótico) y la concentración utilizada ($F = 15,888$; $gl = 8$; $p = 0,0001$; $N = 45$). A 0 $\mu\text{g/ml}$, todos los agentes se comportaron de forma similar; sin embargo, a 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$, el antibiótico control inhibió la formación de biofilm de manera superior que plcat1lat y plcat2lat ($p = 0,0001$), aunque plcat2lat mostró mayor actividad que plcat1lat ($p \leq 0,0003$). A 256 $\mu\text{g/ml}$, la actividad de plcat2lat y plcat1lat fue

similar entre ellos; sin embargo, fue menos efectiva que el antibiótico control ($p = 0,0001$). Finalmente, a 512 $\mu\text{g/ml}$, plcat1lat y el antibiótico control mostraron actividad antibiofilm similar entre ellos, pero mayor a la actividad de plcat2lat ($p = 0,0001$) (Figura 24).

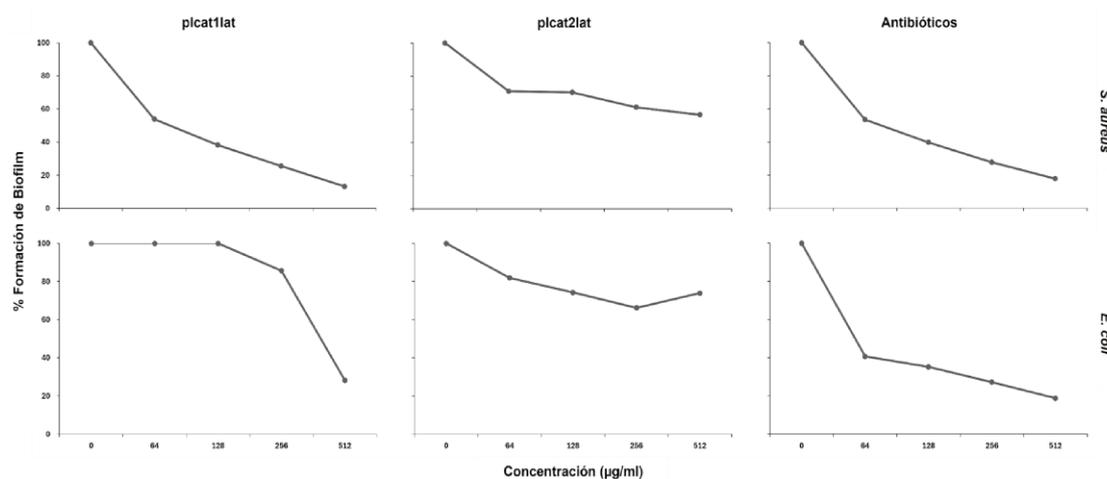


Figura 24. Actividad antibiofilm de plcat1lat, plcat2lat y antibióticos control frente a cepas provenientes de aislados clínicos de *S. aureus* y *E. coli*.

3.3.5 Caracterización de los efectos antimicrobianos de plcat1lat y plcat2lat

El análisis de SEM se realizó para aclarar las posibles alteraciones morfológicas en las bacterias, ocasionadas por la mayor concentración de plcat1lat o plcat2lat a diferentes tiempos de exposición 10, 20 y 30 min.

El control de *S. aureus* ATCC para ambos péptidos (Figura 25A, 26A) presentó una superficie lisa y brillante sin restos celulares aparentes, siendo estas características acordes al estado inalterado de esta bacteria.

La membrana celular de *S. aureus* ATCC, durante los tiempos 10 y 20 min de exposición al plcat1lat (Figura 25B, 25C) mostró pérdida de turgencia, irregularidad de la superficie, rugosidad y ampollas. Subsecuentemente, en el tiempo = 30 min (Figura 25D), la superficie celular de *S. aureus* ATCC se continuó apreciando agrietada, opaca, colapsada e incluso se evidenciaron aglutinaciones celulares.

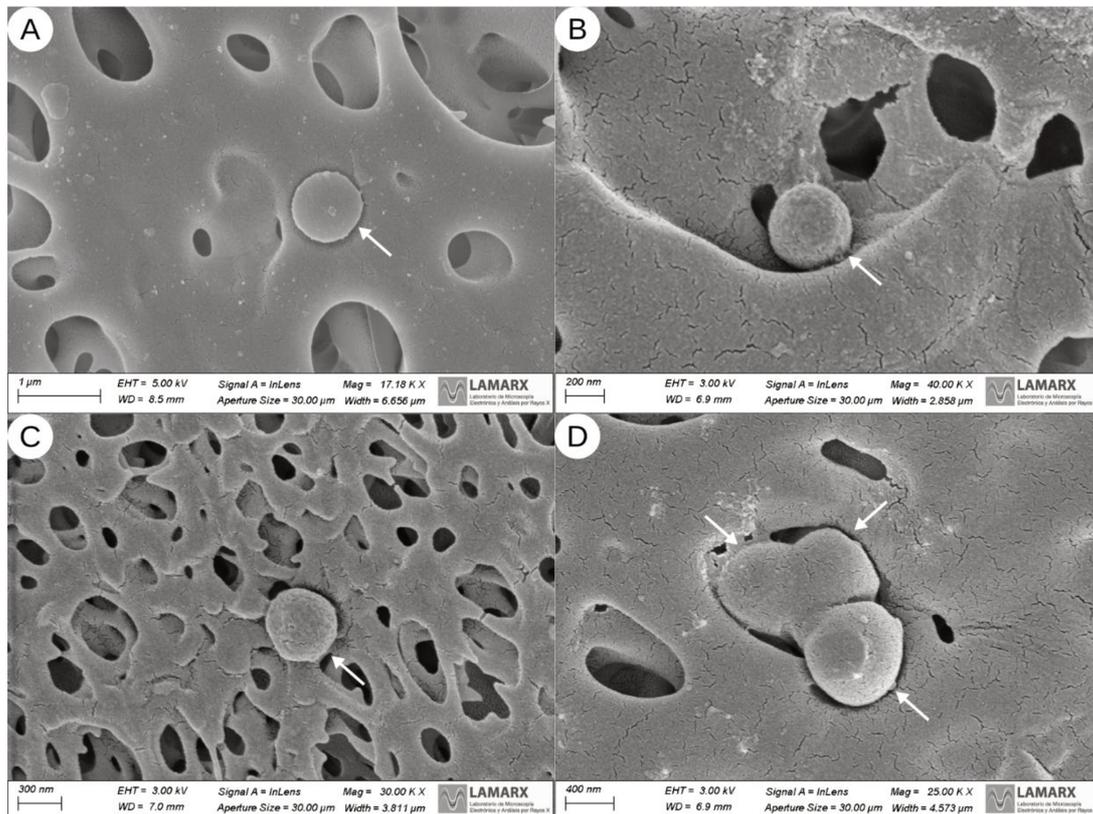


Figura 25. Micrografía SEM de *S. aureus* ATCC mostrando los efectos del péptido plcat1lat sobre la morfología bacteriana. El cuadrante **A** (control) presenta bacterias no expuestas al péptido. Los cuadrantes **B**, **C** y **D** muestran las bacterias expuestas al péptido durante 10, 20 y 30 minutos, respectivamente, en los que se evidencian cambios progresivos en la superficie celular bacteriana, la cual se encuentra señalada por flechas.

Durante la exposición a plcat2lat, la membrana celular de *S. aureus* ATCC, durante el tiempo = 10 min de exposición demostró pérdida de turgencia, encogimiento celular, rugosidad y presencia de ampollas en su superficie (Figura 26B). Igualmente, durante los tiempos de exposición de 20 y 30 min (Figura 26C y 26D) a plcat2lat, las alteraciones evidenciadas en la membrana de *S. aureus* ATCC fueron las mismas que se observaron durante los primeros 10 min de exposición.

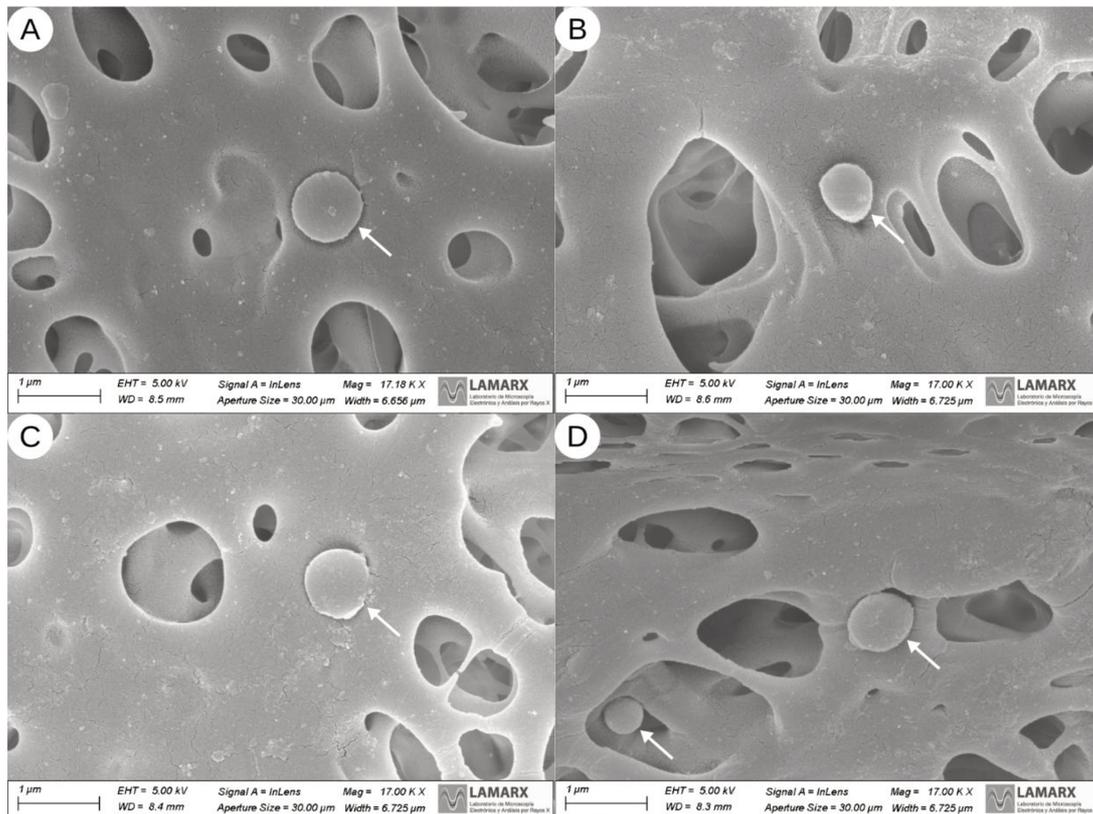


Figura 26. Micrografía SEM de *S. aureus* bajo los efectos del péptido plcat2lat. El cuadrante **A** (control) muestra la bacteria sin exposición al péptido (señalada con una flecha). Los cuadrantes **B**, **C** y **D** ilustran sutiles cambios en la superficie celular bacteriana tras 10, 20 y 30 minutos de exposición a plcat2lat, respectivamente.

El control de *E. coli* ATCC para plcat1lat y plcat2lat (Figura 27A, 28A) presentó una membrana con superficie sin irregularidades, lisa, sin restos celulares aparentes, acordes al estado inalterado de esta bacteria. Igualmente, en algunas bacterias se evidenció la presencia de un flagelo alargado y fino.

La membrana celular de *E. coli* ATCC, durante la exposición a plcat1lat en el tiempo = 10 min, se mostró rugosa e irregular, con abultamientos similares a ampollas (Figura 27B). De igual manera, el tiempo de exposición = 20 min, provocó en la membrana celular de *E. coli* ATCC una contracción mayor, afectando su morfología y siendo evidente incluso en la rotura de la membrana celular (Figura 27C). Consecuentemente, en el tiempo = 30 min (Figura 27D), se visualiza la pérdida de la integridad de la membrana bacteriana con la liberación del contenido intracelular.

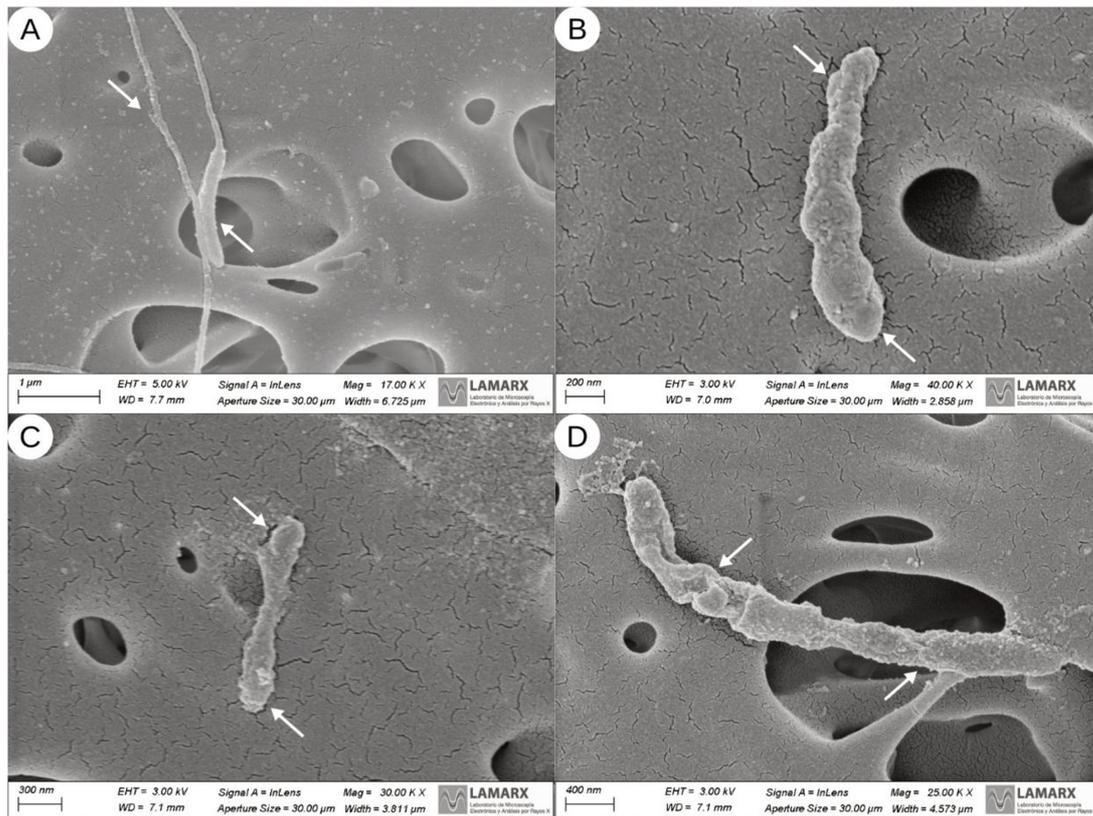


Figura 27. Micrografía SEM de *E. coli* sometida a exposición al péptido plcat1lat, mostrando alteraciones en su superficie celular. El cuadrante **A** (control) refleja la bacteria sin exposición (señalada con una flecha), mientras que los cuadrantes **B**, **C** y **D** ilustran cambios en la morfología celular tras 10, 20 y 30 minutos de exposición, respectivamente. Estos resultados evidencian la progresiva afectación estructural en función del tiempo de contacto con el péptido.

Por otro lado, los cambios evidenciados en morfología de la membrana celular de *E. coli* ATCC frente a la exposición con plcat2lat fueron distintos al ser comparados con plcat1lat.

La primera característica diferencial de la respuesta de *E. coli* ATCC frente a la exposición con plcat2lat fue la presencia de flagelos alargados y delgados. También, durante los tiempos de 10 y 20 minutos (Figura 28B, 28C), se observó en la superficie de la bacteria irregularidades, similares a pequeñas ampollas. En el tiempo = 30 minutos, se siguieron observando las mismas alteraciones, pero esta vez pareciera afectar también la integridad del flagelo (Figura 28D).

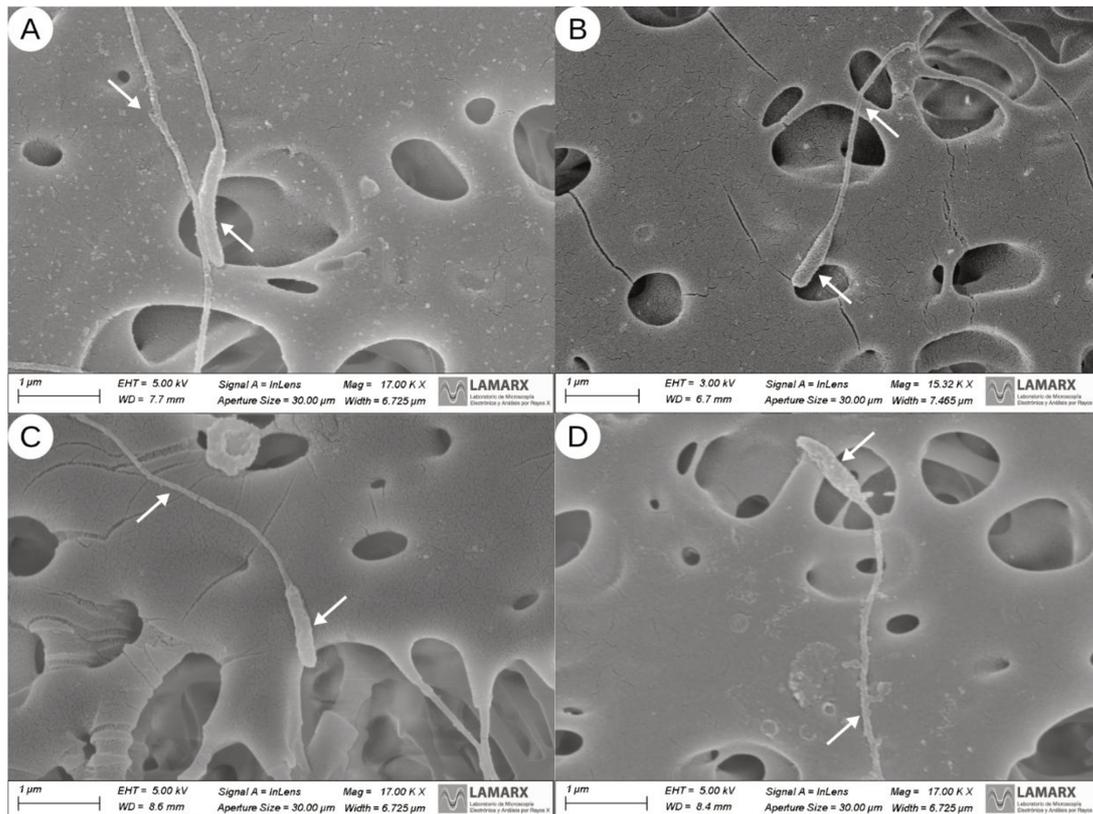


Figura 28. Micrografía SEM de *E. coli* sometida a exposición al péptido plcat2lat, mostrando sutiles alteraciones en su superficie celular y la presencia de flagelos en todos los tratamientos. El cuadrante **A** (control) refleja la bacteria sin exposición (señalada con una flecha), mientras que los cuadrantes **B**, **C** y **D** ilustran la morfología celular tras 10, 20 y 30 minutos de exposición, a plcat2lat.

3.3.6 Viabilidad celular en células VERO posterior a la exposición a plcat1lat o plcat2lat

La evaluación de la viabilidad celular en la línea VERO mostró diferencias significativas entre los péptidos ensayados ($p \leq 0,0001$). El tratamiento con plcat1lat redujo la viabilidad a un 36,9 %, mientras que plcat2lat y el control (DMSO 1 %) presentaron valores de 87,5 % y 84,1 %, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. En relación con la concentración, se observó una disminución progresiva de la viabilidad celular a medida que aumentaba la dosis, con una interacción significativa entre el tipo de péptido y la concentración. En este sentido, plcat1lat evidenció un perfil marcadamente dosis-dependiente, mientras que plcat2lat mantuvo niveles de viabilidad más elevados a concentraciones intermedias y bajas. Los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) estimados fueron de 23,16 $\mu\text{g/mL}$ para plcat1lat y de 0,0036 $\mu\text{g/mL}$ para plcat2lat. Finalmente, el índice de selectividad (IS)

calculado resultó inferior a 1 en ambos casos, con plcat1lat mostrando el mejor desempeño relativo frente a *E. coli* aislado (IS = 0,72), aunque todavía por debajo del umbral esperado para aplicaciones seguras.

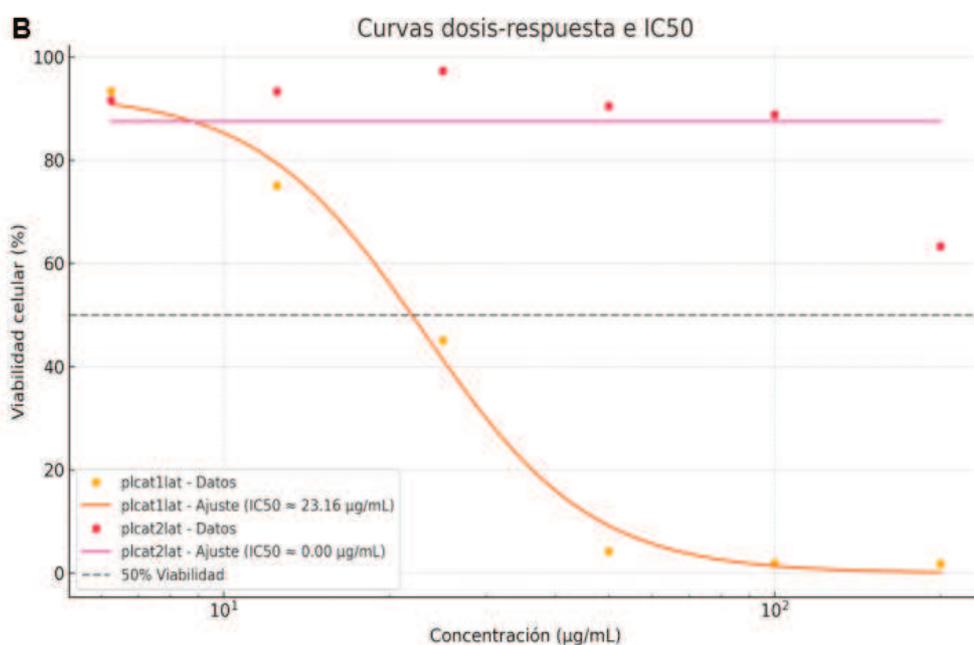
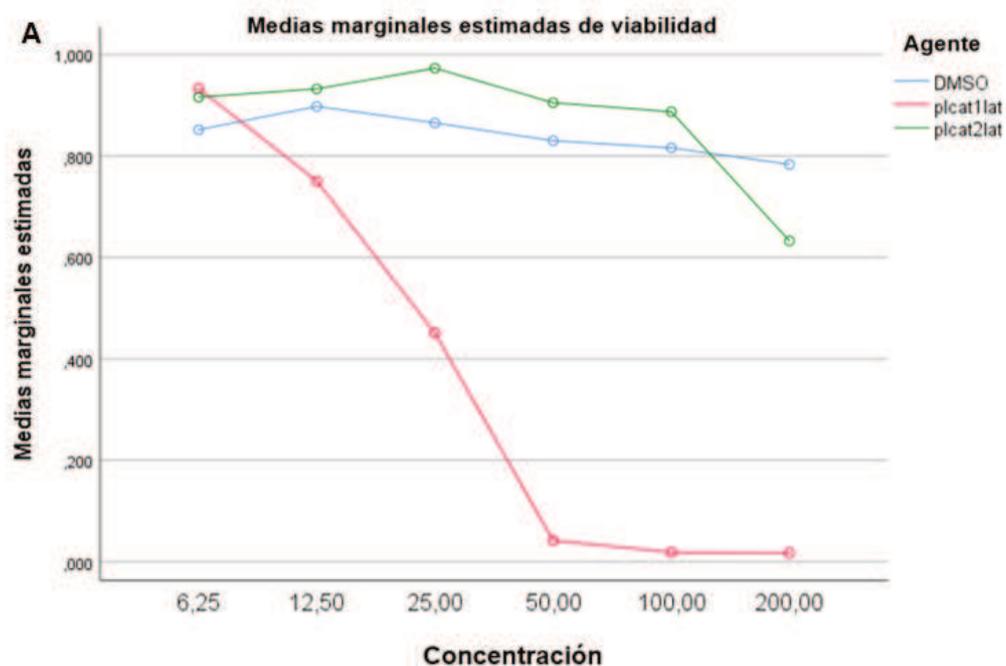


Figura 29. Viabilidad celular en la línea VERO **A.** Medias marginales estimadas de la viabilidad celular obtenidas mediante ANOVA de dos vías, considerando los factores péptido (plcat1lat y plcat2lat) y concentración (200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL). Los valores representan la media ± error estándar. Diferencias significativas se determinaron mediante prueba post hoc de Bonferroni ($\alpha = 0,05$) **B.** Curvas dosis–respuesta ajustadas para plcat1lat y plcat2lat, con cálculo de las concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀).

3.4 Discusión

La emergencia de resistencia antimicrobiana es una preocupación creciente en microbiología clínica y veterinaria, lo que resalta la importancia de realizar investigaciones y ensayos como los presentados en esta investigación para confirmar la efectividad de nuevos agentes antimicrobianos. De acuerdo con De la Rosa-Zamboni *et al.*, (2018), la resistencia puede ser adquirida en especies como Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp., Staphylococcus spp. y Enterococcus spp., lo que justifica la necesidad de pruebas como la microdilución en caldo para determinar la CMI y poder garantizar la eficacia de potenciales agentes antimicrobianos, la reducción de efectos adversos y la prevención de la resistencia bacteriana por sub o supra dosificación (Pandurangi *et al.*, 2024). En este contexto, los péptidos plcat1lat y plcat2lat representan una alternativa prometedora, ya que demostraron no solo actividad antimicrobiana significativa contra patógenos clínicamente relevantes, sino también reflejan la asertividad y lo indispensables que son los análisis bioinformáticos previos a las actividades experimentales.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los péptidos antimicrobianos, plcat1lat y plcat2lat, poseen una actividad significativa contra *S. aureus* y *E. coli*, tanto en cepas ATCC como en cepas de aislados clínicos. Su eficacia estuvo influenciada por la concentración empleada de estos, mostrando un patrón de inhibición bacteriana dependiente de la dosis. El efecto de la concentración sobre la actividad antimicrobiana fue evidente en todos los ensayos. A concentraciones más altas, se observó una inhibición significativa del crecimiento bacteriano, a concentraciones de los péptidos comprendidas entre los 64 y 512 µg/ml, en algunos de los casos, a concentraciones de 32 µg/ml el umbral de inhibición también fue significativamente efectivo. Este comportamiento sugiere una posible saturación en la interacción con los blancos bacterianos, lo que podría ser aprovechado para optimizar las dosis más eficientes (Wu *et al.*, 2022).

Las diferencias observadas en la actividad antimicrobiana de los péptidos evidentes en los valores de CMI (ver Tabla 15) podrían estar relacionadas con variaciones en la estructura de la membrana plasmática entre las cepas ATCC y las cepas provenientes de aislados (Hewelt-Belka *et al.*, 2016; Bisignano *et*

al., 2019), al mismo tiempo que cada péptido podría poseer una afinidad diferencial por componentes específicos de la membrana plasmática de las bacterias Gram positivas o Gram negativas (Söylemez *et al.*, 2022), sugiriendo especificidad de estos hacia distintos tipos de bacterias (*S. aureus* o *E. coli*), por lo que su optimización podría ampliar y mejorar su espectro de acción.

En una investigación realizada por Bisignano *et al.*, (2019) se demostró que los perfiles de lípidos bacterianos varían cualitativa y cuantitativamente entre cepas ATCC y aisladas de *S. aureus* y que esta variación afecta tanto a la resistencia a los antibióticos como a la hidrofobicidad de la superficie celular. Además, tanto Hewelt-Belka *et al.*, (2016) como Bisignano *et al.*, (2019) identificaron lípidos comunes, presentes y abundantes en todas las cepas, así como lípidos característicos, que no estaban presentes y/o eran menos abundantes en todas las cepas. En el caso de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos se encontraron niveles elevados de grupos lipídicos tales como: monoglicosildiactilglicerol, fosfatidilglicerol y diglicosildiactilglicerol (Hewelt-Belka *et al.*, 2016).

En el caso de *E. coli* ATCC a pesar de que la gentamicina fue más eficaz en la inhibición del crecimiento, se ha demostrado que la exposición gradual de la bacteria a este antibiótico es un factor mutante que puede producir fenotipos de colonias pequeñas (SCV) y convertir a *E. coli* ATCC 25922 en una bacteria con resistencia a múltiples agentes antibacterianos, como los aminoglucósidos (Noaman *et al.*, 2023). La gentamicina es un antibiótico bactericida eficaz contra Gram negativas, que se une directamente a los ribosomas (ARNr 30S) inactivándolos y provocando una alteración en la producción de proteínas (Hancock, 1981), por lo que se espera que las concentraciones graduadas de este antibiótico causen mutagenicidad directa en uno de los dos mecanismos mencionados (Noaman *et al.*, 2023). Es importante señalar que la CMI de la gentamicina frente a *E. coli* SCV mutada, en un estudio realizado por Noaman *et al.*, (2023), fue superior a 256 µg/ml, por lo que sería adecuado probar *plcat2lat* en *E. coli* SCV mutadas tomando en cuenta el valor de CMI obtenido en la presente investigación.

Tomando en cuenta, que la principal patología diana de interés de aplicación terapéutica de *plcat1lat* y *plcat2lat* es la mastitis bovina, cabe resaltar que de acuerdo a Fazel *et al.*, (2019) de 70 aislados de *E. coli* provenientes de mastitis

bovina, el 47,1% portaba al menos uno de los genes ubicuos (*strA*, *strB* y *aadA*) que causan resistencia a los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, entre los que se encuentra la gentamicina. Sin embargo, para este antibiótico las cepas aisladas mostraron una menor resistencia fenotípica (49,29%) en comparación al resto de los antibióticos respectivamente. Considerando lo anterior y los resultados de esta investigación, es probable que la susceptibilidad de la cepa de *E. coli* aislada de mastitis bovina frente a *plcat1lat* sea muy similar a la de la gentamicina.

En conclusión, el potencial antimicrobiano de *plcat1lat* y *plcat2lat* es comparable con el de los PDHs reportados en otras especies de cocodrilianos, que han mostrado eficacia contra bacterias multirresistentes sin presentar citotoxicidad significativa en modelos celulares (Soehnlein *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2016, Barksdale *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2018; Santana *et al.*, 2021). No obstante, aún falta demostrar el/los mecanismos(s) de acción de *plcat1lat* y *plcat2lat*, aunque es probable que se asemeje al reportado por Santana *et al.*, (2022) en la catelicidina 8 de *A. sinensis* (As-CATH8), la cual actúa despolarizando y permeabilizando las membranas de *S. aureus* y *A. baumannii*. Además, en concentraciones cercanas a la CMI, As-CATH8 muestra efectos modestos sobre las membranas, mientras que la internalización del péptido y la señalización intracelular aún pueden haber ocurrido a estas concentraciones.

La resistencia a los antibióticos también parece estar relacionada con la fuente de infección de la cual se aislen las cepas; esto también refleja su capacidad potencial para formar biofilm. La principal respuesta adaptativa de las células a un antimicrobiano es mantener la fluidez de sus membranas en un valor constante, independientemente de las condiciones ambientales adversas. Dicha estabilización representa la principal respuesta de las bacterias a los compuestos membrana-activos o a los cambios en las condiciones ambientales (Heipieper *et al.*, 2003), evitando así la pérdida de las propiedades físicoquímicas de la bicapa lipídica (Russell y Fukunaga, 1990).

De esta manera, los ensayos de actividad antibiofilm confirmaron la efectividad de ambos péptidos en la inhibición de la formación de biofilm por parte de *S. aureus* y *E. coli*, lo que sugiere un mecanismo de acción diferencial con potencial para aplicaciones terapéuticas. En general, la actividad antibiofilm

aumentó con la concentración del péptido, alcanzando los valores más altos a 512 µg/ml. Esta tendencia coincide con lo reportado por Mandalari *et al.*, (2023), en el cual se obtuvo un efecto dosis-dependiente sobre la formación de biopelículas en diferentes cepas de *S. aureus* mediante el polifenol Floretina. Hasta el momento no existen investigaciones de catelicidinas de cocodrilianos donde evalúen su actividad antibiofilm, sin embargo Santana *et al.*, (2021) reportaron que la beta-defensina de *A. mississippiensis* (Am23SK) demostró ser un péptido activo, capaz de afectar al crecimiento planctónico y la formación de biopelículas de varios patógenos bacterianos a concentraciones inferiores a las de la más activa de las defensinas humanas con actividad antimicrobiana de amplio espectro documentada, HBD3.

En particular, plcat2lat destacó por su actividad antibiofilm superior al antibiótico control (ampicilina) contra *E. coli* ATCC. Contrariamente, para las cepas provenientes de los aislados clínicos, aunque ambos péptidos lograron inhibir la formación de biofilm, su eficacia fue menor que la de los antibióticos control.

A pesar de que ambos péptidos mostraron alguna actividad antibiofilm sobre las bacterias testeadas en esta investigación, son necesarias modificaciones posteriores en cuanto a su secuencia aminoacídica y/o probarlos en conjunto con otros antibióticos existentes para demostrar posibles efectos sinérgicos que optimicen su acción antibiofilm, tal como lo afirma Bai *et al.*, (2022). Igualmente, es recomendable no concebir las terapias con péptidos antibiofilm como una alternativa o sustitución a los antibióticos, por lo que su uso previsto como terapias independientes, transformadoras, aumentativas o reparadoras debe definirse en una fase temprana del proceso de desarrollo, ya que esto determinará qué modelos de infección pueden ser adecuados para la determinación preclínica de la eficacia (Hancock *et al.*, 2021).

En general, las bacterias han desarrollado complejos programas genéticos y bioquímicos para mantener sus formas clásicas. Sin embargo, el tamaño y la forma típicos de las células bacterianas dependen de numerosas variables propias de los entornos particulares asociados a estas. Para cada especie, las dimensiones del diámetro y la longitud de la célula están estrictamente controladas, como lo demuestra la mínima variación de tamaño que puede

detectarse entre bacterias cultivadas en condiciones de crecimiento similares (Justice *et al.*, 2008).

Los efectos sobre las membranas bacterianas ocasionados por los péptidos plcat1lat y plcat2lat, fueron evidentes en las micrográficas electrónicas obtenidas (Figuras 25, 26, 27, 28). En *S. aureus* ATCC ambos péptidos generaron como mecanismo de acción la disrupción de la membrana bacteriana, parte de la estructura del peptidoglicano celular apareció deprimida y arrugada, lo que indica un daño inicial y el inicio de la filtración del contenido intracelular (García-Salinas *et al.*, 2018). Cabe resaltar que, aunque no se reflejaron otros cambios en la morfología de *S. aureus*, la exposición de la bacteria a plcat1lat durante 30 minutos (Figura 25D) alteró gravemente la pared y la membrana celular de *S. aureus* generando la conjunción de varias bacterias o la formación de una bacteria pseudomulticelular. Este último fenómeno ocurre cuando se impide la separación celular en los cocos en división, dando lugar a células con múltiples septos. Los fármacos antibacterianos que inducen este cambio incluyen inhibidores de la síntesis de peptidoglicano de las clases beta-lactámica y glicopéptidos, inhibidores de la síntesis de proteínas cloranfenicol, lincomicina y minociclina, y el inhibidor de la síntesis de ácido fólico trimetoprima (Cushnie *et al.*, 2016).

Contrario a *S. aureus*, la integridad de la membrana de *E. coli* frente a plcat1lat (Figura 27) resultó comprometida a partir de los primeros 10 minutos de exposición, explicando la actividad bactericida de dicho péptido (Otto *et al.*, 2010) sobre *E. coli* ATCC. Las micrográficas mostraron alteraciones morfológicas tales como lisis de la integridad de la membrana externa en las células comparándose el daño al ocasionado por diferentes componentes de origen natural presentes en aceites esenciales, tales como carvacrol, cinamaldehído y timol (García-Salinas *et al.*, 2018).

También, en *E. coli* para ambos péptidos (Figura 27 y 28), se observó en la morfología de esta bacteria 'ampollas', las cuales son protuberancias localizadas en la membrana externa de las células bacterianas Gram negativas, una capa de peptidoglicano intacta y una membrana citoplasmática que impide la extrusión del citoplasma. Las ampollas pueden aparecer durante el crecimiento normal de las bacterias, pero aumentan en número después del tratamiento con ciertos antibióticos y biocidas. Se ha informado de la formación

de ampollas inducida por agentes antibacterianos en numerosas especies Gram negativas, incluida *E. coli*. La formación de ampollas se produce después del tratamiento con agentes activos en la membrana e inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas (Cushnie *et al.*, 2016).

De esta manera, se expone que frente a la acción antimicrobiana de ambos péptidos la plasticidad morfológica de las bacterias patógenas es una respuesta directa y adaptativa a la detección de cambios ambientales, lo cual da lugar a organismos más aptos que pueden sobrevivir a múltiples formas de estrés externo, y en esta respuesta recae la importancia de caracterizar y optimizar los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos evaluados, para hacerlos aún más potentes y eficaces.

Asimismo, a pesar de que los resultados de viabilidad celular en células VERO resultaron ser mejores para plcat2lat, en comparación a plcat1lat, los parámetros relacionados a la citotoxicidad, IC₅₀ e IS, reflejaron una marcada citotoxicidad dosis-dependiente en ambos péptidos. Este hallazgo limita su potencial aplicación sistémica directa y resalta la necesidad a futuro de explorar modificaciones estructurales, formulaciones alternativas o aplicaciones terapéuticas localizadas que reduzcan el riesgo de efectos adversos.

DISCUSIÓN GENERAL



El desarrollo de nuevos fármacos representa un desafío considerable para el avance médico y científico. Este proceso, con un promedio de 15 años de duración y precios que oscilan entre 161 y 4.500 millones de dólares (Cesaro *et al.*, 2025; Schlander *et al.*, 2021), no solo es prolongado y costoso, sino que enfrenta amenazas adicionales como la emergencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Esta problemática global añade una presión significativa sobre los sistemas de salud y subraya la urgencia de adoptar enfoques innovadores para agilizar y optimizar el descubrimiento de compuestos terapéuticos efectivos. En este contexto, las herramientas basadas en inteligencia artificial y metodologías computacionales han surgido como piezas centrales en el panorama de la investigación biomédica moderna, permitiendo explorar espacios químicos más amplios y acelerar procesos que anteriormente requerían décadas.

El presente trabajo de tesis ejemplifica cómo la integración de disciplinas como biología, química, farmacia y ML puede revolucionar la identificación de agentes antimicrobianos. Los péptidos plcat1lat y plcat2lat, derivados del genoma del yacaré overo, destacan no solo por sus propiedades antimicrobianas, sino también por el potencial innovador que representan en un campo donde la resistencia bacteriana sigue siendo una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica y médica. En particular, la capacidad de estos péptidos para inhibir el crecimiento de colonias bacterianas en cepas Gram positivas y Gram negativas, así como la formación de biofilm, refuerza su promesa como alternativas terapéuticas viables.

Sin embargo, los resultados obtenidos muestran aspectos importantes que deben considerarse en el análisis. Por ejemplo, la especificidad observada en la actividad antimicrobiana de ambos péptidos sugiere que sus propiedades fisicoquímicas y estructurales juegan un papel crucial en su eficacia. Esto no es un hallazgo menor, ya que plantea la necesidad de enfoques más dirigidos a optimizar sus características frente a diferentes tipos de bacterias. En el caso de plcat1lat, su mayor efectividad contra *S. aureus* señala una dirección clara para modificaciones futuras: optimizar su interacción con bacterias Gram positivas, considerando las particularidades de sus membranas bacterianas y los linajes más relevantes, como CC97 y t267 (Campos *et al.*, 2022). Por otro lado, el plcat2lat mostró un perfil de actividad más destacado contra *E. coli*,

esto implica que su acción podría estar relacionada especialmente a aquellas cepas asociadas con betalactamasas de espectro extendido (ESBL-Ec). Este hallazgo tiene implicaciones significativas, ya que estas enzimas no solo otorgan resistencia, sino que también facilitan la transferencia de genes entre bacterias, contribuyendo a la rápida propagación de la resistencia antimicrobiana (Nery Garcia *et al.*, 2024).

Es importante resaltar que, aunque ambos péptidos demostraron actividades antibacterianas similares a los antibióticos controles, los valores de CMI obtenidos en cepas ATCC y clínicamente aisladas fueron ligeramente menos competitivos. Este resultado subraya una de las limitaciones actuales de los péptidos, pero también implica el surgimiento hacia estrategias de mejora, como la introducción de mutaciones específicas que optimicen su interacción con bacterias específicas, lo que podría potenciar su actividad antimicrobiana de manera significativa.

Por otro lado, uno de los aspectos menos comprendidos y, por tanto, más prometedores para futuras investigaciones, es el mecanismo antibiofilm ejercido por estos péptidos. La formación de biofilm representa un desafío clínico importante, ya que estas estructuras bacterianas son altamente resistentes a los tratamientos convencionales. Analizar cómo *plcat1lat* y *plcat2lat* impactan en este fenómeno podría aportar información valiosa para delinear asociaciones estructura-función, optimizar la acción de estos péptidos y diseñar terapias más específicas. Sin embargo, es crucial reconocer que las modificaciones orientadas a mejorar su actividad antibiofilm podrían diferir significativamente de aquellas destinadas a potenciar su acción antimicrobiana general, añadiendo un nivel adicional de complejidad al diseño racional de estos agentes.

Además, el presente trabajo pone en evidencia una brecha notable en el conocimiento científico: la limitada exploración de PDHs derivados de cocodrilianos. A pesar del creciente interés en péptidos antimicrobianos de origen animal, los cocodrilianos, como el yacaré overo, han recibido menos atención en comparación con otros reptiles, posiblemente debido a barreras logísticas como el acceso limitado a material genético y la falta de visibilidad de sus propiedades inmunológicas. Esta situación contrasta con el potencial biotecnológico de estas especies, que además desempeñan roles ecológicos

clave como modificadores del hábitat e indicadores ambientales en regiones como Santa Fe. Superar estas barreras mediante la publicación abierta de datos genómicos y el fomento de colaboraciones internacionales podría no solo ampliar el panorama de investigación en PDHs, sino también contribuir a estrategias de conservación más efectivas para estas especies (Cordero *et al.*, 2024).

Finalmente, se vislumbran múltiples oportunidades para optimizar las propiedades de plcat1lat y plcat2lat. Las simulaciones de dinámica molecular, el diseño racional mediante mutaciones específicas y el uso de análisis estructurales avanzados como microscopía electrónica criogénica representan enfoques prometedores para comprender y mejorar su mecanismo de acción. Además, los ensayos *in vivo* en modelos animales permitirán evaluar su eficacia y seguridad en contextos biológicamente relevantes, un paso esencial para su potencial desarrollo como agentes terapéuticos. Este enfoque está respaldado por avances recientes en la síntesis de péptidos, que han reducido significativamente los costos de producción y mejorado la estabilidad química y metabólica de estos compuestos (Mahlpuu *et al.*, 2020).

También, la evaluación de la citotoxicidad constituyó un componente esencial para complementar los estudios de actividad antimicrobiana y antibiofilm de plcat1lat y plcat2lat. Los resultados resaltan la necesidad de continuar realizando ensayos de viabilidad celular en un rango más amplio de concentraciones y en diferentes líneas celulares, a fin de obtener un panorama más completo sobre su perfil de seguridad. Parámetros como IC_{50} e IS se revelan fundamentales para establecer la relación entre la eficacia antimicrobiana y los posibles efectos adversos sobre células eucariotas. En este sentido, aunque los valores alcanzados en este estudio muestran limitaciones para aplicaciones sistémicas, constituyen un punto de partida valioso que orienta futuras investigaciones hacia la optimización de las secuencias peptídicas, el desarrollo de formulaciones más seguras y la definición de contextos de uso más apropiados, como aplicaciones tópicos o en combinación con antibióticos convencionales.

En conjunto, los hallazgos presentados no solo refuerzan la importancia de plcat1lat y plcat2lat como agentes terapéuticos potenciales, sino que también generan interrogantes críticas sobre cómo optimizar su diseño y aplicación en

un contexto clínico. Este trabajo no solo contribuye al conocimiento sobre estos péptidos, sino que también resalta la necesidad de un enfoque multidisciplinario para abordar los complejos desafíos asociados con la resistencia bacteriana y la bioactividad de los PDHs.

CONCLUSIONES



Esta investigación realiza una contribución significativa al identificar y caracterizar dos péptidos antimicrobianos, plcat1lat y plcat2lat, derivados de *C. latirostris*. A través de una combinación de predicciones computacionales y validaciones experimentales, estos péptidos han demostrado potentes actividades antimicrobianas y antibiofilm contra patógenos clínicamente relevantes como *S. aureus* y *E. coli*, subrayando el potencial de estos como alternativas terapéuticas viables, ante la creciente amenaza global de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos que demanda enfoques innovadores en el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos.

Los resultados de esta investigación destacan la importancia de propiedades estructurales y bioquímicas, como la cationicidad, la anfipaticidad y la hidrofobicidad, en los mecanismos antimicrobianos de estos péptidos. Su capacidad para causar disrupción de las membranas bacterianas, evidenciada en los cambios morfológicos observados bajo microscopía electrónica, refuerza su eficacia bactericida. Además, su actividad contra la formación de biofilm representa una solución prometedora para enfrentar uno de los mayores retos de la resistencia bacteriana.

Mientras que plcat1lat mostró mayor efectividad contra bacterias Gram positivas como *S. aureus*, plcat2lat destacó por su actividad superior contra bacterias Gram negativas como *E. coli*, particularmente cepas asociadas a betalactamasas de espectro extendido. Estas especificidades subrayan la necesidad de optimizaciones estructurales dirigidas a maximizar su eficacia frente a diversos blancos bacterianos.

Aunque las CMI de los péptidos fueron ligeramente menos competitivas en comparación con los antibióticos convencionales, sus novedosos mecanismos de acción presentan una ventaja clave al mitigar el desarrollo de resistencia. Futuras investigaciones deberían explorar el potencial sinérgico de estos péptidos en combinación con antibióticos existentes, lo que podría mejorar su eficacia y prolongar la utilidad de las terapias convencionales.

La actividad antibiofilm observada, aunque prometedora, requiere mayor investigación para comprender completamente los mecanismos involucrados y optimizar su aplicación en contextos clínicos. Dado lo complejo de abordar infecciones asociadas a biofilms, las modificaciones en las secuencias aminoacídicas de los péptidos y las terapias combinadas podrían develar todo

su potencial terapéutico. Igualmente, a pesar de que la viabilidad celular con pIcat2lat se mantuvo cercana al 50 %, los parámetros de citotoxicidad en células VERO evidenciaron que ambos péptidos presentan valores de IC₅₀ e IS bajos, lo que limita su aplicación sistémica directa y resalta la necesidad de realizar ensayos adicionales en un rango más amplio de concentraciones y modelos celulares.

Esta investigación aborda también una brecha significativa en el conocimiento sobre los PDHs derivados de cocodrilianos. Las adaptaciones inmunológicas únicas de estas especies, junto con su historia evolutiva como parte de los arcosaurios, los convierten en un modelo animal cuyas capacidades inmunológicas han sido poco aprovechadas para la investigación antimicrobiana. Superar barreras como el acceso limitado al material genético y la falta de visibilidad sobre su biología es esencial para aprovechar completamente su potencial biotecnológico.

Para ampliar estos hallazgos, se propone avanzar en estrategias como el análisis estructural mediante Cryo-EM y NMR, que permitan un entendimiento más profundo de las configuraciones de los péptidos y sus interacciones con membranas bacterianas. Las simulaciones de dinámica molecular y el diseño racional basado en mutaciones específicas ofrecerán vías para optimizar la estabilidad, especificidad y actividad de los péptidos. Además, los estudios *in vivo* en modelos animales serán cruciales para evaluar su seguridad y eficacia en condiciones biológicas relevantes.

En conjunto, ambos péptidos representan un paso prometedor hacia el desarrollo de agentes antimicrobianos novedosos. Este trabajo no solo expande el conocimiento sobre los PDHs derivados de cocodrilianos, sino que también subraya el poder de la investigación interdisciplinaria para enfrentar desafíos globales como la resistencia bacteriana. Al integrar biología, herramientas computacionales y aplicaciones clínicas, esta investigación sienta un precedente para avances significativos contra las infecciones bacterianas resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

Abbassi F, Raja Z, Oury B, Gazanion E, Piesse C, Sereno D, *et al.* 2013. Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. *Biochimie*. 95:388-399.

Agbaria M, Jbara-Agbaria D, Grad E, Ben-David-Naim M, Aizik G, Golomb G. 2023. Nanoparticles of VAV1 siRNA combined with LL37 peptide for the treatment of pancreatic cancer. *J Control Release*. 355:312-326.

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, *et al.* 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 96:3086-3093.

Agerberth B, Lee JY, Bergman T, Carlquist M, Boman HG, Mutt V, *et al.* 1991. Amino acid sequence of PR-39: isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem*. 202:849-854.

Alfaro ME, Santini F, Brock C, Alamillo H, Dornburg A, Rabosky DL, *et al.* 2009. Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:13410-13414.

Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, *et al.* 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature*. 477:587-591.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-410.

Amso Z, Hayouka Z. 2019. Antimicrobial random peptide cocktails: A new approach to fight pathogenic bacteria. *Chem Commun*. 55:2007-2014.

Anderson RC, Hancock RE, Yu PL. 2004. Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine-derived cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:673-676.

Angilletta MJ Jr. 2001. Thermal and physiological constraints on energy assimilation in a widespread lizard (*Sceloporus undulatus*). *Ecology.* 82:3044-3056.

Anunthawan T, Yaraksa N, Phosri S, Theansungnoen T, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirirak S. 2013. Improving the antibacterial activity and selectivity of an ultra short peptide by hydrophobic and hydrophilic amino acid stretches. *Bioorg Med Chem Lett.* 23:4657-4662.

Anwised P, Kabbua T, Temsiripong T, Dhiravisit A, Jitrapakdee S, Araki T, *et al.* 2013. Molecular cloning and expression of α -globin and β -globin genes from crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Protein J.* 32:172-182.

Ariel E, Ladds PW, Roberts BL. 1997. Mycobacteriosis in young freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*). *Aust Vet J.* 75:831-833.

Aronica PG, Reid LM, Desai N, Li J, Fox SJ, Yadahalli S, *et al.* 2021. Computational methods and tools in antimicrobial peptide research. *J Chem Inf Model.* 61:3172-3196.

Attias M, Al-Aubodah T, Piccirillo CA. 2019. Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. *Clin. Exp. Immunol.* 197:36-51.

Bai Y, Wang W, Shi M, Wei X, Zhou X, Li B, Zhang J. 2022. Novel antibiofilm inhibitor ginkgetin as an antibacterial synergist against *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci.* 23:8809.

Baker S, Kessler E, Darville-Bowleg L, Merchant M. 2019. Different mechanisms of serum complement activation in the plasma of common (*Chelydra serpentina*) and alligator (*Macrochelys temminckii*) snapping turtles. *PLoS One.* 14:e0217626.

- Ballow M, Cochrane CG. 1969. Two anticomplementary factors in cobra venom: hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. *J Immunol.* 103:944-952.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 6:71-79.
- Bals R, Lang C, Weiner DJ, Vogelmeier C, Welsch U, Wilson JM. 2001. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:370-375.
- Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:9541-9546.
- Bals R, Wilson J. 2003. Cathelicidins—a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci.* 60:711-720.
- Barnum SR. 2017. C3. En: Barnum SR, Shein TN, *The Complement factsbook.* p 157-169. Ed. Academic Press. London.
- Bassetti LA, Marques TS, Malvásio A, Piña CI, Verdade LM. 2014. Thermoregulation in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Zool Stud.* 53:1-10.
- Baxter AA, Lay FT, Poon IK, Kvangsakul M, Hulett MD. 2017. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cell Mol Life Sci.* 74:3809-3825.
- Bechinger B, Gorr SU. 2017. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J Dent Res.* 96:254-260.
- Bellotti D, Remelli M. 2021. Deferoxamine B: a natural, excellent and versatile metal chelator. *Molecules.* 26:3255.

Birdsey V, Lindorfer J, Gewurz H. 1971. Interaction of toxic venoms with the complement system. *Immunology*. 21:299.

Bisignano C, Ginestra G, Smeriglio A, La Camera E, Crisafi G, Franchina FA, *et al.* 2019. Study of the lipid profile of ATCC and clinical strains of *Staphylococcus aureus* in relation to their antibiotic resistance. *Molecules*. 24:1276.

Blandin S, Levashina EA. 2004. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol*. 40:903-908.

Böcker S, Baumbach J. 2013. Cluster editing. In: Conference on Computability in Europe. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 33-44.

Boehmer JL, DeGrasse JA, Lancaster VA, McFarland MA, Callahan JH, Ward JL. 2011. Evaluation of protein expression in bovine bronchoalveolar fluid following challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Proteomics*. 11:3685-3697.

Boissinot S, Bourgeois Y, Manthey JD, Ruggiero RP. 2019. The mobilome of reptiles: Evolution, structure, and function. *Cytogenet Genome Res*. 157:21-33.

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

Boman HG, Agerberth B, Boman A. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun*. 61: 2978-2984.

Bona P, Desojo JB. 2011. Osteology and cranial musculature of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Journal of Morphology*. 272:780-795.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*. 10: e1003537.

Brandley MC, Wang Y, Guo X, Nieto Montes de Oca A, Feria Ortiz M, Hikida T, Ota H. 2010. Bermuda as an evolutionary life raft for an ancient lineage of endangered lizards. *PLoS One*. 5: e11375.

Brochu CA. 2003. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Annu Rev Earth Planet Sci*. 31: 357-397.

Brogden KA, Kalfa VC, Ackermann MR, Palmquist DE, McCray Jr PB, Tack BF. 2001. The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 331-334.

Bronzati M, Montefeltro FC, Langer MC. 2015. Diversification events and the effects of mass extinctions on *Crocodyliformes* evolutionary history. *R Soc Open Sci*. 2: 140385.

Budd A, Blandin S, Levashina EA, Gibson TJ. 2004. Bacterial α 2-macroglobulins: colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome? *Genome Biol*. 5: R1-R13.

Bui Thi Phuong H, Doan Ngan H, Le Huy B, Vu Dinh H, Luong Xuan H. 2024. The amphipathic design in helical antimicrobial peptides. *ChemMedChem*. 19: e202300480.

Cai L, Zhang J, Zhu R, Shi W, Xia X, Edwards M, Lu W. 2017. Protective cellular immunity generated by cross-presenting recombinant overlapping peptide proteins. *Oncotarget*. 8: 76516-76526.

Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, de Oliveira Mendes TA, de Oliveira Barros Ribon A. 2022. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Vet Res*. 18: 115.

Campos Z. 1993. Effect of habitat on survival of eggs and sex ratio of hatchlings of *Caiman crocodilus yacare* in the Pantanal, Brazil. *J Herpetol*. 27: 127-132.

Cao Q, Ge C, Wang X, Harvey PJ, Zhang Z, Ma Y, Yu R. 2023. Designing antimicrobial peptides using deep learning and molecular dynamic simulations. *Brief Bioinform.* 24: bbad058.

Carrera-Aubesart A, Defaus S, Pérez-Peinado C, Sandín D, Torrent M, Jiménez MÁ, Andreu D. 2022. Examining topoisomers of a snake-venom-derived peptide for improved antimicrobial and antitumoral properties. *Biomedicines.* 10: 2110.

Carrera-Aubesart A, Li J, Contreras E, Bello-Madruga R, Torrent M, Andreu D. 2024. From In Vitro Promise to In Vivo Reality: An Instructive Account of Infection Model Evaluation of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci.* 25: 9773.

Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG. 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol Evol.* 28: 219-229.

Cesaro A, Hoffman SC, Das P, de la Fuente-Nunez C. 2025. Challenges and applications of artificial intelligence in infectious diseases and antimicrobial resistance. *npj Antimicrob Resist.* 3: 2.

Chakraborty S, Chatterjee R, Chakravorty D. 2022. Evolving and assembling to pierce through: Evolutionary and structural aspects of antimicrobial peptides. *Comput Struct Biotechnol J.* 20: 2247-2258.

Chapal M, Mintzer S, Brodsky S, Carmi M, Barkai N. 2019. Resolving noise-control conflict by gene duplication. *PLoS Biol.* 17: e3000289.

Chen C, Wang A, Zhang F, Zhang M, Yang H, Li J, Wang Y. 2019. The protective effect of fish-derived cathelicidins on bacterial infections in zebrafish, *Danio rerio*. *Fish Shellfish Immunol.* 92: 519-527.

Chen Y, Cai S, Qiao X, Wu M, Guo Z, Wang R, Wang Y. 2017. As-CATH1-6, novel cathelicidins with potent antimicrobial and immunomodulatory properties from *Alligator sinensis*, play pivotal roles in host antimicrobial immune responses. *Biochem J.* 474: 2861-2885.

Chen ZA, Pellarin R, Fischer L, Sali A, Nilges M, Barlow PN, Rappsilber J. 2016. Structure of complement C3 (H2O) revealed by quantitative cross-linking/mass spectrometry and modeling. *Mol Cell Proteomics*. 15: 2730-2743.

Chong AY, Kojima KK, Jurka J, Ray DA, Smit AF, Isberg SR, Gongora J. 2014. Evolution and gene capture in ancient endogenous retroviruses-insights from the crocodylian genomes. *Retrovirology*. 11: 1-15.

Chow LN, Choi KYG, Piyadasa H, Bossert M, Uzonna J, Klonisch T, Mookherjee N. 2014. Human cathelicidin LL-37-derived peptide IG-19 confers protection in a murine model of collagen-induced arthritis. *Mol Immunol*. 57: 86-92.

Ciandrini E, Morroni G, Arzeni D, Kamysz W, Neubauer D, Kamysz E, Campana R. 2018. Antimicrobial activity of different antimicrobial peptides (PAMs) against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Top Med Chem*. 18: 2116-2126.

Clark S, Jowitt TA, Harris LK, Knight CG, Dobson CB. 2021. The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences. *Commun Biol*. 4: 605.

CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

CLSI. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Cohen MM, Gans C. 1970. The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenet Genome Res*. 9: 81-105.

Comune M, Rai A, Palma P, TondaTuro C, Ferreira L. 2021. Antimicrobial and pro-angiogenic properties of soluble and nanoparticle-immobilized LL37 peptides. *Biomater Sci*. 9: 8153-8159.

Cordero T, Amavet PS, Marelli BE, Siroski PA. 2023. Evidence of venom factor-like in crocodylians. *Org Divers Evol.* 23: 941-952.

Cordero T, Moleón MS, Marelli BE, Siroski PA. 2024. Host Defense Peptides In Crocodylians- A Comprehensive Review. *Peptides.* 171312.

Corvillo F, López-Trascasa M. 2017. Lipodistrofia parcial adquirida y glomerulopatía C3: la desregulación del sistema del complemento como mecanismo común. *Nefrologia.* 38: 258-266.

Coulson RA, Herbert JD. 1981. Relationship between metabolic rate and various physiological and biochemical parameters. A comparison of alligator, man and shrew. *Comp Biochem Physiol A.* 68: 75-88.

Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. 2013. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des.* 81: 136-147.

Cristelo C, Nunes R, Pinto S, Marques JM, Gama FM, Sarmento B. 2023. Targeting β cells with cathelicidin nanomedicines improves insulin function and pancreas regeneration in type 1 diabetic rats. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 6: 1544-1560.

Cushnie TTT, O'Driscoll NH, Lamb AJ. 2016. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 73: 4471-4492.

Dallago C, Schütze K, Heinzinger M, Olenyi T, Littmann M, Lu AX, Rost B. 2021. Learned embeddings from deep learning to visualize and predict protein sets. *Curr Protoc.* 1: e113.

Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG, Chovnick A. 1990. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics.* 124: 339-355.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 9: 772.

Dawkins R, Krebs JR. 1979. Arms races between and within species. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 205: 489-511.

De Celis A, Narváez I, Ortega F. 2020. Spatiotemporal palaeodiversity patterns of modern crocodiles (Crocodyliformes: Eusuchia). Zool J Linn Soc. 189: 635-656.

De la Fuente-Núñez C, Silva ON, Lu TK, Franco OL. 2017. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. Pharmacol Ther. 178: 132-140.

De la Rosa-Zamboni D, Ochoa SA, Laris-González A, Cruz-Córdova A, Escalona-Venegas G, Pérez-Avenidaño G, Xicohtencatl-Cortes J. 2018. Everybody hands-on to avoid ESKAPE: effect of sustained hand hygiene compliance on healthcare-associated infections and multidrug resistance in a paediatric hospital. J Med Microbiol. 67: 1761-1771.

De Mera IGF, de la Lastra JMP, Ayoubi P, Naranjo V, Kocan KM, Gortazar C, de la Fuente J. 2008. Differential expression of inflammatory and immune response genes in mesenteric lymph nodes of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Dev Comp Immunol. 32: 85-91.

De Oliveira DM, Forde BM, Kidd TJ, Harris PN, Schembri MA, Beatson SA, Walker MJ. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clin Microbiol Rev. 33: e00081-19.

De Vienne DM, Aguilera G, Ollier S. 2011. Euclidean nature of phylogenetic distance matrices. Syst Biol. 60: 826-832.

Delany MF, Abercrombie CL. 1986. American alligator food habits in northcentral Florida. J Wildl Manage. 50: 348-353.

Deslouches B, Steckbeck JD, Craig JK, Doi Y, Mietzner TA, Montelaro RC. 2013. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting

exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 2511-2521.

Dougherty DA. 2000. Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr Opin Chem Biol.* 4: 645-652.

Drukewitz SH, Bokelmann L, Undheim EA, von Reumont BM. 2019. Toxins from scratch? Diverse, multimodal gene origins in the predatory robber fly *Dasygogon diadema* indicate a dynamic venom evolution in dipteran insects. *Gigascience.* 8: giz081.

Drumheller SK, Wilberg EW. 2020. A synthetic approach for assessing the interplay of form and function in the crocodyliform snout. *Zool J Linn Soc.* 188: 507-521.

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4: e88.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 29: 1969-1973.

Duarte AM, van Mierlo CP, Hemminga MA. 2008. Molecular dynamics study of the solvation of an α -helical transmembrane peptide by DMSO. *J Phys Chem B.* 112: 8664-8671.

Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1758: 1408-1425.

Eaton MJ. 2010. Dwarf crocodile *Osteolaemus tetraspis*. In: *Crocodyles. Status Survey and Conservation Action Plan.* p 127-132.

Eberle JJ, Gottfried MD, Hutchison JH, Brochu CA. 2014. First record of Eocene bony fishes and crocodyliforms from Canada's Western Arctic. *PLoS One.* 9: e96079.

Eggertsen G, Fohlman J, Sjöquist J. 1980. In vitro studies on complement inactivation by snake venoms. *Toxicon*. 18: 87-96.

Eggertsen G, Lind P, Sjöquist J. 1981. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja n. siamensis*). *Mol Immunol*. 18: 125-133.

Eisenberg D, Wilcox W, Eshita SM, Pryciak PM, Ho SP, Degrado WF. 1986. The design, synthesis, and crystallization of an alpha-helical peptide. *Proteins*. 1: 16-22.

El Naqa I, Murphy MJ. 2015. What is machine learning? In: *Machine Learning in Radiation Oncology: Theory and Applications*. p 3-11. Springer, Cham.

Ernst C, Ernst E. 2003. *Snakes of the United States and Canada*. Ed. Smithsonian Books. USA. p. 7.

Estes R, Hutchison JH. 1980. Eocene lower vertebrates from Ellesmere Island, Canadian arctic archipelago. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*. 30: 325-347.

Fazel F, Jamshidi A, Khoramian B. 2019. Phenotypic and genotypic study on antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolates from bovine mastitis. *Microb Pathog*. 132: 355-361.

Feder ME, Bennett AF, Huey RB. 2000. Evolutionary physiology. *Annu Rev Ecol Syst*. 31: 315-341.

Ferguson MW, Joanen T. 1983. Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *J Zool*. 200: 143-177.

Feschotte C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet*. 9: 397-405.

Fields K, Falla TJ, Rodan K, Bush L. 2009. Bioactive peptides: signaling the future. *J Cosmet Dermatol*. 8: 8-13.

Finger Jr JW, Goetz SM, Kelley MD, Horne LM, Piccolomini S, Eelsey RM, Mendonça MT. 2020. American Alligator (*Alligator mississippiensis*) serum inhibits pitviper venom metalloproteinases. *J Herpetol.* 54: 151-154.

Finn RD, Clements J, Eddy SR. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39: W29-W37.

Flexner S, Noguchi H. 1902. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. *J Exp Med.* 6: 277-301.

Friedberger E, Mita S, Kumagai T. 1913. Die Bildung eines akut wirkenden Giftes (Anaphylatoxin) aus Toxinen (Tetanus, Diphtherie, Schlangengift). *Z Immunitätsforsch.* 17: 506-538.

Fritzinger DC, Hew BE, Thorne M, Pangburn MK, Janssen BJ, Gros P, Vogel CW. 2009. Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Dev Comp Immunol.* 33: 105-116.

Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. 1999. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun.* 67: 2561-2566.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 272: 15258-15263.

Frohm M, Gunne H, Bergman AC, Agerberth B, Bergman T, Boman A, Boman HG. 1996. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem.* 237: 86-92.

Fry BG. 2005. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15: 403-420.

Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, De La Vega RCR. 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10: 483-511.

Gabrey S. 2010. Demographic and geographic variation in food habits of American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Louisiana. *Herpetol Conserv Biol.* 5: 241-250.

Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M, Kozak CA, Zanetti M, Merluzzi L, Gennaro R. 1997. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem.* 272: 13088-13093.

García-Salinas S, Elizondo-Castillo H, Arruebo M, Mendoza G, Irusta S. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules.* 23: 1399.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook.* p 571-607.

Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. 2008. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics.* 24: 2101-2102.

Gawde U, Chakraborty S, Waghu FH, Barai RS, Khanderkar A, Indraguru R, Idicula-Thomas S. 2023. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 51: D377-D383.

Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. 1989. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun.* 57: 3142-3146.

Gennaro R, Zanetti M. 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Pept Sci.* 55: 31-49.

Gesell J, Zasloff M, Opella SJ. 1997. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J Biomol NMR*. 9: 127-135.

Gignac PM, O'Brien HD, Turner AH, Erickson GM. 2019. Feeding in crocodylians and their relatives: functional insights from ontogeny and evolution. In: *Feeding in Vertebrates: Evolution, Morphology, Behavior, Biomechanics*. p 575-610.

Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. 2018. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*. 27: 14-25.

Green RE, Braun EL, Armstrong J, Earl D, Nguyen N, Hickey G, Ray DA. 2014. Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science*. 346: 1254449.

Grigg G, Kirshner D. 2015. *Biology and Evolution of Crocodylians*. Ed. Cornell University Press. New York. p. 672

Groves ML, Peterson RF, Kiddy CA. 1965. Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature*. 207: 1007-1008.

Gubatan J, Mehigan GA, Villegas F, Mitsuhashi S, Longhi MS, Malvar G, Moss AC. 2020. Cathelicidin mediates a protective role of vitamin D in ulcerative colitis and human colonic epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 26: 885-897.

Guerra MES, Vieira B, Calazans AP, Destro GV, Melo K., Rodrigues E, Converso TR. 2024. Recent advances in the therapeutic potential of cathelicidins. *Front Microbiol*. 15: 1405760.

Haapasalo K, Meri S. 2019. Regulation of the complement system by pentraxins. *Front Immunol*. 10: 1-11.

Hancock RE. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action - with special reference to streptomycin and gentamicin: II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother.* 8: 429-445.

Hancock RE, Alford MA., Haney EF. 2021. Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. *Nat Rev Microbiol.* 19: 786-797.

Hancock RE, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 24: 1551-1557.

Haney EF, Trimble MJ, Hancock RE. 2021. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nat Protoc.* 16: 2615-2632.

Hargreaves AD, Swain MT, Hegarty MJ, Logan DW, Mulley JF. 2014. Restriction and recruitment - gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins. *Genome Biol Evol.* 6: 2088-2095.

Haryanto B, Suksmasari T, Wintergerst E, Maggini S. 2015. Multivitamin supplementation supports immune function and ameliorates conditions triggered by reduced air quality. *Vitam Miner.* 4: 2376-1318.

He H, Liu S, Wu D, Xu B. 2020. Enzymatically formed peptide assemblies sequester proteins and relocate inhibitors to selectively kill cancer cells. *Angew Chem.* 132: 16587-16592.

Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A. 2003. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett.* 229: 1-7.

Hekkala E, Gatesy J, Narechania A, Meredith R, Russello M, Aardema ML, Amato G. 2021. Paleogenomics illuminates the evolutionary history of the extinct Holocene "horned" crocodile of Madagascar, *Voay robustus*. *Commun Biol.* 4: 505.

Hekkala E, Shirley MH, Amato G, Austin JD, Charter S, Thorbjarnarson J, Blum MJ. 2011. An ancient icon reveals new mysteries: mummy DNA resurrects a cryptic species within the Nile crocodile. *Mol Ecol.* 20: 4199-4215.

Henriques ST, Tan CC, Craik DJ, Clark RJ. 2010. Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Chembiochem.* 11: 2148-2157.

Hew BE, Thorne M, Fritzinger DC, Vogel CW. 2004. Humanized cobra venom factor (FVC): generation of human C3 derivatives with FVC-like function. *Mol Immunol.* 41: 244-245.

Hewelt-Belka W, Nakonieczna J, Belka M, Baczek T, Namieśnik J, Kot-Wasik A. 2016. Untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant and sensitive to antibiotics. *J Proteome Res.* 15: 914-922.

Hilevski S, Cordero T, Siroski PA. 2022. Do crocodylians eat plant material? A review of plant nutrients consumed by captive crocodylians. *S Am J Herpetol.* 24: 19-25.

Hillion S, Arleevskaya M, Blanco P, Bordron A, Brooks W, Cesbron J, Kaveri S, Vivier E, Renaudineau Y. 2019. The innate part of the adaptive immune system. *Clin Rev Allergy Immunol.* 57: 1-4.

Hirsch JG. 1956. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 103: 589-594.

Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, Noubhani A, Dieryck W, Joucla G, Costaglioli P. 2010. Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides.* 31: 58-66.

Hoffman W., Lakkis FG, Chalasani, G. 2016. B cells, antibodies, and more. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 137-154.

Hsu C, Verkuil R, Liu J, Lin Z, Hie B, Sercu T, Rives A. 2022. Learning inverse folding from millions of predicted structures. In: International Conference on Machine Learning. p 8946-8970. PMLR.

Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol.* 11: 582779.

Huchzermeyer FW. 2003. Crocodiles: Biology, Husbandry and Diseases. Ed. CABI. South Africa. p. 22.

Hurst TP, Pittman G, O'Neill SL, Ryan PA, Le Nguyen H, Kay BH. 2012. Impacts of *Wolbachia* infection on predator prey relationships: evaluating survival and horizontal transfer between w MelPop infected *Aedes aegypti* and its predators. *J Med Entomol.* 49: 624-630.

Hussein MF, Badir N, El Ridi R, Akef M. 1978. Effect of seasonal variation on lymphoid tissues of the lizards, *Mabuya quinquetaeniata Licht.* and *Uromastix aegyptia Forsk.* *Dev Comp Immunol.* 2: 469-478.

Hussein MF, Badir N, El Ridi R, El Deeb S. 1979. Effect of seasonal variation on immune system of the lizard, *Scincus scincus.* *J Exp Zool.* 209: 91-96.

Hutchison JH. 1982. Turtle, crocodylian, and champsosaur diversity changes in the Cenozoic of the north-central region of western United States. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 37: 149-164.

Huttner KM, Lambeth MR, Burkin HR, Burkin DJ, Broad TE. 1998. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene.* 206: 85-91.

Hymel D, Wojcik F, Halskov KS, Hogendorf WF, Wong SC, Williams BM, Harris MR. 2024. Photochemically-enabled, post-translational production of C-terminal amides. *Nat Commun.* 15: 7162.

IBM Corp. 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. IBM Corp, Armonk, NY.

Ichiyanagi K, Okada N. 2008. Mobility pathways for vertebrate L1, L2, CR1, and RTE clade retrotransposons. *Mol Biol Evol.* 25: 1148-1157.

Ikenaga M, Guevara R, Dean AL, Pisani C, Boyer JN. 2010. Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. *Microb Ecol.* 59: 284-295.

Islam MM, Asif F, Zaman SU, Arnab MKH, Rahman MM, Hasan M. 2023. Effect of charge on the antimicrobial activity of alpha-helical amphibian antimicrobial peptide. *Curr Res Microb Sci.* 4: 100182.

Islam MS, Wang H, Admassu H, Sulieman AA, Wei FA. 2022. Health benefits of bioactive peptides produced from muscle proteins: Antioxidant, anti-cancer, and anti-diabetic activities. *Process Biochem.* 116: 116-125.

lungman J, Piña CI, Siroski PA. 2008. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Genesis.* 46: 401-417.

Jang H, Ma B, Nussinov R. 2007. Conformational study of the protegrin-1 (PG-1) dimer interaction with lipid bilayers and its effect. *BMC Struct Biol.* 7: 1-15.

Jangpromma N, Konkchaiyaphum M, Punpad A, Sosiangdi S, Daduang S, Klaynongsruang S, Tankrathok A. 2023. Rational design of RN15m4 cathelin domain-based peptides from Siamese Crocodile cathelicidin improves antimicrobial activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 195: 1096-1108.

Janke A, Arnason U. 1997. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles). *Mol Biol Evol.* 14: 1266-1272.

Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature.* 444: 213-216.

Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, Gros P 2005. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*. 437: 505-511.

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

Jetz W, Thomas GH, Joy JB, Hartmann K, Mooers AO. 2012. The global diversity of birds in space and time. *Nature*. 491: 444-448.

Joanen T, McNease L, Ferguson MWJ. 1987. The effects of egg incubation temperature on post-hatching growth of American alligators. In: *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators*. p 533-537.

Jouiaei M, Sunagar K, Federman Gross A, Scheib H, Alewood PF, Moran Y, Fry BG. 2015. Evolution of an ancient venom: recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone. *Mol Biol Evol*. 32: 1598-1610.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596: 583-589.

Jung Y, Kong B, Moon S, Yu SH, Chung J, Ban C, Kweon DH. 2019. Envelope deforming antiviral peptide derived from influenza virus M2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 517: 507-512.

Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol*. 6: 162-168.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 20: 1160-1166.

Kerkis I, Silva FDS, Pereira A, Kerkis A, Rádis-Baptista G. 2010. Biological versatility of crotamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. *Expert Opin Investig Drugs*. 19: 1515-1525.

Kim H, Jang JH, Kim SC, Cho JH. 2020. Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Chem*. 185: 111814.

Kiss G., Michl H. 1962. Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon*. 1: 33-34.

Klesius, PH. 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 24: 187-195.

Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA., Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Lehrer RI. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett*. 327: 231-236.

Kościuczuk E.M, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, Bagnicka, E. 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep*. 39: 10957-10970.

Kosushkin SA, Borodulina OR, Soloveva EN, Grechko VV. 2008. A family of short retroposons (*Squam1*) from squamate reptiles (*Reptilia: Squamata*): Structure, evolution and correlation with phylogeny. *Mol Biol*. 42: 977-989.

Kozarcanin H, Lood C, Munthe-Fog L, Sandholm K, Hamad OA, Bengtsson AA, Nilsson B. 2016. The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation. *J Thromb Haemost*. 14: 531-545.

Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Klüver E, Maronde E, Conejo-García JR, Adermann K. 2003. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Sci*. 12: 143-152.

- Krishnan V, Ponnuraj K, Xu Y, Macon K, Volanakis JE, Narayana SV. 2009. The crystal structure of cobra venom factor, a cofactor for C3-and C5-convertase CVFBb. *Structure*. 17: 611-619.
- Kubasova T, Horváth M, Kocsis K, Fenyő M. 1995. Effect of visible light on some cellular and immune parameters. *Immunol Cell Biol*. 73: 239-244.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 35: 1547-1549.
- Kundu R. 2020. Cationic amphiphilic peptides: Synthetic antimicrobial agents inspired by nature. *ChemMedChem*. 15: 1887-1896.
- Ladds PW, Bradley J, Hirst RG. 1996. Providencia rettgeri meningitis in hatchling saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Aust Vet J*. 74: 397-398.
- Lai Z, Yuan X, Chen H, Zhu Y, Dong N, Shan A. 2022. Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability. *Biotechnol Adv*. 59: 107962.
- Lance VA. 2003. Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Exp Gerontol*. 38: 801-805.
- Lang JW. 1985. Incubation-Temperature Affects Thermal Selection of Hatchling Crocodiles. *American Zoologist*. 25: A18.
- Lang JW. 1987. Crocodilian thermal selection. *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators*. 301: 317.
- Lang JW, Andrews HV. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *J Exp Zool*. 270: 28-44.
- Lapadula WJ, Marcet PL, Mascotti ML, Sanchez-Puerta MV, Juri Ayub M. 2017. Metazoan ribosome inactivating protein encoding genes acquired by horizontal gene transfer. *Sci Rep*. 7: 1863.

Lapadula WJ, Mascotti ML., Juri Ayub M. 2020. Whitefly genomes contain ribotoxin coding genes acquired from plants. *Sci Rep.* 10: 15503.

Larriera A., Imhof A. 2006. Proyecto yacaré. In: *Manejo de Fauna Silvestre en Argentina*. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, Buenos Aires. p 51-64.

Latendorf T, Gerstel U, Wu Z, Bartels J, Becker A, Tholey A, Schröder JM. 2019. Cationic intrinsically disordered antimicrobial peptides (CIDAMPs) represent a new paradigm of innate defense with a potential for novel anti-infectives. *Sci Rep.* 9: 3331.

Le Morvan C, Clerton P, Deschaux P, Troutaud D. 1997. Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 209-212.

Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J Exp Biol.* 201: 165-168.

Lee HR, You DG, Kim HK, Sohn JW, Kim MJ, Park JK, Yoo YD. 2020. Romo1-derived antimicrobial peptide is a new antimicrobial agent against multidrug-resistant bacteria in a murine model of sepsis. *mBio.* 11: e03258-19.

Lehrer RI, Ganz T. 2002. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol.* 9: 18-22.

Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, He Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 11: 3919-3931.

Leite ML, Duque HM, Rodrigues GR, da Cunha NB, Franco OL. 2023. The LL-37 domain: A clue to cathelicidin immunomodulatory response? *Peptides.* 165: 171011.

Lohner K, Prossnigg F. 2009. Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. *Biochim Biophys Acta*. 1788: 1656-1666.

Lomize AL, Todd SC, Pogozheva ID. 2022. Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Sci*. 31: 209-220.

Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. 2012. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res*. 40: D370-D376.

Lutkenhaus J. 1990. Regulation of cell division in *E. coli*. *Trends Genet*. 6: 22-25.

Lynn DJ, Higgs R, Gaines S, Tierney J, James T, Lloyd AT, O'Farrelly C. 2004. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. *Immunogenetics*. 56: 170-177.

Lyons EH. 2008. CoGe, a new kind of comparative genomics platform: Insights into the evolution of plant genomes. University of California, Berkeley.

Lyons E, Freeling M. 2008. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. *Plant J*. 53: 661-673.

Ma R, Wong SW, Ge L, Shaw C, Siu SW, Kwok HF. 2020. In vitro and MD simulation study to explore physicochemical parameters for antibacterial peptide to become potent anticancer peptide. *Mol Ther Oncolytics*. 16: 7-19.

Mackessy SP, Saviola AJ. 2016. Understanding biological roles of venoms among the Caenophidia: The importance of rear-fanged snakes. *Toxicon*

Maggini S, Pierre A, Calder PC. 2018. Immune function and micronutrient requirements change over the life course. *Nutrients*. 10(10): 1531.

Mahlapuu M, Björn C, Ekblom J. 2020. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol*. 40(7): 978-992.

Mahmoud MM, Alenezi M, Al-Hejin AM, Abujamel TS, Aljoud F, Noorwali A, Yacoub HA. 2022. Anticancer activity of chicken cathelicidin peptides against different types of cancer. *Mol Biol Rep.* 49(6): 4321-4339.

Maijaroen S, Jangpromma N, Daduang J, Klaynongsruang S. 2018. KT2 and RT2 modified antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* Leucrocine I show activity against human colon cancer HCT-116 cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 62: 164-176.

Maiti S, Maji T, Saibo NV, De S. 2024. Experimental methods to study the structure and dynamics of intrinsically disordered regions in proteins. *Curr Res Struct Biol.* 7:100138.

Malhotra A. 2017. Mutation, duplication, and more in the evolution of venomous animals and their toxins. En: *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins.* p 33-45. Ed. Springer Science. Dordrecht.

Mandalari G, Minuti A, La Camera E, Barreca D, Romeo O, Nostro A. 2023. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains and effect of Phloretin on biofilm formation. *Curr Microbiol.* 80: 303.

Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. 2005. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J Biol Chem.* 280: 984-990.

Mannion PD, Benson R B, Carrano M T, Tennant J P, Judd J, Butler R J. 2015. Climate constrains the evolutionary history and biodiversity of crocodylians. *Nat Commun.* 6: 8438.

Markwick PJ. 1998. Crocodylian diversity in space and time: the role of climate in paleoecology and its implication for understanding K/T extinctions. *Paleobiology.* 24: 470-497.

Martell EM, Gonzalez-Garcia M, Ständker L, Otero-Gonzalez AJ. 2021. Host defense peptides as immunomodulators: The other side of the coin. *Peptides.* 146: 170644.

Martinson EO, Kelkar YD, Chang CH, Werren JH. 2017. The evolution of venom by co-option of single-copy genes. *Curr Biol.* 27: 2007-2013.

Mastellos D, Morikis D, Strey C, Holland MC, Lambris JD. 2004. From atoms to systems: a cross-disciplinary approach to complement-mediated functions. *Mol Immunol.* 41: 153-164.

Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. 1995. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry.* 34: 6521-6526.

Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry.* 35: 11361-11368.

Mattar EH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM. 2016. Virucidal activity of human α - and β -defensins against hepatitis C virus genotype 4. *Mol Biosyst.* 12: 2785-2797.

Medem F. 1983. *Los Crocodylia de Sur América*. Vol. II. Ed. Colciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 25.

Melstrom KM, Irmis RB. 2019. Repeated evolution of herbivorous crocodyliforms during the age of dinosaurs. *Curr Biol.* 29: 2389-2395.

Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, Ferrin TE. 2023. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Sci.* 32: e4792.

Merchant ME, Roche C, Elsey RM, Prudhomme J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 136: 505-513.

Merchant ME, Trahan C, Moran C, White ME. 2016. Two different complement C3 genes in crocodylians. *Copeia.* 104: 756-762.

Merchant M, Williams S, Trosclair PL, Elsey RM, Mills K. 2007. Febrile response to infection in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 148: 921-925.

Meredith RW, Hekkala ER, Amato G, Gatesy J. 2011. A phylogenetic hypothesis for Crocodylus (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Mol Phylogenet Evol.* 60: 183-191.

Miller NW, Clem LW. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J Immunol.* 133: 2356-2359.

Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 19: 679-682.

Moi D, Bernard C, Steinegger M, Nevers Y, Langleib M, Dessimoz C. 2023. Structural phylogenetics unravels the evolutionary diversification of communication systems in gram-positive bacteria and their viruses. *Biorxiv.* 2023-09.

Moleón S. 2019. Inversión inmunológica del yacaré overo (*Caiman latirostris*) ante situaciones de estrés. Tesis Doctoral. FCV-UNL.

Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. 2020. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 19: 311-332.

Mukhopadhyaya CS, Kumar R, Brahc GS. 2010. Gallinacin and fowlicidin: two promising antimicrobial peptides in chickens: a review. *Vet World.* 3: 297-300.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. 2019. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front Microbiol.* 10: 539.

Muller-Eberhard HJ. 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol.* 4: 503-528.

Müller-Eberhard HJ, Nilsson UR, Dalmaso AP, Polley MJ, Calcott M A. 1966. A molecular concept of immune cytotoxicity. *Arch Pathol.* 82: 205-217.

Müller-Eberhard HJ, Fjellström KE. 1971. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. *J Immunol.* 107: 1666-1672.

Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 371: 20150290.

Nagaoka I, Tamura H, Reich J. 2020. Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model. *Int J Mol Sci.* 21: 59-73.

Nagaoka I, Tsutsumi-Ishii Y, Yomogida S, Yamashita T. 1997. Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. *J Biol Chem.* 272: 22742-22750.

Neely HR, Flajnik MF. 2016. Emergence and evolution of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 32: 693-711.

Nery Garcia BL, Dantas STA, da Silva Barbosa K, Mendes Mitsunaga T, Butters A, Camargo CH, Nobrega DB. 2024. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and Other Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Pathogens Isolated from Bovine Mastitis: A One Health Perspective. *Antibiotics.* 13: 391.

Neville F, Cahuzac M, Konovalov O, Ishitsuka Y, Lee KYC, Kuzmenko I, Gidalevitz D. 2006. Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys J.* 90: 1275-1287.

Nicolaï MP, Matzke NJ. 2019. Trait-based range expansion aided in the global radiation of Crocodylidae. *Glob Ecol Biogeogr.* 28: 1244-1258.

Niimura Y, Nei M. 2007. Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. *PLoS One.* 2: e708.

Nikoskelainen J. 1995. Endotoxin, interleukin-6 and phospholipase-A2 as markers of sepsis in patients with hematological malignancies. *Scand J Infect Dis.* 27: 39-43.

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

Noaman KA, Alharbi NS, Khaled JM, Kadaikunnan S, Alobaidi AS, Almazyed AO, Al Rashedi S. 2023. The transmutation of *Escherichia coli* ATCC 25922 to small colony variants (SCVs) *E. coli* strain as a result of exposure to gentamicin. *J Infect Public Health.* 16: 1821-1829.

Nordahl EA, Rydengård V, Nyberg P, Nitsche DP, Mörgelin M, Malmsten M, Schmidtchen A. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 16879-16884.

Novick PA, Basta H, Floumanhaft M, McClure MA, Boissinot S. 2009. The evolutionary dynamics of autonomous non-LTR retrotransposons in the lizard *Anolis carolinensis* shows more similarity to fish than mammals. *Mol Biol Evol.* 26: 1811-1822.

Oaks JR. 2011. A time-calibrated species tree of Crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles. *Evolution.* 65: 3285-3297.

Oliveira VC, Altmanová M, Viana PF, Ezaz T, Bertollo LA, Ráb P, de Bello Cioffi M. 2021. Revisiting the karyotypes of alligators and caimans (*Crocodylia*, *Alligatoridae*) after a half-century delay: Bridging the gap in the chromosomal evolution of reptiles. *Cells.* 10: 1397.

Olmo E. 2008. Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integr Comp Biol.* 48: 486-493.

Ouardien S, Drijfhout JW, Vaz FM, Wenzel M, Hamoen LW, Zaat SA, Brul S. 2018. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1860: 2404-2415.

Oren Z, Shai Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Pept Sci.* 47: 451-463.

Ósi A. 2014. The evolution of jaw mechanism and dental function in heterodont crocodyliforms. *Hist Biol.* 26: 279-414.

Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR, Haydel SE. 2010. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 9: 1-13.

Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm B H, Hancock R E. 2008. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 76: 4176-4182.

Palmer N, Maasch JR, Torres MD, de la Fuente-Nunez C. 2021. Molecular dynamics for antimicrobial peptide discovery. *Infect Immun.* 89: e00799-20.

Pan T, Miao JS, Zhang HB, Yan P, Lee PS, Jiang XY, Wu XB. 2021. Near-complete phylogeny of extant Crocodylia (Reptilia) using mitogenome-based data. *Zool J Linn Soc.* 191: 1075-1089.

Pandurangi S, Kishore G, Nikhilesh GSS, Lanka S. 2024. Nucleic Acid Amplification and Molecular Diagnostic Techniques in the Detection of ESKAPE Bacterial Pathogens. In: *ESKAPE Pathogens: Detection, Mechanisms and Treatment Strategies.* p 157-181. Springer Nature Singapore.

Panuszko A, Pastwa P, Gajewski J, Bruździak P. 2024. Characterizing Interactions Between Small Peptides and Dimethyl Sulfoxide Using Infrared Spectroscopy and Computational Methods. *Molecules*. 29: 5869.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Hecpudin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 276: 7806-7810.

Park SC, Park Y, Hahm KS. 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int J Mol Sci*. 12: 5971-5992.

Parker S, Camilo de Oliveira L, Lefkowitz EJ, Hendrickson RC, Bonjardim CA, Wold W S, Buller R M. 2018. The virology of taterapox virus in vitro. *Viruses*. 10: 463.

Pata S, Daduang S, Svasti J, Thammasirirak S. 2007. Isolation of Lysozyme like protein from crocodile leukocyte extract (*Crocodylus siamensis*). *Curr Appl Sci Technol*. 7: 70-85.

Peng L, Scheenstra MR, van Harten RM, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. 2020. The immunomodulatory effect of cathelicidin-B1 on chicken macrophages. *Vet Res*. 51: 1-12.

Penrith ML, Nesbit JW, Huchzermeyer F. 1991. Pox virus infection in captive juvenile caimans (*Caiman crocodilus fuscus*) in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 62: 137-139.

Pérez-Peinado C, Defaus S, Andreu D. 2020. Hitchhiking with nature: snake venom peptides to fight cancer and superbugs. *Toxins*. 12: 255.

Peschel A, Sahl HG. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 4: 529-536.

Piña CI, Larriera A, Cabrera MR. 2003. Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success, and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *J Herpetol*. 37: 199-202.

Pineda SS, Sollod BL, Wilson D, Darling A, Sunagar K, Undheim EA, King GF. 2014. Diversification of a single ancestral gene into a successful toxin superfamily in highly venomous Australian funnel-web spiders. *BMC Genomics*. 15: 1-16.

Piovesan D, Del Conte A, Clementel D, Monzon A, Bevilacqua M, Aspromonte MC, Tosatto SC. 2023. MobiDB: 10 years of intrinsically disordered proteins. *Nucleic Acids Res*. 51: D438-D444.

Pirtskhalava M, Amstrong AA, Grigolava M, Chubinidze M, Alimbarashvili E, Vishnepolsky B, Tartakovsky M. 2021. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Res*. 49: D288-D297.

Piskurek O, Nishihara H, Okada N. 2009. The evolution of two partner LINE/SINE families and a full-length chromodomain-containing Ty3/Gypsy LTR element in the first reptilian genome of *Anolis carolinensis*. *Gene*. 441: 111-118.

Piskurek O, Jackson DJ. 2012. Transposable elements: from DNA parasites to architects of metazoan evolution. *Genes*. 3: 409-422.

Piskurek O, Okada N. 2007. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 12046-12051.

Plisson F, Ramírez-Sánchez O, Martínez-Hernández C. 2020. Machine learning-guided discovery and design of non-hemolytic peptides. *Sci Rep*. 10: 16581.

Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 46: W200-W204.

Preecharram S, Jearranaiprepame P, Daduang S, Temsiripong Y, Somdee T, Fukamizo T, Thammasirirak S. 2010. Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. *Anim Sci J*. 81: 393-401.

Priyam M, Tripathy M, Rai U, Ghorai SM. 2018. Divergence of protein sensing (TLR 4, 5) and nucleic acid sensing (TLR 3, 7) within the reptilian lineage. *Mol Phylogenet Evol.* 119: 210-224.

Purohit K, Reddy N, Sunna A. 2024. Exploring the potential of bioactive peptides: From natural sources to therapeutics. *Int J Mol Sci.* 25: 1391.

Pxytycz B, Józkwicz A. 1994. Differential effects of temperature on macrophages of ectothermic vertebrates. *J Leukoc Biol.* 56: 729-731.

Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol.* 13: 1-54.

Qi J, Wang W, Lu W, Chen W, Sun H, Shang A. 2020. Design and biological evaluation of novel BF-30 analogs for the treatment of malignant melanoma. *J Cancer.* 11: 7184.

Quintal-Bojórquez N, Segura-Campos MR. 2021. Bioactive peptides as therapeutic adjuvants for cancer. *Nutr Cancer.* 73: 1309-1321.

Rádis-Baptista G, Kerkis I. 2011. Crostamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr Pharm Des.* 17: 4351-4361.

Raheem N, Straus SK. 2019. Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions. *Front Microbiol.* 10: 2866.

Rakus K, Ronsmans M, Vanderplasschen A. 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 66: 84-91.

Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 4: 361-372.

Rambaut A. 2009. FigTree, v1.3.1. University of Edinburgh, Edinburgh. Institute of Evolutionary Biology.

- Rambaut A, Drummond A, Xie D, Baele G, Suchard M. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol.* 67: 901-904.
- Rathinakumar R, Walkenhorst WF, Wimley WC. 2009. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *J Am Chem Soc.* 131: 7609-7617.
- Rehana S, Kini RM. 2007. Molecular isoforms of cobra venom factor-like proteins in the venom of *Austrelaps superbus*. *Toxicon.* 50: 32-52.
- Reis ES, Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. 2019. New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol.* 19: 503-516.
- Rhaiem RB, Houimel M. 2016. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Trop.* 159: 11-19.
- Rice ES, Kohno S, John JS, Pham S, Howard J, Lareau LF, Green RE. 2017. Improved genome assembly of American alligator genome reveals conserved architecture of estrogen signaling. *Genome Res.* 27: 686-696.
- Richardson KC, Webb GJ, Manolis SC. 2002. *Crocodiles: Inside out: a guide to the crocodylians and their functional morphology.* Surrey Beatty & Sons. Chipping Norton.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 11: 785-797.
- Ridi RE, Badir N, Rouby SE. 1981. Effect of seasonal variations on the immune system of the snake, *Psammophis schokari*. *J Exp Zool.* 216: 357-365.
- Rijkers GT, Teunissen AG, Van Oosterom R, Van Muiswinkel WB. 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquaculture.* 19: 177-189.

Riss T, Moravec R, Niles A, Duellman S, Benink H, Worzella TJ, Minor L. 2016. Cell viability assays. En: Markossian S, Grossman A, Baskir H, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

Rodriguez R, Jung CL, Gabayan V, Deng JC, Ganz T, Nemeth E, Bulut Y. 2014. Hepcidin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6. *Infect Immun.* 82: 745-752.

Russell NJ, Fukunaga N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 75: 171-182.

Saalfeld DT, Conway WC, Calkins GE. 2011. Food habits of American alligators (*Alligator mississippiensis*) in East Texas. *Southeast Nat.* 10: 659-672.

Sancho-Vaello E, Gil-Carton D, François P, Bonetti EJ, Kreir M, Pothula KR, Zeth K. 2020. The structure of the antimicrobial human cathelicidin LL-37 shows oligomerization and channel formation in the presence of membrane mimics. *Sci Rep.* 10: 17356.

Sandmeier FC, Weitzman CL, Tracy CR. 2018. An ecoimmunological approach to disease in tortoises reveals the importance of lymphocytes. *Ecosphere.* 9:e02427.

Sang Y, Ortega MT, Rune K, Xiau W, Zhang G, Soulages JL, Melgarejo T. 2007. Canine cathelicidin (K9CATH): gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide. *Dev Comp Immunol.* 31: 1278-1296.

Sang Y, Ramanathan B, Minton JE, Ross CR, Blecha F. 2006. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepcidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection. *Dev Comp Immunol.* 30: 357-366.

Santana FL, Arenas I, Haney EF, Estrada K, Hancock RE, Corzo G. 2021. Identification of a crocodylian β -defensin variant from *Alligator mississippiensis* with antimicrobial and antibiofilm activity. *Peptides*. 141: 170549.

Santana FL, Estrada K, Alford MA, Wu BC, Dostert M, Pedraz L, Hancock RE. 2022. Novel alligator cathelicidin As-CATH8 demonstrates anti-infective activity against clinically relevant and crocodylian bacterial pathogens. *Antibiotics*. 11: 1603.

Santos CEM, Hurtado CNL, Santiago BR, Gonzalez-Amaro R, Cañizales YGC, Martinez Fierro MDLL, Garcia Hernandez MH. 2016. LL-37, HNP-1, and HBD2/3 modulate the secretion of cytokines TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10 and MMP1 in human primary cell cultures. *Eur Cytokine Netw*. 27: 68-74.

Schaack S, Gilbert C, Feschotte C. 2010. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecol Evol*. 25: 537-546.

Schlander M, Hernandez-Villafuerte K, Cheng CY, Mestre-Ferrandiz J, Baumann M. 2021. How much does it cost to research and develop a new drug? A systematic review and assessment. *Pharmacoeconomics*. 39: 1243-1269.

Scocchi M, Bontempo D, Boscolo S, Tomasinsig L, Giulotto E, Zanetti M. 1999. Novel cathelicidins in horse leukocytes. *FEBS Lett*. 457: 459-464.

Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL. 1980. Thymus cell migration: quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol*. 10: 210-218.

Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, Svobodová R, Berka K, Bazgier V, Rose AS. 2021. Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res*. 49: W431-W437.

Seijas A. 2011. Los crocodylia de Venezuela: Ecología y conservación. Ed. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Caracas.

Sennikov AG. 2012. The first ctenosauriscid (Reptilia: Archosauromorpha) from the Lower Triassic of eastern Europe. *Paleontol J.* 46: 499-511.

Shaffer HB, Minx P, Warren DE, Shedlock AM, Thomson RC, Valenzuela N, Abramyan J, Amemiya CT, Badenhorst D, Biggar KK, *et al.*, (2013). The western painted turtle genome, a model for the evolution of extreme physiological adaptations in a slowly evolving lineage. *Genome Biol.* 14: R28.

Shaharabany M, Gollop N, Ravin S, Golomb E, DeMarco L, Ferreira PC, Friedman E. 1999. Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. *J Antimicrob Chemother.* 44: 416-418.

Shamova O, Brogden KA, Zhao C, Nguyen T, Kokryakov VN, Lehrer RI. 1999. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect Immun.* 67: 4106-4111.

Shang S, Zhong H, Wu X, Wei Q, Zhang H, Chen J, Zhang H. 2018. Genomic evidence of gene duplication and adaptive evolution of Toll like receptors (TLR2 and TLR4) in reptiles. *Int J Biol Macromol.* 109: 698-703.

Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tufféry P. 2014. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *J Chem Theory Comput.* 10: 4745-4758.

Shi J, Ganz T. 1998. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect Immun.* 66: 3611-3617.

Shi J, Wu J, Chen Q, Shen Y, Mi K, Yang H, *et al.* 2022. A frog-derived cathelicidin peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities effectively ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced peritonitis in mice. *ACS Infect Dis.* 8: 2464–2479.

Shin SY, Kang SW, Lee DG, Eom SH, Song WK, Kim JI. 2000. CRAMP analogues having potent antibiotic activity against bacterial, fungal, and tumor cells without hemolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 275: 904-909.

Shirley MH, Carr AN, Nestler JH, Vliet KA, Brochu CA. 2018. Systematic revision of the living African slender-snouted crocodiles (*Mecistops* Gray, 1844). *Zootaxa*. 4504: 151-193.

Siddiqui R, Maciver SK, Khan NA. 2022. Gut microbiome-immune system interaction in reptiles. *J Appl Microbiol*. 132: 2558-2571.

Siroski PA. 2011. Caracterización del sistema del complemento e identificación de componentes del sistema inmune innato del yacaré overo (*Caiman latirostris*). Tesis Doctoral. FCV-UNL.

Siroski PA, Bassetti L, Piña CI, Larriera A. 2019. Broad-snouted *Caiman latirostris*. En: Manolis C, Stevenson C, Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Fourth Edition. p 7. Crocodile Specialist Group: Darwin.

Siroski PA, Merchant M, Marco MP, Poletta G, Ortega H. 2011. Comparison of plasma dipeptidyl peptidase IV activity in two caiman species: *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia, Alligatoridae). *Anim Biol*. 61: 199-210.

Siroski PA, Merchant M, Parachu Marco MV, Piña CI, Ortega HH. 2010. Characterization of Serum Complement Activity of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia: Alligatoridae).

Siroski PA, Soledad MB. 2020. Review of the Recent Knowledge on the Crocodylian Immune System. *South Am J Herpetol*. 18: 68-77.

Sistema de Información de Biodiversidad de la Administración de Parques Nacionales, Argentina (SIB). [Inicio | SIB, Parques Nacionales, Argentina](#). Actualizado en marzo, 2025.

Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, Risso A, Zanetti M. 2001. Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 715-722.

Soehnlein O, Zernecke AE, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Lindbom L. 2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 112: 1461-1471.

Solas MT, Zapata A. 1980. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) in reptiles: intraepithelial cells. *Dev Comp Immunol*. 4: 87-97.

Solórzano A, Núñez-Flores M, Inostroza-Michael O, Hernández CE. 2020. Biotic and abiotic factors driving the diversification dynamics of Crocodylia. *Palaeontology*. 63: 415-429.

Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. 1997. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*. 90: 2796-2803.

Sosiangdi S, Taemaitree L, Tankrathok A, Daduang S, Boonlue S, Klaynongsruang S, Jangpromma N. 2023. Rational design and characterization of cell-selective antimicrobial peptides based on a bioactive peptide from *Crocodylus siamensis* hemoglobin. *Sci Rep*. 13: 16096.

Sowers A, Wang G, Xing M, Li B. 2023. Advances in antimicrobial peptide discovery via machine learning and delivery via nanotechnology. *Microorganisms*. 11: 1129.

Söylemez ÜG, Yousef M, Kesmen Z, Büyükkiraz ME, Bakir-Gungor B. 2022. Prediction of linear cationic antimicrobial peptides active against gram-negative and gram-positive bacteria based on machine learning models. *Appl Sci*. 12: 3631.

Spänig S, Heider D. 2019. Encodings and models for antimicrobial peptide classification for multi-resistant pathogens. *BioData Min*. 12: 1-29.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of

testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 115: 891-899.

Stubbs TL, Pierce SE, Elsler A, Anderson PS, Rayfield EJ, Benton MJ. 2021. Ecological opportunity and the rise and fall of crocodylomorph evolutionary innovation. *Proc R Soc B*. 288: 20210069.

Studer RA, Dessailly BH, Orengo CA. 2013. Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. *Biochem J*. 449: 581-594.

Suh A, Witt CC, Menger J, Sadanandan KR, Podsiadlowski L, Gerth M, Rheindt FE. 2016. Ancient horizontal transfers of retrotransposons between birds and ancestors of human pathogenic nematodes. *Nat Commun*. 7: 11396.

Sunagar K, Moran Y. 2015. The rise and fall of an evolutionary innovation: contrasting strategies of venom evolution in ancient and young animals. *PLoS Genet*. 11: e1005596.

Surm JM, Smith HL, Madio B, Undheim EA, King GF, Hamilton BR, Prentis PJ. 2019. A process of convergent amplification and tissue-specific expression dominates the evolution of toxin and toxin-like genes in sea anemones. *Mol Ecol*. 28: 2272-2289.

Takahashi D, Shukla SK, Prakash O, Zhang G. 2010. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*. 92: 1236-1241.

Takahashi H, Hayashi K. 1982. Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom. *Biochim Biophys Acta*. 701: 102-110.

Tambourgi DV, van den Berg CW. 2014. Animal venoms/toxins and the complement system. *Mol Immunol*. 61: 153-162.

Tanaka GD, Pidde-Queiroz G, Furtado MFD, van den Berg C, Tambourgi DV. 2012. Micrurus snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. *BMC Immunol.* 13: 1-7.

Tang KY, Wang X, Wan QH, Fang SG. 2018. A crucial role of paralogous β -defensin genes in the Chinese alligator innate immune system revealed by the first determination of a Crocodylia defensin cluster. *Dev Comp Immunol.* 81: 193-203.

Tankrathok A, Punpad A, Kongchaiyapoom M, Sosiangdi S, Jangpromma N, Daduang S, Klaynongsruang S. 2019. Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity. *Biotechnol Appl Biochem.* 66: 142-152.

Tempra C, La Rosa C, Lolicato F. 2021. The role of alpha-helix on the structure-targeting drug design of amyloidogenic proteins. *Chem Phys Lipids.* 236: 105061.

Tennessen JA. 2005. Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J Evol Biol.* 18: 1387-1394.

Termen S, Tollin M, Olsson B, Svenberg T, Agerberth B, Gudmundsson GH. 2003. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 60: 536-549.

Theansungnoen T, Maijaroen S, Jangpromma N, Yaraksa N, Daduang S, Temsiripong T, Klaynongsruang S. 2016. Cationic antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* leukocyte extract, revealing anticancer activity and apoptotic induction on human cervical cancer cells. *Protein J.* 35: 202-211.

Thevenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tuffery P. 2012. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res.* 40: W288-W293.

Thompson JN. 1999. The evolution of species interactions. *Science*. 284: 2116-2118.

Timmons PB, Hewage CM. 2020. HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Sci Rep*. 10: 10869.

Timmons PB, Hewage CM. 2021. ENNAACT is a novel tool which employs neural networks for anticancer activity classification for therapeutic peptides. *Biomed Pharmacother*. 133: 111051.

Timmons PB, Hewage CM. 2021. ENNAVIA is a novel method which employs neural networks for antiviral and anti-coronavirus activity prediction for therapeutic peptides. *Brief Bioinform*. 22: bbab258.

Ting DSJ, Beuerman RW, Dua HS, Lakshminarayanan R, Mohammed I. 2020. Strategies in translating the therapeutic potentials of host defense peptides. *Front Immunol*. 11: 983.

Tomasinsig L, De Conti G, Skerlavaj B, Piccinini R, Mazzilli M, D'Este F, Zanetti M. 2010. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect Immun*. 78: 1781-1788.

Tomasinsig L, Zanetti M. 2005. The cathelicidins-structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*. 6: 23-34.

Tompa P. 2005. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett*. 579: 3346-3354.

Torrent M, Di Tommaso P, Pulido D, Nogués MV, Notredame C, Boix E, Andreu D. 2012. AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. *Bioinformatics*. 28: 130-131.

Torres MD, Cao J, Franco OL, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. 2021. Synthetic biology and computer-based frameworks for antimicrobial peptide discovery. *ACS Nano*. 15: 2143-2164.

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. 2000. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Pept Sci*. 55: 4-30.

Tourasse NJ, Li WH. 2000. Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. *Mol Biol Evol*. 17: 656-664.

Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res*. 44: W232-W235.

Turner A, Radburn-Smith K, Mushtaq A, Tan L. 2011. Storage and handling guidelines for custom peptides. *Curr Protoc Protein Sci*. 64: 18-12.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 40: e115-e115.

Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE, Zasloff M. 2003. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*. 24: 1655-1667.

Van Der Lee R, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker AK, Babu MM. 2014. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev*. 114: 6589-6631.

Van Dijk A, Veldhuizen EJ, van Asten AJ, Haagsman HP. 2005. CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein. *Vet Immunol Immunopathol*. 106: 321-327.

Van Hoek ML. 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals*. 7: 723-753.

Van Hoek ML. 2016. Diversity in host defense antimicrobial peptides. In *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents*. p. 3-26. Cham: Springer International Publishing.

Van Kempen M, Kim SS, Tumescheit C, Mirdita M, Lee J, Gilchrist CL, Steinegger M. 2024. Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nat Biotechnol*. 42: 243-246.

Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, Velankar S. 2024. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res*. 52: D368-D375.

Varela-Rodríguez H, Guzman-Pando A, Camarillo-Cisneros J. 2024. Screening and computational characterization of novel antimicrobial cathelicidins from amphibian transcriptomic data. *Comput Biol Chem*. 113: 108276.

Vélez-Juarbe J, Brochu CA, Santos H. 2007. A gharial from the Oligocene of Puerto Rico: transoceanic dispersal in the history of a non-marine reptile. *Proc R Soc B*. 274: 1245-1254.

Verdade LM, Larriera A, Piña CI. 2010. Broad-snouted caiman *Caiman latirostris*. *Crocodiles status survey and conservation action plan*. 18: 22.

Vogel CW, Bredehorst R, Fritzing DC, Grunwald T, Ziegelmüller P, Kock MA. 1996. Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Natural Toxins 2: Structure, Mechanism of Action, and Detection*, 97-114.

Vogel CW, Finnegan PW, Fritzing DC. 2014. Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models. *Mol Immunol*. 61: 191-203.

Vogel CW, Fritzing DC. 2007. Humanized cobra venom factor: experimental therapeutics for targeted complement activation and complement depletion. *Curr Pharm Des*. 13: 2916-2926.

Vogel CW, Fritzing DC. 2010. Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon*. 56: 1198-1222.

Vogel C, Fritzing D. 2017. Cobra venom factor: The unique component of cobra venom that activates the complement system. En: Gopalakrishnakone P, Inagaki H, Vogel C, Mukherjee A, Rahmy T, Snake Venoms. p 345-404. Ed. Springer Nature. Dordrecht.

Vogt W, Schmidt G. 1964. Abtrennung des anaphylatoxinbildenden Prinzips aus Cobragift von anderen Giftkomponenten. *Experientia*. 20: 207-208.

Wallau GL, Vieira C, Loreto ÉLS. 2018. Genetic exchange in eukaryotes through horizontal transfer: connected by the mobilome. *Mobile DNA*. 9: 1-16.

Waller T, Micucci PA. 1993. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los crocodilos de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Zoocría de los Crocodylia*. Memorias de la primera reunión de regional del grupo de especialistas en cocodrilos de la UICN.: I Taller sobre zoocría de los crocodylia, Santa Marta, Colombia, 341-385.

Wan QH, Pan SK, Hu LI, Zhu Y, Xu PW, Xia JQ, Fang SG. 2013. Genome analysis and signature discovery for diving and sensory properties of the endangered Chinese alligator. *Cell Res*. 23: 1091-1105.

Wang G. 2008. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem*. 283: 32637-32643.

Wang G. 2022. Unifying the classification of antimicrobial peptides in the antimicrobial peptide database. In *Methods Enzymol*. 663: 1-18. Academic Press.

Wang G, Mishra B, Lau K, Lushnikova T, Golla R, Wang X. 2015. Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals*. 8: 123-150.

Wang L, Zhang H, Wang L, Zhang D, Lv Z, Liu Z, Song L. 2017. The RNA-seq analysis suggests a potential multi-component complement system in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.* 76: 209-219.

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: e3217.

Waterhouse AM, Studer G, Robin X, Bienert S, Tauriello G, Schwede T. 2024. The structure assessment web server: for proteins, complexes and more. *Nucleic Acids Res.* 52: W318-W323.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46: W296-W303.

Webb GJW, Manolis SC, Dempsey KE, Whitehead PJ. 1987. Crocodilian eggs: a functional overview. *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators.* Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty and Sons and the Conservation Commission of the Northern Territory, 417-422.

Webb G, Manolis SC. 1989. *Crocodiles of Australia.* Ed. Reed Books, Frenchs Forest. New South Wales. p. 61.

Weiss K, Khoshgoftaar TM, Wang D. 2016. A survey of transfer learning. *J Big Data.* 3: 1-40.

Wilberg EW, Turner AH, Brochu CA. 2019. Evolutionary structure and timing of major habitat shifts in Crocodylomorpha. *Sci Rep.* 9: 514.

Williams SA, Lay FT, Bindra GK, Banjara S, Poon IK, Phan TK, Hulett MD. 2023. Crocodile defensin (CpoBD13) antifungal activity via pH-dependent phospholipid targeting and membrane disruption. *Nat Commun.* 14: 1170.

Willis PM, Stilwell JD. 2000. A probable piscivorous crocodile from Eocene deposits of McMurdo Sound, East Antarctica. *Paleobiology and*

Paleoenvironments of Eocene Rocks: McMurdo Sound, East Antarctica, 76: 355-358.

Wilson CL, Schmidt AP, Pirilä E, Valore EV, Ferri N, Sorsa T, Parks WC. 2009. Differential processing of α - and β -defensin precursors by matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). *J Biol Chem.* 284: 8301-8311.

Wolfe JL, Bradshaw DK, Chabreck RH. 1987. Alligator feeding habits: new data and a review. *Gulf Mex Sci.* 9: 1.

Wong ES, Papenfuss AT, Whittington CM, Warren WC, Belov K. 2012. A limited role for gene duplications in the evolution of platypus venom. *Mol Biol Evol.* 29: 167-177.

Wu D, Fu L, Wen W, Dong N. 2022. The dual antimicrobial and immunomodulatory roles of host defense peptides and their applications in animal production. *J Anim Sci Biotechnol.* 13: 141.

Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. 2014. Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 351: 13-22.

Wu WKK, Wong CCM, Li ZJ, Zhang L, Ren SX, Cho CH. 2010. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacol Sin.* 31: 1118-1122.

Wu Z, Cai Y, Han Y, Su Y, Zhang T, Wang X, Zhang Z. 2024. Development of α -Helical antimicrobial peptides with imperfect amphipathicity for superior activity and selectivity. *J Med Chem.* 67: 19561-19572.

Xiao Y, Cai Y, Bommineni YR, Fernando SC, Prakash O, Gilliland SE, Zhang G. 2006. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. *J Biol Chem.* 281: 2858-2867.

Xu YY, Cao XW, Fu LY, Zhang TZ, Wang FJ, Zhao J. 2019. Screening and characterization of a novel high-efficiency tumor-homing cell-penetrating peptide from the buffalo cathelicidin family. *J Pept Sci.* 25: e3201.

Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE. 2001. Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev.* 180: 123-135.

Yacoub HA, Al-Maghrabi OA, Ahmed ES, Uversky VN. 2017. Abundance and functional roles of intrinsic disorder in the antimicrobial peptides of the NK-lysin family. *J Biomol Struct Dyn.* 35: 836-856.

Yacoub HA, Elazzazy AM, Mahmoud MM, Baeshen MN, Al-Maghrabi OA, Alkarim S, Uversky VN. 2016. Chicken cathelicidins as potent intrinsically disordered biocides with antimicrobial activity against infectious pathogens. *Dev Comp Immunol.* 65: 8-24.

Yan J, Cai J, Zhang B, Wang Y, Wong DF, Siu SW. 2022. Recent progress in the discovery and design of antimicrobial peptides using traditional machine learning and deep learning. *Antibiotics.* 11: 1451.

Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Chertov O. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 192: 1069-1074.

Yaraksa N, Anunthawan T, Theansungnoen T, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, Thammasirirak S. 2014. Design and synthesis of cationic antibacterial peptide based on Leucrocine I sequence, antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *J Antibiot.* 67: 205-212.

Yasin B, Harwig SS, Lehrer RI, Wagar EA. 1996. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to protegrins and defensins. *Infect Immun.* 64: 709-713.

Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH. 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry.* 37: 14713-14718.

Yu K, Park K, Kim Y, Kang SW, Shin SY, Hahm KS. 2002. Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy. *J Pept Res.* 60: 1-9.

Yun Y, Peng Y, Liu FX, Lei C. 2011. Wolbachia screening in spiders and assessment of horizontal transmission between predator and prey. *Neotrop Entomol.* 40: 164-169.

Zanetti M. 2005. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol.* 7: 179-196.

Zanetti M, Del Sal G, Storici P, Schneider C, Romeo D. 1993. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. *J Biol Chem.* 268: 522-526.

Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374: 1-5.

Zarkadis IK, Mastellos D, Lambris JD. 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev Comp Immunol.* 25: 745-762.

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

Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, Hong XY, Shao G, Ma JJ, Fu CY. 2021. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil Med Res.* 8: 1-25.

Zhang Z, Chen B, Yuan L, Niu C. 2015. Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Dev Comp Immunol.* 49: 127-137.

Zhao C, Nguyen T, Boo LM, Hong T, Espiritu C, Orlov D, Lehrer RI. 2001. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 2695-2702.

Zhao C, Nguyen T, Liu L, Sacco RE, Brogden KA, Lehrer RI. 2001b. Gallinacin-3, an inducible epithelial β -defensin in the chicken. *Infect Immun.* 69: 2684-2691.

Zhou X, Lin Z, Ma H. 2010. Phylogenetic detection of numerous gene duplications shared by animals, fungi and plants. *Genome Biol.* 11: 1-13.

Zimmerman LM. 2020. The reptilian perspective on vertebrate immunity: 10 years of progress. *J Exp Biol.* 223: jeb214171.

Zimmerman LM, Bowden RM, Vogel LA. 2014. A vertebrate cytokine primer for eco-immunologists. *Funct Ecol.* 28: 1061-1073.

Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol.* 213: 661-671.

ANEXOS

Anexo 1. Espectros de absorción de plcat1lat y plcat2lat para dicroísmo circular

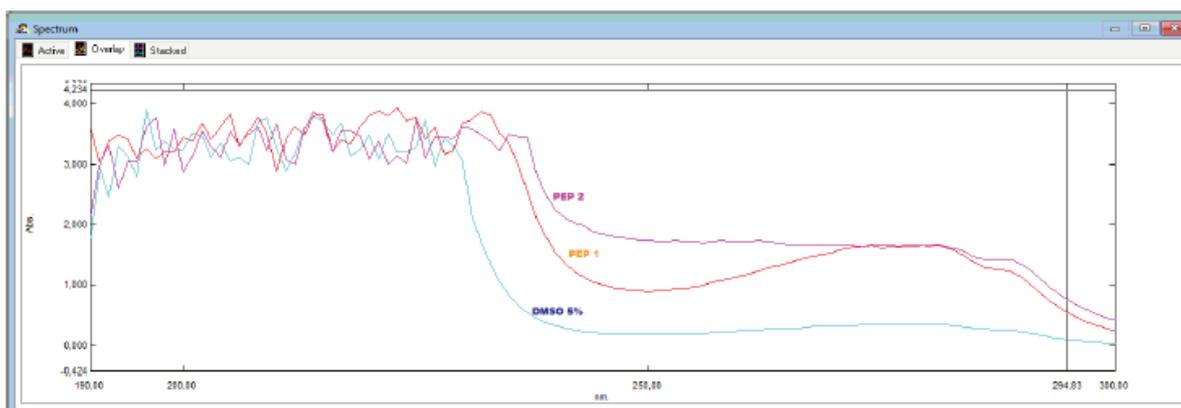


Imagen 1: Espectros de absorción uv- visibles- Concentraciones Originales

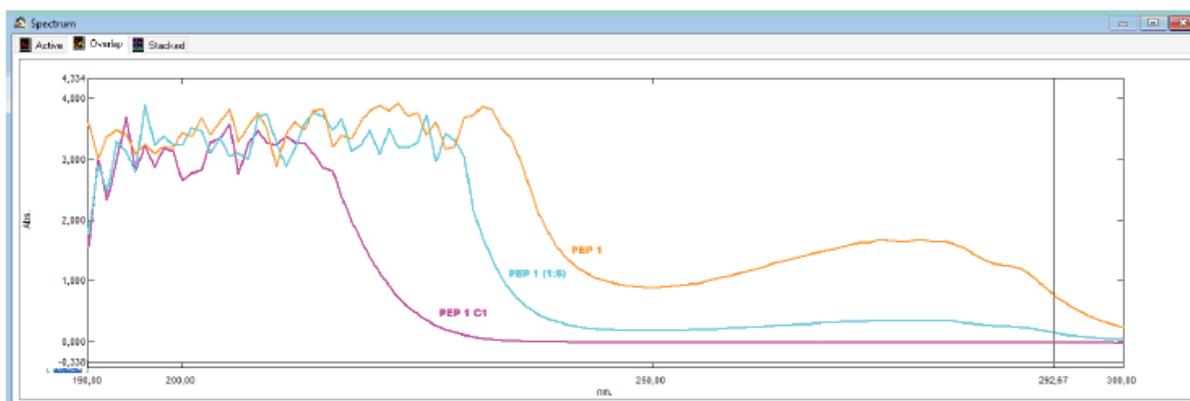


Imagen 2: Espectros de absorción uv- visibles- Espectro naranja : pept1 concentración original; espectro celeste pept 1 diluido 1/ 5; espectro magenta diluido 1/125.

Anexo 2. Hojas técnicas proporcionadas por BIOMATIK de plcat1lat y plcat2lat



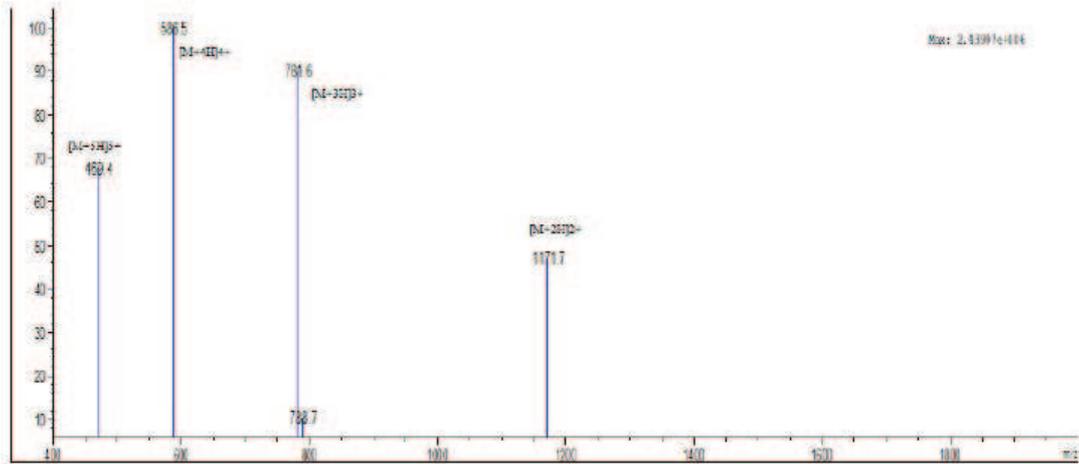
Biomatik
Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089
Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515
Email: info@biomatik.com
http://www.biomatik.com

Certificate of Analysis

Date:	2023-09-06
Order Number:	#SP231074
Product Type:	Chemically synthesized peptide
Catalog Number:	1102606
Peptide Name:	plcat1lat
Sequence (N to C):	KRVNWPVKVGRVLRFLPYI-NH2
MW:	2341.84
Salt Form:	Trifluoroacetate (TFA Salt)
Quantity:	15.0mg
Suggested Solvent:	1.0mg peptide soluble in 1.0ml DMSO
Lot Number:	P230821-HS1102606
Appearance:	White to off-white lyophilized powder.
Storage:	Store lyophilized peptide at -20°C upon receipt. Reconstitute only the amount of peptide needed for immediate use.
Limited Usage:	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures, or for administration to humans or animals.

ASSAY	SPECIFICATION	ACTUAL
MW by MS	2342.00	Conforms
Purity by HPLC	>98%	98.15%
Peptide Content	N/A	N/A
TFA Content	N/A	N/A
Moisture Content	N/A	N/A

MS REPORT



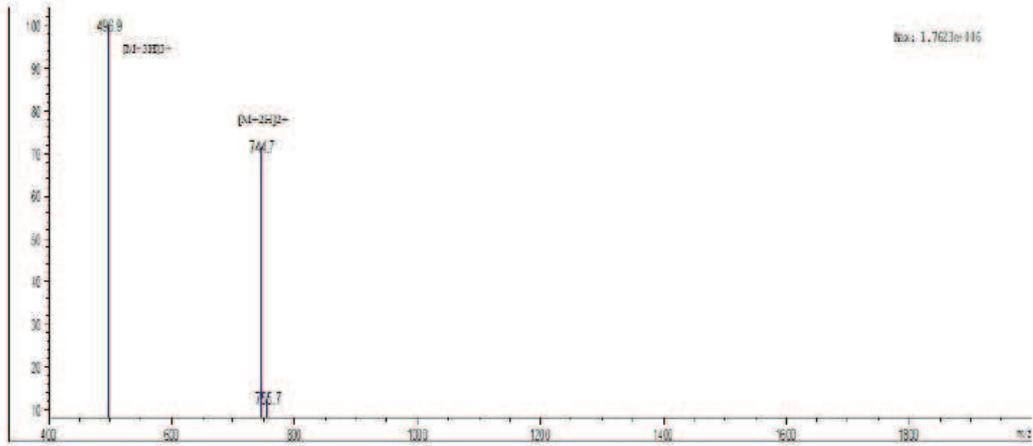
Sample Description:	Instrument:	Agilent-6125B		
Analyzed date: 2025-08-21	Probe:	ESI	Probe Bias:	+4.5kV
Analyst: NU	Nebulizer Gas Flow:	1.5L/min	Desecor:	1.5kV
Sample: plectilat_KI-19	CDL:	-20.0V	T. Flow:	0.2ml/min
M.W.: 1341.84	CDL Temp.:	250 °C	B. Conc.:	50%:H2O/50%:ACN
Lot. No.: P230821-HS1102606	Block Temp.:	200 °C		

Certificate of Analysis

Date:	2023-09-06
Order Number:	#SP231074
Product Type:	Chemically synthesized peptide
Catalog Number:	1102607
Peptide Name:	plcat2lat
Sequence (N to C):	RKKFWKKVLKGA-NH ₂
MW:	1487.87
Salt Form:	Trifluoroacetate (TFA Salt)
Quantity:	15.0mg
Suggested Solvent:	1.0mg peptide soluble in 1.0ml DMSO
Lot Number:	P230821-HS1102607
Appearance:	White to off-white lyophilized powder.
Storage:	Store lyophilized peptide at -20°C upon receipt. Reconstitute only the amount of peptide needed for immediate use.
Limited Usage:	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures, or for administration to humans or animals.

ASSAY	SPECIFICATION	ACTUAL
MW by MS	1487.70	Conforms
Purity by HPLC	>98%	98.52%
Peptide Content	N/A	N/A
TFA Content	N/A	N/A
Moisture Content	N/A	N/A

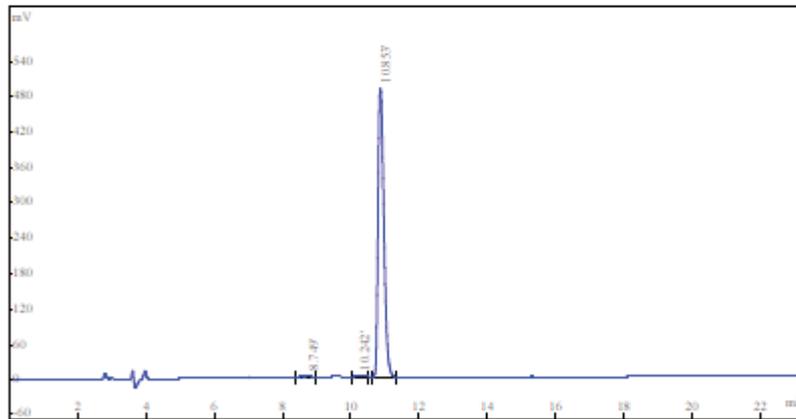
MS REPORT



Sample Description	Instrument	Agilent-6125B	Probe Bias:	+4.5kv
Analyzed date: 2023-08-31	Probe:	ESI	Detector:	1.5kv
Analyst: YU	Nebulizer Gas Flow:	1.5L/min	T. Flow:	0.2ml/min
Sample: plectat RA-12	CDL:	29.0v	B. Conc.:	50%H2O/50%ACN
M.W.: 1487.87	CDL Temp.:	250 °C		
Lot No.: P230821-HS1102607	Block Temp:	200 °C		

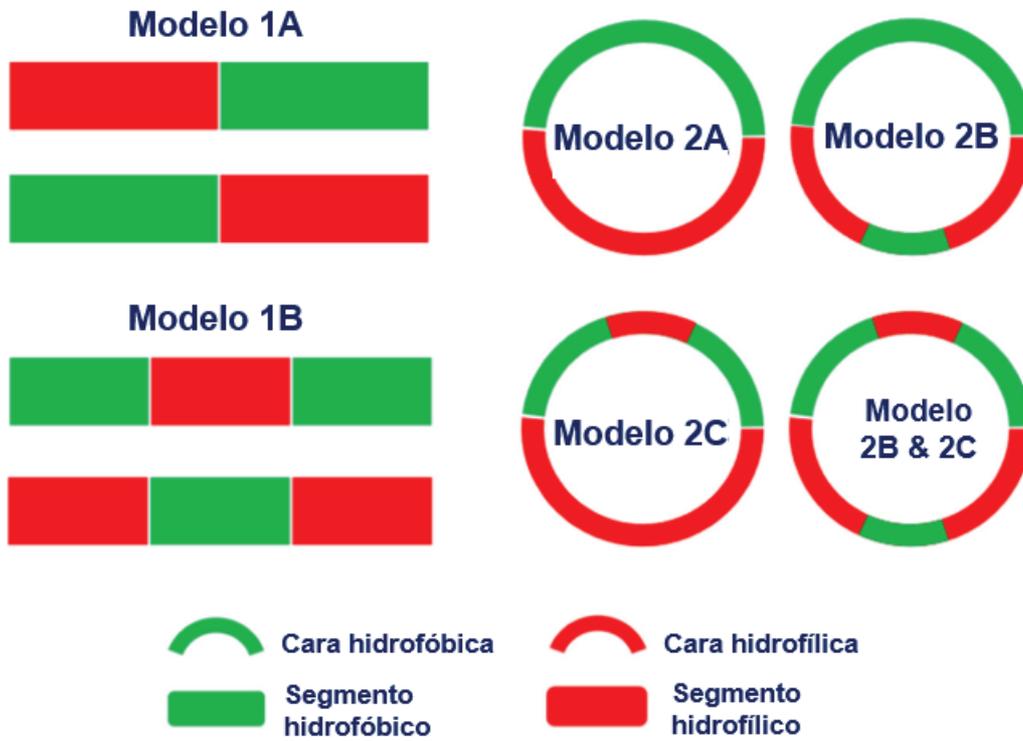
HPLC REPORT

Product Name :plcat2lat RA-12
 Lot No :P230821-HS1102607
 Column :Gemini-NX 5 μ C18 110A, 4.6*250mm
 Solvent A :0.1%Trifluoroacetic in 100% Acetonitrile
 Solvent B :0.1%Trifluoroacetic in 100% Water
 Gradient : A B
 0.01min 10% 90%
 25min 70% 30%
 25.01min 100% 0%
 30min Stop
 Flow rate :1.0ml/min
 Wavelength :220nm
 Volume :20ul



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	8.749	0.8294	45799	3259
2	10.242	0.6423	35470	2275
3	10.853	98.5283	5440702	487554
Total		100	5521971	493088

Anexo 3. Estilos anfipáticos comunes de péptidos antimicrobianos (Modificado de: : Bui Thi Phuong *et al.*, 2024)



PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA TESIS

Cordero T, Amavet P, Marelli BE, Siroski, PA. 2023. Evidence of venom factor-like in crocodylians. *Organisms Diversity & Evolution*. 23(4): 941-952.

Cordero T, Moleón MS, Marelli BE, Siroski PA. 2024. Host Defense Peptides in Crocodylians- A Comprehensive Review. *Peptides*. 171312.