



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los
péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra aislados
bacterianos de interés clínico**

**TESIS
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:
Q.F.B. Daniel Salazar Hernández**

**DIRECTORA DE TESIS:
D.C. Verónica Quintero Hernández**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:
D.C. Lucía Martínez Martínez**

2023



Puebla, Pue. a 8 de mayo 2023

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Daniel Salazar Hernández**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y Qncs-BUAP contra aislados bacterianos de interés clínico”

A nuestro juicio, el alumno **Daniel Salazar Hernández** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

Juárez González
D.C. Víctor Rivelino Juárez González

JM
D.C. Jesús Muñoz Rojas

Claudia
D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

Vianey
D.C. Vianey Marín Cevada

A Dios, por darme salud, sabiduría y fortaleza para lograr concluir satisfactoriamente mis estudios de maestría.

A mis padres Manuel Ciro Salazar Gordillo y Noemi Hernández Pinto. Gracias por su cariño, apoyo incondicional y consejos a lo largo de mi trayectoria académica, así como los valores y principios que me inculcaron desde pequeño. Cada día aprendo mucho de ustedes y son un claro ejemplo de esfuerzo y dedicación. Siempre estaré muy orgulloso y agradecido de tenerlos como padres.

También dedico este trabajo a mi esposa, le agradezco por siempre apoyarme y alentarme a superar cualquier reto, y principalmente a mi hijo que me llena de alegría la vida sin importar la situación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por otorgarme la beca No. 788567 para llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencias (Microbiología).

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM)**, a la **dirección del Instituto de Ciencias (ICUAP)** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** por los apoyos otorgados para la asistencia a congresos y estancias de investigación.

Agradezco a mi directora de tesis **D.C. Verónica Quintero Hernández**, por apoyarme y guiarme en este proyecto. Por los conocimientos, experiencias y el tiempo compartido para mi crecimiento personal y profesional.

Mi más sincero agradecimiento a mi codirectora de tesis **D.C. Lucía Martínez Martínez**, por su tiempo, dedicación y apoyo brindado, por los consejos y experiencias compartidas. Sus conocimientos fueron indispensables para mi formación académica.

Al **D.C. Víctor** por otorgarme las facilidades durante mi estancia de investigación, y a **Fernando Levaro Domínguez** por guiarme en la realización de mis ensayos.

A los miembros de mi comité tutorial, **D.C. Víctor Rivelino Juárez González** y **D.C. Claudia F. Martínez de la Peña**, **D.C. Jesús Muñoz Rojas**, por sus comentarios, sugerencias y asesoría durante estos dos años.

Al **Dr. Víctor H. Bustamante Santillán**, del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo, conocimiento, y el material necesario durante mi estancia de investigación. Agradezco también al **Bio. Fernando Llano Villarreal**, por su gran amistad y apoyo brindado.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Aminoglucósidos
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BL	Betalactámico
CL	Cardiolipina
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
Da	Dalton
DO	Densidad óptica
g	Gramos
hrs	Horas
H₂O	Agua
Kda	Kilodalton
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
IsCT	Péptido linear citotóxico del alacrán <i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (encontrado en Isalo, Madagascar).
L	Litros
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LS	Lincosamidas
M	Masa molecular

MDR	Miltidrogoresistente
mm	Milímetros
NCBI	National Center for Biotechnology information
PAM	Péptido antimicrobiano
PBP	Proteínas de unión a penicilinas
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón Fosfato Salino)
PDR	Pandrogo resistente
PG	Fosfatidilglicerol
Rpm	Revoluciones por minuto
SD	Standard deviation (desviación estándar)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
μL	Microlitros
μM	Micromolar
XDR	Extremadamente resistente

INDICE

AGRADECIMIENTOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ABREVIATURAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ABSTRACT	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Antibióticos	9
1.1.1 Clases de antibióticos	9
1.1.2 β -Lactámicos.....	9
1.1.3 Aminoglucósidos	10
1.1.4 Macrólidos.....	11
1.1.5 Lincosamidas	11
1.1.6 Glucopeptidos	12
1.1.7 Quinolonas	12
1.1.8 Tetraciclinas	12
1.2 Resistencia a los antibióticos	13
1.3 Bacterias de importancia médica	14
1.4 Péptidos antimicrobianos	16
1.4.1 Péptidos antimicrobianos del veneno de alacrán	16
1.4.2 Mecanismo de Acción de la PAMs	18
2. ANTECEDENTES	21
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	22
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1. Objetivos particulares.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Síntesis y resuspensión de los PAMs.....	23
5.2 Cepas utilizadas	24
5.3 Ensayo de actividad hemolítica	24
5.4 Actividad antimicrobiana.....	25
5.4.1 Difusión en disco y pozo	25
5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	25
5.4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para Mycobacterium tuberculosis	26
5.4.4 Evaluación de la actividad sinérgica antimicrobiana	27
6. RESULTADOS	23
6.1 Actividad citotóxica contra eritrocitos humanos de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP	27
6.2 Actividad en ensayo por difusión en disco de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP	28
6.3 Actividad antimicrobiana de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP en ensayo por difusión en pozos	29
6.4 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del péptido Uy234	30
6.5 Actividad antimicrobiana de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP contra Mycobacterium tuberculosis	33
6.6 La combinación del péptido Uy234 con un antibiótico no demuestra un sinergismo	33
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES	38

RESUMEN

En los últimos años, el incremento de cepas bacterianas multidrogoresistentes (MDR) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial. Esto se debe a la alta tasa de mutación espontánea y la recombinación genética de las bacterias, asociadas al uso irracional de los antibióticos por esta razón las terapias antimicrobianas disponibles no son suficientes para eliminar a patógenos MDR. Debido a esta crisis, es urgente la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos u otras moléculas biológicas para desarrollar nuevos fármacos efectivos contra MDR de interés clínico.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son considerados como una alternativa para el desarrollo de nuevos antibióticos para hacer frente a enfermedades infecciosas, pues poseen mecanismos de acción diferentes a los de los antibióticos existentes, ya que actúa mediante una interacción electrostática con la membrana de las bacterias, desafortunadamente, son limitados los PAMs que cumplen con los requisitos para su uso terapéutico. Los PAMs del veneno de alacrán son un ejemplo de sustancias bioactivas con potencial para su uso contra bacterias MDR.

En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de los PAM Uy234 derivado del veneno del alacrán *Urodacus yaschenkoi* y del PAM QnCs-BUAP frente a diversas cepas bacterianas de interés clínico. Además, se evaluó la actividad hemolítica de los péptidos combinados contra eritrocitos humanos. Se encontró que el péptido Uy234 posee una gran actividad antimicrobiana contra los aislados clínicos MDR y tienen una actividad hemolítica notablemente baja en combinación con el péptido consenso. Estos resultados sugieren que el péptido Uy234 tiene actividad inhibitoria contra algunas bacterias de interés crítico señaladas por la OMS: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y una actividad bactericida contra diversas cepas de *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antibióticos

El estudio de los antibióticos comienza en 1928 cuando Sir Alexander Fleming descubrió la penicilina. Los antibióticos se introdujeron por primera vez en la práctica clínica en la década de 1930 (93). La mayoría de las clases modernas de antibióticos se descubrieron entre 1940 y 1980 mediante la detección de la actividad antimicrobiana de microorganismos cultivados únicamente del suelo. La mayoría de los antimicrobianos son metabolitos secundarios producidos por bacterias (*Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*) y hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium* y *Aspergillus*) (1).

1.1.1 Clases de antibióticos

Los antibióticos son de vital importancia para el tratamiento de una infección bacteriana, y dependiendo de su mecanismo de acción pueden ser citotóxicos (logran matar a las bacterias) o citostáticos (demora o detiene el crecimiento y reproducción de las células bacterianas) para los microorganismos. A menudo actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, los ácidos nucleicos (ADN y/o ARN), desorganizan la membrana u otras acciones específicas (2, 95). Pueden entrar en la pared celular de las bacterias al unirse a ellas, utilizando los mecanismos de transporte dependientes de la energía en los sitios ribosómicos, lo que posteriormente conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas (3). Este desequilibrio en las bacterias permite que las defensas naturales del cuerpo, como el sistema inmunitario, logre combatirlas (94). Existen diversas clases de antibióticos, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura química, mecanismo de acción y espectro de actividad. Algunas de las clases de antibióticos más comunes se nombran a continuación.

1.1.2 β -Lactámicos

Los antibióticos betalactámicos (BL) son la primera opción de tratamiento de varias infecciones. Incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (4). La estructura central de las penicilinas comprende un anillo de tiazolidina de cinco miembros unido al anillo betalactámico (95). Las penicilinas naturales (penicilina G y penicilina V) y las penicilinas de espectro reducido (metecilina, nafcilina, oxacilina, dicloxacilina) son más activas contra los organismos

Gram-positivos, mientras que las penicilinas de amplio espectro (amoxicilina, ampicilina) son activas contra los organismos Gram-positivos y Gram-negativos (5, 96). El mecanismo de acción de los BL es por medio de la unión a las proteínas D, que son D-transpeptidasas (también conocidas como proteínas de unión a penicilina o PBP) que catalizan el entrecruzamiento de las cadenas laterales de peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular. Una vez que se une un antibiótico β -lactámico, las PBP se inactivan, lo que impide que continúe la síntesis de la pared celular (99).

1.1.3 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos (AG) son una clase de antibióticos inhibidores a nivel de la traducción con un amplio espectro de actividad. (6) Desde el descubrimiento de la estreptomina en la década de 1940 se han aislado numerosos AG y se han sintetizado nuevos derivados. Una desventaja importante del uso clínico de los AG ha sido su ototoxicidad (perturbación transitoria o definitivas de la función auditiva) (7). Los aminoglucósidos son activos contra varios organismos Gram-positivos y Gram-negativos. Los AG se caracterizan por una estructura central de aminoazúcares conectados mediante enlaces glucosídicos a un aminociclitol dibásico, que suele ser 2-desoxiestreptamina (97). Se clasifican en cuatro subclases según la identidad del resto aminociclitol: sin desoxiestreptamina, con un anillo de desoxiestreptamina monosustituido, con un anillo de desoxiestreptamina 4,5-disustituido o con un anillo de desoxiestreptamina 4,6-disustituido (98).

Los AG inhiben la síntesis de proteínas al unirse, con alta afinidad al sitio A del ARN ribosómico 16S de la subunidad ribosomal 30S (8). Aunque los miembros de las clases de AG poseen una especificidad para diferentes regiones en el sitio A, todos alteran su conformación. Como resultado de esta interacción, el antibiótico promueve la traducción incorrecta al inducir la lectura incorrecta de codones en la administración del ARN de transferencia de aminoácido (9). Esto da como resultado una síntesis de proteínas propensa a errores, permitiendo que los aminoácidos (aa) incorrectos se ensamblen en un polipéptido que posteriormente se libera para causar daños en la membrana celular y en otros lugares (10).

1.1.4 Macrólidos

El término "macrólido" es acuñado por Woodward en 1957 para describir antibióticos que típicamente consisten en anillos de macrolactama de 14, 15 o 16 átomos con dobles enlaces, diferentes grupos funcionales de sacárido y aminosacárido (11). El componente elemental de las moléculas de macrólidos es el anillo de lactona que consta de 12, 14, 15 o 16 átomos de carbono, combinado con un desoxiazúcar o residuos de aminoazúcar (12, 13). Los macrólidos se pueden dividir según su generación. Los de primera generación, incluyen a la eritromicina, carbomicina, espiramicina, oleandomicina, rosaramicina y josamicina. Los de segunda generación, incluyen a la clartromicina, azitromicina, midecamicina, diritromicina, roxitromicina, fluritromicina, azitromicina, miokamicina y rokitamicina (100). Los antibióticos macrólidos se encuentran entre los antibacterianos más exitosos y se han utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones graves (14). Todos los miembros de la clase de macrólidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al unirse al ARNr 23S de la subunidad ribosómica 50S corriente abajo del centro de peptidiltransferasa que es el sitio catalítico para la formación de enlaces peptídicos (15, 16).

1.1.5 Lincosamidas

Las lincosamidas (LS) son una clase pequeña, aunque importante, de antibióticos en la medicina humana y veterinaria. Estos compuestos son producidos por varias especies de *Streptomyces*. Las lincosamidas constan de tres componentes: un aa (L - prolina sustituida por una cadena de 4'-alquilo) y un azúcar (lincosamina), conectados por un enlace amida. Las LS son principalmente activas contra patógenos Gram-positivos y contra anaerobios Gram-negativos (101). De un gran número de derivados de LS informados hasta la fecha, la clindamicina el análogo clorado de la lincomicina, es la única lincosamida semisintética que está en uso clínico (102). La clindamicina previene la formación de enlaces peptídicos, lo que inhibe la síntesis de proteínas al unirse de manera reversible a las subunidades ribosómicas 50S (103).

1.1.6 Glucopéptidos

Los glicopéptidos (GP) son potentes antibióticos derivados de productos naturales bacterianos y se clasifican en dos clases generales según su estructura heptapeptídica central: tipo I (vancomicina, con un tripéptido N-terminal Leu-β-hidroxi-3-cloroTyr-Asn) y tipo II (teicoplanina, con un tripéptido de hidroxifenilglicina [HPG]-3-cloroTyr-3,5-dihidroxifenilglicina [DHPG] N-terminal) (17). Todos los antibióticos GP inhibe el entrecruzamiento de peptidoglicanos de la pared celular al unirse al extremo acil-D-Ala-D-Ala intermediario de peptidoglicanos que contienen *N*-acetilmuramyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, provocando el cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, la lisis celular (18, 19).

1.1.7 Quinolonas

Las quinolonas se sintetizaron por primera vez en 1949 pero fue hasta el año 1986 que George Leshner afirmó que el compuesto principal para obtener quinolonas que es la cloroquina. Este subproducto presentó una modesta actividad antibacteriana, pero conduce a la síntesis de análogos de quinolonas, incluidas las naftiridonas y el ácido nalidíxico a partir de entonces, se desarrollaron una gran cantidad de derivados y sustancias relacionadas a partir del ácido nalidíxico, algunas de las cuales mostraron propiedades antibacterianas (20, 21). Se utilizan para tratar infecciones del tracto urinario, pielonefritis, gastroenteritis, enfermedades de transmisión sexual, como gonorrea, tuberculosis, prostatitis, neumonía adquirida en la comunidad e infecciones de piel y tejidos blandos, entre otras, causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (22, 23).

1.1.8 Tetraciclinas

Los primeros fármacos del tipo de las tetraciclinas se descubrieron a finales de la década de 1940, aislados de *Streptomyces* spp. La aureomicina (también conocida como clortetraciclina) fue aprobada para su uso en los Estados Unidos en 1948; los otros tres fármacos de clase tetraciclina de primera y segunda generación de uso común (tetraciclina, doxiciclina y minociclina) fueron aprobados en 1954, 1967 y 1971, respectivamente. No se desarrollaron nuevos fármacos de la clase de las tetraciclinas hasta la tercera generación en la década de 2000 (24).

La tetraciclina se ha utilizado ampliamente en medicina humana y veterinaria durante décadas. Aunque su uso en el tratamiento humano ha disminuido en los últimos años, su consumo en entornos agrícolas y ganaderos todavía está muy extendido (25). Las tetraciclinas ejercen su actividad bacteriostática uniéndose al ribosoma bacteriano y, por lo tanto, interfiriendo con la traducción de proteínas (26).

1.2 Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo que ha surgido debido a una combinación de factores. El descubrimiento de la penicilina estuvo directamente relacionado con la inhibición, ejercida por ese agente, del crecimiento de colonias de *estafilococos*. Sin embargo, la posterior resistencia de este organismo a la penicilina, así como a otros agentes, ha marcado la historia en la era de los antibióticos (27).

La entrada de los antibióticos a mediados del siglo XX en la medicina redujo significativamente la morbilidad y mortalidad por infecciones bacterianas, pero las bacterias patógenas no fueron erradicadas, sino que se volvieron controlables (59).

Existe un hecho indiscutible de que el uso irracional de antibióticos junto a la alta tasa de mutación espontánea y recombinación genética de las bacterias, han promovido la proliferación, acumulación y distribución generalizada de bacterias multidrogaresistentes (MDR) (46, 47, 48, 49, 50). Entre las causas más comunes del mal uso de medicamentos se encuentra la automedicación, polifarmacia (uso simultáneo o excesivo de varios medicamentos), uso inapropiado de antibióticos, uso excesivo de medicamentos inyectables y prescripción de medicamentos sin seguir las guías de práctica clínica pertinentes (28, 54). Además, no se puede exentar el uso excesivo de antimicrobianos en el sector agrícola o agropecuario; por ejemplo, en los animales de granja se emplean antibióticos para prevenir infecciones y esta práctica está directamente relacionada con la aparición de bacterias MDR (51). Alrededor del 65 % de todos los antibióticos utilizados para el tratamiento humano (incluidas las tetraciclinas y las penicilinas), se comercializan para uso animal sin ninguna restricción (29). Por lo tanto, las que solían ser infecciones bacterianas fácilmente tratables se están volviendo mortales (30).

El aumento global progresivo y la diseminación de bacterias MDR representan una enorme amenaza para los humanos en la actualidad y una preocupación principal para la salud pública y los sistemas de atención médica modernos (31, 60). Comparando las infecciones causadas por bacterias susceptibles, las causadas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos se asocian con una mayor incidencia de mortalidad y una estancia hospitalaria prolongada (32). En 2019, se estimó que alrededor de 4,95 millones de muertes estaban asociadas con la resistencia a los antimicrobianos, con una estimación que sugiere que causarán 10 millones de muertes por año en todo el mundo para 2050, superando las muertes por cáncer (33, 57, 75)

Por lo anterior, en las últimas dos décadas, la resistencia a los antimicrobianos se convirtió en una amenaza global para los sistemas de salud pública en el mundo (43). Desde la era de los antibióticos, su descubrimiento proporcionó beneficios para la salud humana, sin embargo, el uso indebido y el abuso de los antimicrobianos en la medicina veterinaria, agrícola y humana han acelerado el creciente fenómeno mundial de la resistencia (34, 117).

Por lo tanto, la creciente prevalencia de organismos resistentes a los antibióticos es un problema relevante que ha sido reconocido por varias agencias internacionales, incluidas, entre otras, la Organización Mundial de la Salud, el Banco Mundial y las Naciones Unidas (52).

1.3 Bacterias de importancia medica

Debido al aumento alarmante de bacterias MDR, la OMS publicó en 2017 la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, describiendo doce familias bacterianas que representan la mayor amenaza para la salud humana, y que son responsables de muchas infecciones nosocomiales (55). La lista clasifica los patógenos en tres niveles según la urgencia del desarrollo de nuevos antibióticos. El primer grupo representa a los patógenos de prioridad crítica, que incluye *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*). El segundo grupo es un grupo de alta prioridad que incluye a los patógenos:

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae* y *Neisseria gonorrhoeae*. El último grupo contiene patógenos de prioridad media como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp.* (35, 36, 56).

Otro patógeno importante que no fue incluido en la lista, porque es objeto de otros programas específicos, es el bacilo de la tuberculosis que ha infectado de forma latente a un tercio de la población mundial y cuya resistencia al tratamiento tradicional ha ido en aumento en los últimos años (63). La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa y contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), un patógeno notablemente exitoso que infecta principalmente los pulmones, lo que lleva al síndrome clásico de TB pulmonar (62). Además, todos los demás órganos y tejidos, incluidos los ganglios linfáticos, el cerebro, los riñones y la columna vertebral, pueden verse afectados en un trastorno llamado TB extrapulmonar (61, 64).

Hay diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos utilizados por los patógenos ESKAPE (es decir, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), que incluyen la inactivación enzimática, la modificación de los objetivos de los fármacos, el cambio de la permeabilidad celular a través de la pérdida de porinas o el aumento de la expresión de las bombas de expulsión y la protección mecánica proporcionada por la formación de biopelículas. Esto da como resultado la escasez de agentes terapéuticos potenciales en proceso que genera preocupaciones reales, pero debería impulsar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos o nuevos enfoques para controlar las infecciones que causan (58).

Según la resistencia a los antibióticos, las bacterias multidrogaresistentes se clasifican de la siguiente manera: la resistencia a múltiples fármacos (MDR); significa que es resistente a tres o más clases de antimicrobianos. La resistencia extrema a los medicamentos (XDR), implica que es resistente a un agente antimicrobiano en todas las clases de antimicrobianos excepto dos o menos y Pandrogo resistente (PDR), es un término utilizado para describir una cepa

bacteriana que es resistente a múltiples clases de antibióticos, lo que la hace extremadamente difícil de tratar. (42, 44). Todas las formas de resistencia a los antibióticos son preocupantes y subrayan la importancia de la prevención y el control de la resistencia a los antibióticos.

1.4 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas pequeñas, generalmente compuestos de 12 a 80 residuos de aminoácidos, pueden tener estructuras secundarias de alfa hélice o lámina plegada beta, con características anfipáticas que les permiten ser soluble en medios acuosos, junto con una carga neta positiva típicamente de +2 a +13 (41, 64, 66, 69, 70). La naturaleza catiónica se atribuye a la presencia de residuos de lisina (K) y arginina (R) (67). Su actividad principal es inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras y protozoos (65, 71, 39).

La gramicidina, es el primer PAM descubrió, en 1939 a partir de la bacteria del suelo *Bacillus brevis* y muestra actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra bacterias Gram-positivas (68). Hasta la fecha, hay 3569 péptidos antimicrobianos registrados en la base de datos de péptidos antimicrobianos (<https://aps.unmc.edu/>; consultado el 13 de enero del 2023).

Los PAMs se conservan evolutivamente en el genoma y son producidos por todas las formas de vida, desde los procariontes hasta los humanos y son parte del sistema de defensa inmune innatos que luchan contra las infecciones bacterianas invasivas (38, 40, 78, 86).

1.4.1 Péptidos antimicrobianos del veneno de alacrán

Los alacranes son arácnidos depredadores que por medio de un aguijón situado al final de su cola inoculan un veneno que paraliza a pequeños artrópodos (principalmente insectos) para alimentarse. Estos invertebrados han vivido por más de 450 millones en nuestro planeta y los componentes de su veneno han evolucionado durante todo este tiempo, por ejemplo, las toxinas que afectan a canales iónicos, se convirtieron a toxinas altamente especializadas, que son

empleadas para defenderse de los depredadores y capturar a sus presas (81, 83, 89). La composición de su veneno es altamente compleja y se han identificado, toxinas, péptidos, enzimas, mucoproteínas, aminoácidos libres, nucleótidos, lípidos, aminas, componentes heterocíclicos, sales inorgánicas y otras sustancias desconocidas (82, 84, 85). Como se mencionó antes, las toxinas se emplean para la depredación y defensa contra depredadores, algunas de estas modulan la función de los canales iónicos y los receptores en las membranas celulares excitables, y su efecto es responsable de los múltiples síntomas conocidos del envenenamiento. Los péptidos aislados del veneno con actividad antimicrobiana, son uno de los sistemas de defensa que tiene el alacrán contra patógenos invasores del compartimento donde se encuentran sus glándulas venenosas. Se conoce menos del 1% de los 100, 000 péptidos que se estima que son producidos por los alacranes (109, 110). Hasta el momento, los péptidos del veneno del alacrán son los compuestos PAMs más estudiados, debido a su actividad de amplio espectro, a su eficiente acción a bajas concentraciones y a su bajo potencial de inducir resistencia en la célula blanco (88).

El primer PAM de alacrán nombrado como defensina de alacrán (3S-S) se reportó en 1993. Este péptido se aisló del alacrán *Leiurus quinquestriatus* y su actividad antimicrobiana se evaluó debido a que se encontró similitud estructural de su secuencia con aquellas de las defensinas de insectos, las cuales presentan actividad antimicrobiana (80).

Estos péptidos se dividen generalmente en dos grupos los que contienen cisteína y los que no la contienen. Los PAMs que contienen cisteína, también conocidos como defensinas, contienen tres o cuatro puentes disulfuro en sus estructuras y, por lo general, forman una α hélice estabilizada con cisteína y un pliegue de hoja β . La mayoría de los PAMs derivados del veneno de alacrán no contienen cisteína, estos PAMs se pueden dividir en tres subfamilias según la longitud de su secuencia: A) Péptidos de cadena corta (< 18 aminoácidos) entre ellos podemos encontrar a IsCT, IsCT2, meucin-13, meucin-18, BmKn22, VmCT1, VmCT2, StCT2, hp1404, stigmurin y ctriposin (87, 91, 105). El PAM IsCT consta de 13 residuos de aminoácidos, este

péptido fue aislado del veneno del alacrán *Opisthacanthus madagascariensis*, no contiene cisteínas, tiene una estructura helicoidal y demostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (104, 106). Otro ejemplo de PAMs de cadena corta es el péptido BmKn22, el cual tiene una actividad inhibitoria de la formación de biopelículas, tanto en formación como preformadas de *Pseudomonas aeruginosa* (112); B) Péptidos de cadena intermedia (20 a 35 aminoácidos) dentro de los cuales podemos encontrar a: HsAp, HsAp2, HsAp3 y HsAp4 que están constituidos por 29 residuos de aminoácidos y que fueron aislados de la glándula venenosa de *Heterometrus spinifer* (107, 108); C) Péptidos de cadena larga (> 35 aminoácidos) La escorpina es un péptido catiónico aislado del alacrán *Pandinus imperator* que consta de 75 residuos de aminoácidos, tres puentes disulfuro y posee una estructura única el cual posee actividades antibacterianas y antiplasmodiales (118). Otro péptido es la serrulina este péptido posee en su estructura 37 residuos de aminoácidos, es péptido posee una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos filamentosos y levaduras, además no presenta citotoxicidad frente a los eritrocitos humanos a altas concentraciones (111).

1.4.2 Mecanismo de Acción de la PAMs

Los péptidos antimicrobianos se han convertido en una clase atractiva de antimicrobianos que matan a las bacterias a través de la perturbación o la ruptura de la membrana plasmática, ocasionado por las características anfipáticas y carga positiva de los péptidos. lo anterior les permite unirse a la membrana bacteriana, dando como resultado una pérdida de control sobre los flujos de iones a través de la membrana y ocasionando la muerte de la bacteria (73, 76)

La fuerza impulsora inicial por la cual las moléculas peptídicas actúan contra las bacterias es la atracción electrostática ejercida por las cargas opuestas entre los PAMs y las membranas bacterianas. La carga catiónica de los PAMs es dada por los residuos de aminoácidos arginina y lisina, mientras que las cargas negativas de las membranas bacterianas son conferidas principalmente por lípidos como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y lipopolisacáridos (LPS) en el caso de bacterias Gram-negativas o ácido lipoteicoico (LTA) en el caso de bacterias Gram-

positivas. Además, la interacción hidrófoba con las membranas bacterianas induce el plegamiento de los PAMs, lo que contribuye a las propiedades antibacterianas de estos péptidos. La carga positiva de los PAMs también proporciona una forma de diferenciar células procariontas de eucariotas, dado por la alta abundancia de lípidos neutros como fosfatidilcolina, colesterol, esfingomiélin que le confiere una superficie zwitteriónica a las membranas celulares de los mamíferos, lo que conduce a una atracción más débil entre los péptidos catiónicos y las células huésped, que es el origen de la selectividad celular observada de algunos PAMs (72, 77, 113, 114).

Hay una serie de mecanismos propuestos por los cuales los PAMs ocasionan esta disrupción en la membrana bacteriana: Barril-pentagrama, Poro toroidal y Modelo de alfombra (figura 1). En el mecanismo de Barril-pentagrama la región hidrofóbica se alinea hacia la porción lipídica, y la región hidrofílica forma la porción interior del poro (115). En el Modelo de alfombra, los péptidos se unen electrostáticamente a la membrana celular cargada negativamente de tal manera que se extienden por todas partes. Por el contrario, los péptidos en el mecanismo de Poro toroidal están sin un orden insertados en la membrana causando un desequilibrio en esta (116).

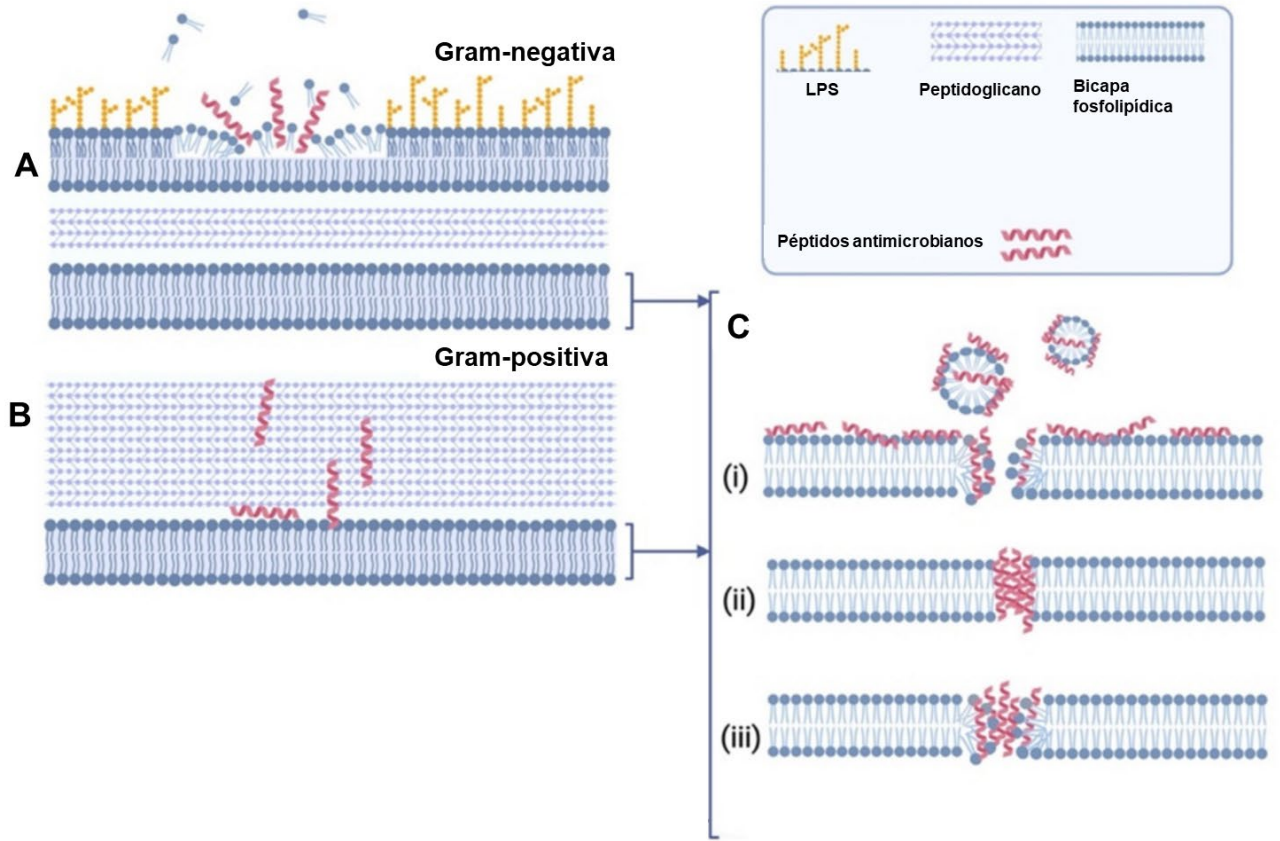


Figura 1. Mecanismos de acción de los PAMs. En presencia de bacterias Gram-negativas (**A**), los PAMs deben cruzar la membrana fosfolipídica externa para posteriormente, atravesar la capa de peptidoglicano antes de alcanzar la membrana interna. En las bacterias Gram-positivas (**B**), los PAMs primero deben atravesar una gruesa pared celular de peptidoglicano antes de acceder a la membrana citoplasmática. Una vez que alcanzan la bicapa fosfolipídica, inducen la perturbación a través de la formación de poros por medio de alguno de estos mecanismos (**D**): (i) Modelo de alfombra, (ii) Barril-pentagrama o (iii) o modelo de Poro toroidal dependiendo de la composición peptídica (Vanzolini *et al.* 2021) (74).

2. ANTECEDENTES

Li *et al.* identificaron un nuevo PAM catiónico, Hp1404 aislado del veneno del alacrán *H. petersii* donde este péptido demostró una potente actividad antimicrobiana específica contra bacterias Gram-positivas (120).

Harrison *et al.* caracterizaron tres PAM del veneno de *Scorpion Maurus palmatus* y demostraron que Smp24 como el Smp43 tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, alterando las membranas bacterianas (92).

Fan *et al.* identificaron el PAM Ctriporin aislado de veneno del alacrán *Chaerilus tricostatus* y evidenciaron una actividad antimicrobiana eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Candida albicans*, y su mecanismo de acción es a través de lisis celular en patógenos resistentes a los antibióticos (147).

Ramírez *et al.* evaluaron las actividades antimicrobianas de 16 PAM naturales y artificiales derivados del veneno del alacrán endémico de Australia *Urodacus yaschenko* frente a bacterias *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. *M. luteus* obteniendo una inhibición completa en presencia de D10 o D11 a 0,25 µM (148).

Kim *et al.* diseñaron nuevos péptidos análogos basados en Hp1404 aislados del veneno del alacrán *Heterometrus petersii* y demostraron que Hp1404-T1e era el análogo con la actividad más potente contra las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, sin mostrar actividad hemolítica, ni toxicidad hacia los glóbulos rojos de ratón o las células HaCaT (149).

Gaomin *et al.* identificaron el PAM Marcin-18 del veneno de *Mesobuthus martensii*, demostrando actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (150).

Amorin *et al.* (2019). diseñaron los análogos StigA25 y StigA31 a partir del PAM *Stigmurin* del alacrán *Tityus stigmurus* y mostraron que estos análogos poseían una

actividad antimicrobiana en bacterias Gram-positivas importantes desde el punto de vista médico, incluso superior a la presentada por *Stigmurin* (151).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Luna *et al.* Realizaron el transcriptoma completo de la glándula del veneno de alacrán *Urodacus yaschenkoi* identificando un total de 210 secuencias nucleotídicas diferentes que codifican 111 toxinas, péptidos y proteínas en el veneno de *Urodacus yaschenkoi* y entre los péptidos se identificaron Uy234, Uy192 y Uy17 (119).

Cesa-Luna, evaluó la estructura, actividad hemolítica y bactericida de cuatro PAMs sintéticos del alacrán *Urodacus yaschenkoi* (Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP). Donde demuestra que los PAMs poseen una actividad antimicrobiana ante diferentes cepas bacterianas. El péptido Uy234 evidencio una potente actividad inhibitoria ante aislados clínicos MDR de *Streptococcus*, de igual manera QnCs-BUAP. También efectúa la combinación de QnCs-BUAP con los demás péptidos, donde la combinación de Uy234 y QnCs-BUAP incrementó la actividad bactericida contra *Burkholderia cepacia*, lo que sugiere un efecto sinérgico ya que *Burkholderia cepacia* es resistente a la exposición de los péptidos de forma independiente. (71).

3. JUSTIFICACIÓN

La aparición de multirresistencia a antibióticos (MDR) en bacterias patógenas se ha vuelto alarmante en las últimas décadas. El uso irracional de antibióticos a promovido la proliferación, y distribución de estas bacterias MDR que provocan enfermedades infecciosas en todo el mundo. Es por ello que en la actualidad existen terapias farmacológicas limitadas dirigida a estos patógenos, con diversos efectos adversos y cada vez menos eficaz, limitando las opciones terapéuticas en el tratamiento de infecciones ocasionadas por estas bacterias.

Es por ello que se ha vuelto de gran importancia la búsqueda de agentes terapéuticos con eficacia y baja toxicidad. En los últimos años se ha evaluado la actividad antimicrobiana de diversos péptidos de diferentes especies de alacranes

contra bacterias provenientes de aislados clínicos, donde se muestran una actividad antimicrobiana significativamente rápida, inespecífica y de múltiples impactos, lo que más resulta es la baja probabilidad de que las bacterias presenten resistencia ante estos péptidos. Debido a lo cual, en este trabajo experimental se evaluaron los péptidos Uy234, aislado del veneno del alacrán australiano *Urodacus yaschenkoi*, y el péptido QnCs-BUAP, péptido consenso diseñado en el laboratorio de ecología molecular microbiana, contra aislados clínicos MDR con el fin de aportar una opción terapéutica para infecciones bacterianas de difícil tratamiento debido a la multiresistencia a antibióticos.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra aislados bacterianos de interés clínico

4.1. Objetivos particulares

- Seleccionar diversas bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas de interés clínico.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas de interés clínico.
- Evaluar *in vitro* la actividad sinérgica antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP contra bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas de interés clínico.
- Evaluar la actividad hemolítica de la combinación de los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP en eritrocitos humanos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Síntesis y resuspensión de los PAMs

Los PAMs fueron sintetizados por la empresa Biomatik (Ontario, CA) con amidación en el sitio C-terminal y purificados mediante HPLC con una pureza mayor al 95%. Los PAMs se encontraban en estado liofilizado, por lo que tuvieron que resuspenderse en acetonitrilo:H₂O en proporción 1:4, dependiendo de su solubilidad, para evitar la formación de precipitados. De acuerdo con el test de solubilidad realizado por Biomatik, los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP fueron

resuspendidos en 10 mL de acetonitrilo-H₂O (1:4) obteniendo una concentración final de 503.67 μ M y 711.38 μ M respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los PAMs.

Péptido	Secuencias de aa	Peso molecular (Da)	Longitud de (aa)	Carga neta
Uy234	FPFLLSLIPSAISAIKRL-NH ₂	1985.46	18	+3
QnCs-Buap	FFSLIPSLISGLI-NN ₂	1405.72	13	+1

5.2 Cepas utilizadas

En este trabajo se evaluaron las siguientes cepas bacterianas: *Salmonella entérica* SL 1344, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Bacillus subtilis* 168, *Enterococcus mundtii* 43166, *Enterococcus faecalis* 24212, *Enterococcus gallinarum* 55-1228 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* 6N3, *Staphylococcus aureus* 18F1 ambos aislados clínicos (MDR) (Cepas donadas por el Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.), *Mycobacterium tuberculosis* 18ex, *Mycobacterium tuberculosis* 30ex y *Mycobacterium tuberculosis* 36ex aislados clínicos (MRD) (Cepas donadas por el Centro de Investigación de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.)

5.3 Ensayo de actividad hemolítica

La toxicidad de la combinación de los péptidos para el sistema de los mamíferos se evaluó en función de la prueba hemolítica mediante la medición de la hemoglobina liberada de los glóbulos rojos rotos, se utilizaron eritrocitos de humano provenientes de un donador sano. Las muestras fueron recolectadas por venopunción y cuantificadas en un citómetro de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotech) obteniendo una concentración celular de 4.4×10^6 células/mL. Los eritrocitos recolectados fueron lavados con buffer PBS 1X pH 7.4 a 5000 rpm durante 5 minutos. Una vez realizado el lavado, se colocaron 195 μ L de la suspensión celular en tubos Eppendorf y se agregaron 5 μ L de las diferentes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 μ M) de los PAMs evaluados en los ensayos de CMB. Los tubos se incubaron

durante 1 hora a 37 °C. Como control positivo se utilizó Triton X-100 al 10% (100% de lisis), y como control negativo, buffer 1X PBS. Después del periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, los sobrenadantes se trasladaron a microplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (BIOTEK®/KC4TM) (119). Las muestras se evaluaron por triplicado y la actividad hemolítica se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A \text{ peptido})}{(A \text{ Triton X} - 100)} \times 100$$

5.4 Actividad antimicrobiana

5.4.1 Difusión en disco y pozo

La actividad antimicrobiana de Uy234 y QnCs-Buap se analizó ante bacterias sensibles y resistentes a antibióticos mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer en disco y difusión en pozo de agar de acuerdo con las pautas de Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Para la difusión en pozo, los cultivos bacterianos se extendieron en placas de agar Luria Bertani, luego se perforaron los pozos en las placas de agar y se colocaron en los pozos 50 µL de los péptidos a diferentes concentraciones. La actividad antibacteriana se detectó después de una incubación de 24 horas a 37 °C. La presencia de una zona de aclaramiento en las placas, se usó como indicador de la naturaleza antimicrobiana de los péptidos. Como control positivo se usó CinnAcar (Extracto de canela al 15%) y, como controles negativos, 1:4 acetonitrilo:agua y agua estéril. Se llevaron a cabo tres réplicas de cada prueba de actividad antimicrobiana.

5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Para este ensayo se realizó la metodología de microdilución en caldo de acuerdo con Li *et al.*, (120) con ligeras modificaciones. Se realizaron diluciones dobles del péptido Uy234 y del péptido QnCs-BUAP en microplacas de 96 pozos (Costar® 3595). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los péptidos se determinó por triplicado utilizando el método de microdilución en una microplaca estéril de 96 pozos, seguido del protocolo con algunas modificaciones. Brevemente, las bacterias

analizadas se inocularon en 5 ml de caldo Luria (Luria Bertani LB) se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm. Los cultivos de toda la noche se volvieron a cultivar en caldo nutritivo y se incubaron en las mismas condiciones. Una vez que alcanzo la D.O. DE 600, los cultivos se diluyeron hasta que la concentración final alcanzó aproximadamente 5×10^5 CFU/mL y se usaron para las bacterias analizadas.

Se prepararon en los pocillos diluciones en serie de los péptidos diluidos en caldo nutritivo y con volumen final de 100 µL en cada pocillo con concentraciones que oscilaban entre 3.12 a 100 µM. Posteriormente, se agregaron 5 µL de las cepas bacterianas a evaluar a los pocillos y se incubaron a 37 °C durante 16–24 h. Tras la incubación, se determinó la DO₆₀₀ de cada pocillo. La concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano se definió como la concentración mínima inhibitoria, MIC. Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó un replicador metálico de 8 x 6 (Sigma-Aldrich) con el cual se recolectaron las muestras de los pozos y se sellaron en placas de agar LB. La CMB se estimó como la concentración más baja que logro la muerte de la bacteria total del crecimiento bacteriano. Los péptidos fueron evaluados por triplicado.

5.4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Mycobacterium tuberculosis*

El ensayo de microdilución para *Mycobacterium tuberculosis* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Palomino *et al.* con algunas modificaciones (121). Brevemente, se dispensaron 100 µl de caldo Middlebrook 7H9 en cada pocillo de una placa estéril de 96 pocillos, y se prepararon diluciones seriadas dobles de cada péptido directamente en la placa con concentraciones que oscilaban entre 3.12 a 100 µM con un volumen final de 95 µl en cada poso. Se añadieron 40 microlitros de inóculo a cada pocillo. También se incluyó un control de crecimiento y un control estéril para cada aislado. Se añadió agua estéril a todos los pocillos del perímetro para evitar la evaporación durante la incubación. La placa se tapó, se selló en una bolsa de plástico y se incubó a 37°C en atmósfera normal por 14 días. Después de 14 días de incubación, se agregaron 30 µl de la solución, indicadora de viabilidad celular, resazurina (la resazurina permite realizar pruebas colorimétricas rápidas de

susceptibilidad a diversos compuestos contra aislados de micobacterias en condiciones aeróbicas, en las que la forma oxidada azul no fluorescente del tinte se reduce en el entorno de las células vivas para formar resorufina, que es rosa y fluorescente) a cada pocillo y la placa se incubó durante la noche. Un cambio de color de azul a rosa indicó el crecimiento de bacterias, y la CMI se definió como la concentración más baja del péptido que impidió este cambio de color.

5.4.4 Evaluación de la actividad sinérgica antimicrobiana

La acción antimicrobiana combinada de los AMP y otros compuestos antimicrobianos se evaluó en condiciones similares a las del ensayo de microdilución (138). El componente A (péptido) de la combinación se diluyó a lo largo de las filas de la placa partiendo de una concentración de 6.25 hasta .097 μM , mientras que el componente B (antibiótico), se diluyó en las columnas, creando así la variedad de mezclas con diferentes concentraciones que oscilan 2.75 hasta 0.08 μM de compuestos probados. Se añadieron 95 μL de las soluciones correspondientes de los componentes A y B a cada pocillo de la placa. Por tanto, todos los pocillos contenían 95 μL de soluciones de compuestos antimicrobianos (solos o en combinación). El mismo volumen de suspensión bacteriana, preparado como se describe para el ensayo de microdilución, se añadió a cada pocillo. Los resultados se registraron después de la incubación durante la noche, se determinó la DO_{600} de cada pocillo. La concentración más baja que podía inhibir el crecimiento bacteriano se definió como MIC.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad citotóxica de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP contra eritrocitos humanos

Para evaluar la actividad citotóxica de los péptidos antimicrobianos, se evaluó la actividad hemolítica de los péptidos frente a eritrocitos humanos. Las actividades hemolíticas de los péptidos se observan en la figura 1, la combinación de los péptidos demostró un bajo porcentaje hemolítico, incluso a la concentración de 100 μM el porcentaje hemolítico no fue mayor a 3.5%, por lo tanto, estos péptidos demuestran una baja actividad hemolítica contra eritrocitos humanos.

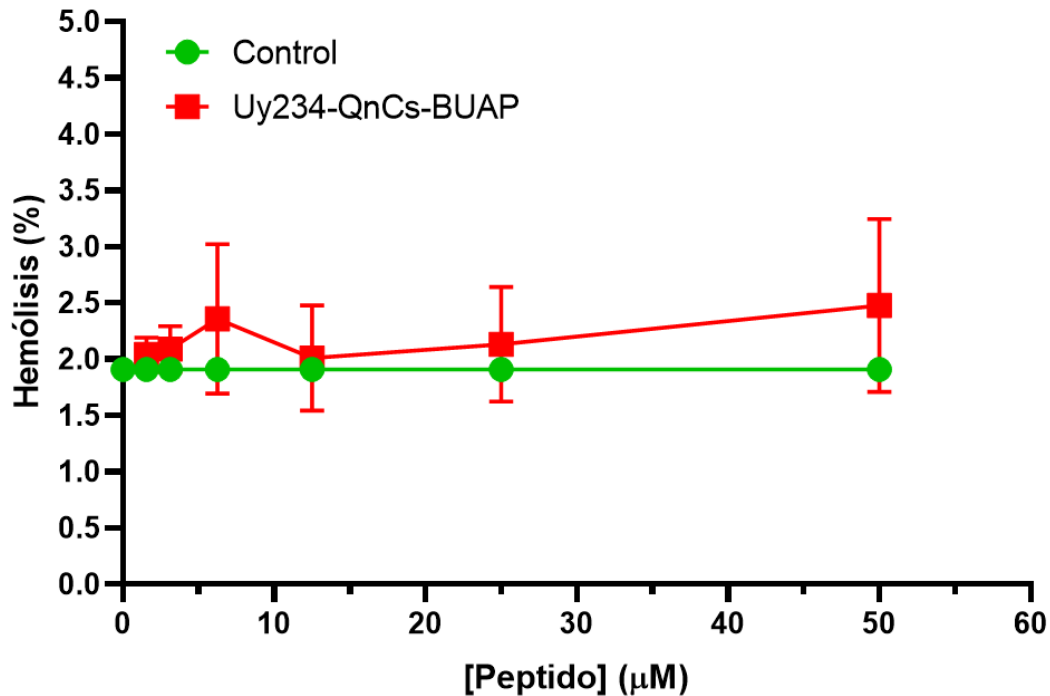


Figura 2. Actividad hemolítica de los péptidos Uy234 + QnCs-BUAP contra glóbulos rojos humanos después de 1 h de incubación, como control positivo se utilizó Tritón X-100 al 10% (100% de lisis), y como control negativo, buffer 1X PBS (0% de lisis).

6.2 Actividad en ensayo por difusión en disco de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos, se realizó ensayos por difusión en disco y se obtuvieron los siguientes resultados. Los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP no mostraron una actividad visible ante *Salmonella entérica* SL 1344, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 a las diferentes concentraciones evaluadas de los péptidos a excepción de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 donde se observa un ligero halo de inhibición, no significativo, pero diferente a las demás cepas a una concentración de 503.67 μM para Uy234 y 711.38 μM para QnCs BUAP (ver Figura 3).

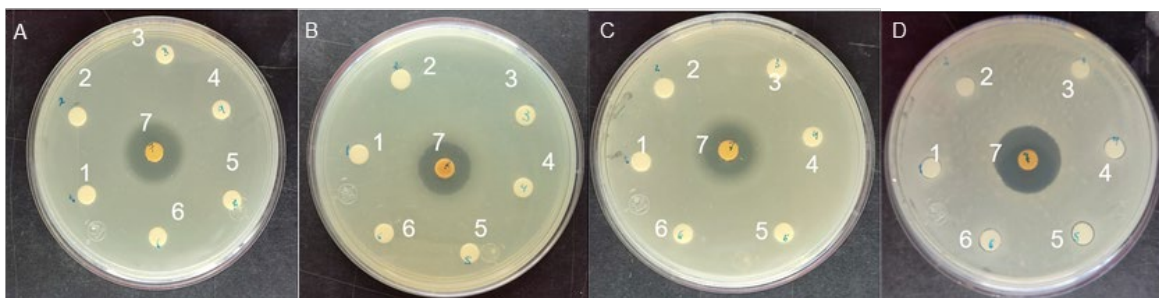


Fig. 3 Actividad antimicrobiana de los péptidos utilizando el método de difusión en disco. A) *S. enterica* SL1344, B) *A. baumannii* ATCC 17978 C) *K. pneumoniae* ATCC 700603 D) *S. aureus* ATCC 29213. Pozos 1. Uy234 (503.67 μ M) 2. Uy234 (100 μ M) 3. QnCs-Buap (711.38 μ M) 4. QnCs-Buap (100 μ M) 5. Agua estéril 6. Agua-Acetonitrilo (1:4) 7. CinnAcar (15%.)

6.3 Actividad antimicrobiana de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP en ensayo por difusión en pozos

Los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP se evaluaron por el método de difusión en pozo donde nuevamente no se observó actividad contra *Salmonella entérica* SL1344, *Acinetobacter baumannii* 17978 y *Klebsiella pneumoniae* 700603, pero si en la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con las concentraciones 711.38 μ M para QnCs BUAP y 503.67 μ M para Uy234 con halos de inhibición de 11 mm para QnCs-Buap y 12 mm para Uy234. En la concentración de 100 μ M únicamente se produjo un halo de inhibición, de 8 mm, por parte de Uy234 (Figura 4D)., con base a este resultado se probó una nueva cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) y dos aislados clínicos MDR *Staphylococcus aureus* 6N3 y *Staphylococcus aureus* 18F1 donde se observa una actividad por parte del péptido Uy234 en todas las cepas, produciendo un halo de inhibición 12 mm en la concentración máxima del péptido, en la concentración de 100 μ M de este mismo, formó un halo de inhibición de 9mm (Figura 5). Esta mayor actividad ejercida por el péptido Uy234 podría ser el resultado de que posee una mayor carga positiva.

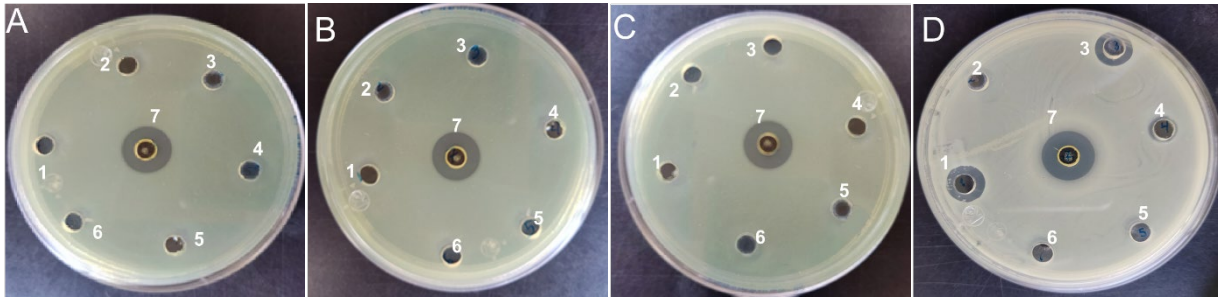
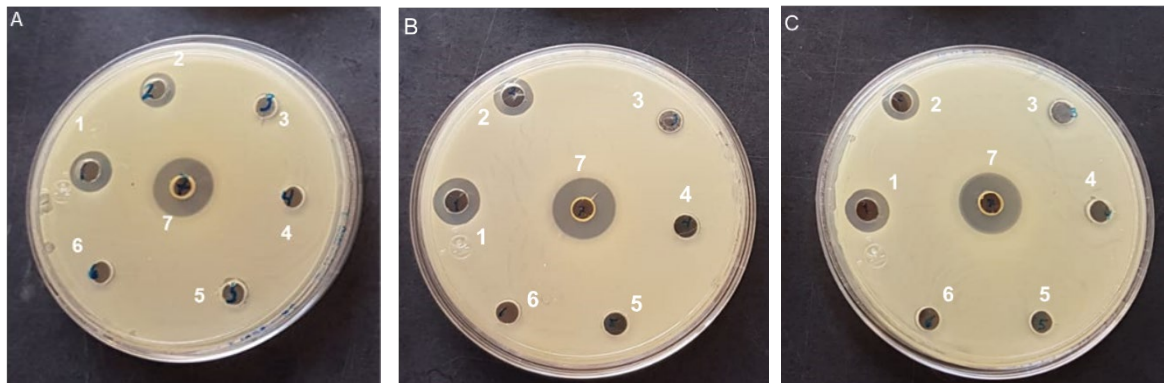


Fig. 4 Actividad antimicrobiana de los péptidos utilizando el método de difusión en pozos. A) *S. enterica* SL1344, B) *A. baumannii* ATCC 17978 C) *K. pneumoniae* ATCC 700603 D) *S. aureus* ATCC 29213. Pozos 1. QnCs-Buap (711.38 μ M) 2. QnCs-Buap (100 μ M) 3. Uy234 (503.67 μ M) 4. Uy234 (100 μ M) 5.- Agua estéril 6. Agua-Acetonitrilo (1:4) 7.- CinnAcar (15%).

Fig. 5 Actividad antimicrobiana de los péptidos



utilizando el método de difusión en pozos y cepas

de *Staphylococcus aureus*. A) *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 MRSA, B) *Staphylococcus aureus* 6N3, C) *Staphylococcus aureus* 18F1. Pozos 1. Uy234 (503.67 μ M) 2. Uy234 (100 μ M) 3.- QnCs-Buap (711.38 μ M) 4.- QnCs-Buap (100 μ M) 5. Agua estéril 6. Agua-Acetonitrilo (1:4) 7. CinnAcar (15%).

6.4 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del péptido Uy234

Con el objetivo de determina la concentración mínima inhibitoria (CIM) de las cepas *S. enterica* SL 1344, *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus aureus* 6N3, *Staphylococcus aureus* 18F1, *Bacillus subtilis* spp.,

Enterococcus gallinarum 55-1228, *Enterococcus mundtii* E-5 ATCC, *Enterococcus faecalis* 24212 se realizaron ensayos de microdilución en placas de 96 posos evaluando diferentes concentraciones de los péptidos que oscilan de 3.12 hasta 100 μM y realizando cada ensayo por triplicado para la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó replicando la placa de 96 posos del ensayo de microdilución a una placa de agar donde se determinó a que concentración de los péptidos mato a las bacterias donde se obtuvieron los siguientes resultados.

El péptido QnCs-Buap no demostró una actividad antimicrobiana importante contra ninguna de las cepas. El péptido Uy234 no demostró una disminución significativa en el crecimiento contra *Salmonella entérica* SL1344, *Klebsiella pneumoniae* 700603 *Enterococcus gallinarum* 55-1228, *Enterococcus mundtii* E-5 ATCC y *Enterococcus faecalis* 24212, pero si contra *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 inhibiendo el crecimiento a una concentración 50 μM y *Bacillus subtilis* spp. a una concentración de 25 μM . Uy234 mostró una actividad antimicrobiana superior ante todas las cepas de *Staphylococcus aureus* inhibiendo el crecimiento a una concentración de 6.25 μM .

Las únicas cepas donde se presentó una actividad bactericida por parte del péptido Uy234, fueron todas las cepas de *Staphylococcus aureus* a una concentración 12.5 μM y *Bacillus subtilis* spp. a una concentración 50 μM (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los péptidos Uy234 y QnCs-Buap.

Cepas Bacterianas	Uy234 [μM]		QnCs-Buap [μM]	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. enterica</i> SL 1344	>100	>100	>100	>100
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	50	>100	>100	>100

<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	6.25	12.5	>100	>100
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	6.25	12.5	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 6N3	6.25	12.5	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 18F1	6.25	12.5	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> 168.	25	50	>100	>100
<i>Enterococcus gallinarum</i> 55-1228	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus mundtii</i> E-5 ATCC	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus faecalis</i> 24212	>100	>100	>100	>100
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 18ex	>100	-	>100	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 30ex	>100	-	>100	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 36ex	>100	-	>100	-

La concentración de los péptidos evaluadas oscila desde 3.12 hasta 100 [µM]. (>) mayor de la concentración evaluada, (-) sin determinar

6.5 Actividad antimicrobiana de los PAMs Uy234 Y QnCs-BUAP contra *Mycobacterium tuberculosis*

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs BUAP a diferentes concentraciones que oscilan de 3.12 hasta 100 μM , por medio del ensayo de microdilución con resazurina, tanto el péptido Uy234 como QnCs-BUAP no presentan una actividad contra los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* 18ex, 30ex y 36ex y esto fue corroborado por el cambio de coloración de la reazurina a las 2 y 24 hrs posteriores de su colocación en los pozos la coloración inicial fue azul que se tornó color rosa indicando el crecimiento normal de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 6).

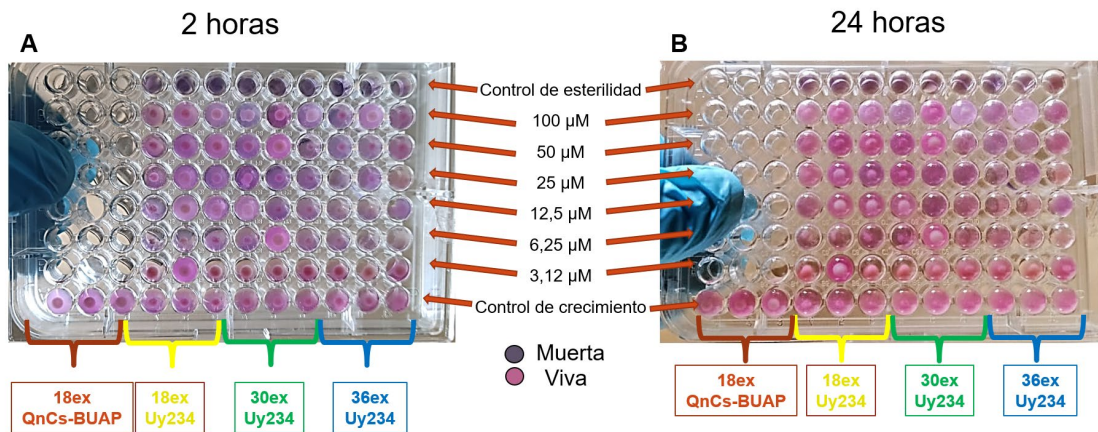


Figura 6. Actividad antimicrobiana de los péptidos Uy234 y QnCs-Buap utilizando el método de microdilución con resazurina. A) coloración después de 2 hrs de exposición a resazurina, B) coloración después de 24 hrs de exposición a resazurina.

6.6 La combinación del péptido Uy234 con un antibiótico no muestra sinergismo

Con el objetivo de determinar la actividad sinérgica de una mezcla péptido/antibiótico, se realizó una combinación el péptido Uy234 con el antibiótico Vancomicina (tratamiento de elección frente a cepas MSRA) para evaluar la actividad antimicrobiana frente a las cepas *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) y los aislados clínicos *Staphylococcus aureus* 6N3, *Staphylococcus aureus* 18F1 ambos MRSA obteniendo estos resultados.

La combinación del péptido Uy234 y vancomicina, no demostró una actividad sinérgica contra ninguna de las cepas evaluadas (Figura 7), las concentraciones iniciales corresponden a la CMI de Uy234 determinada en los ensayos anteriores que fue de 6.25 μM y las CMI de vancomicina reportada por el CLSI 2.75 μM .

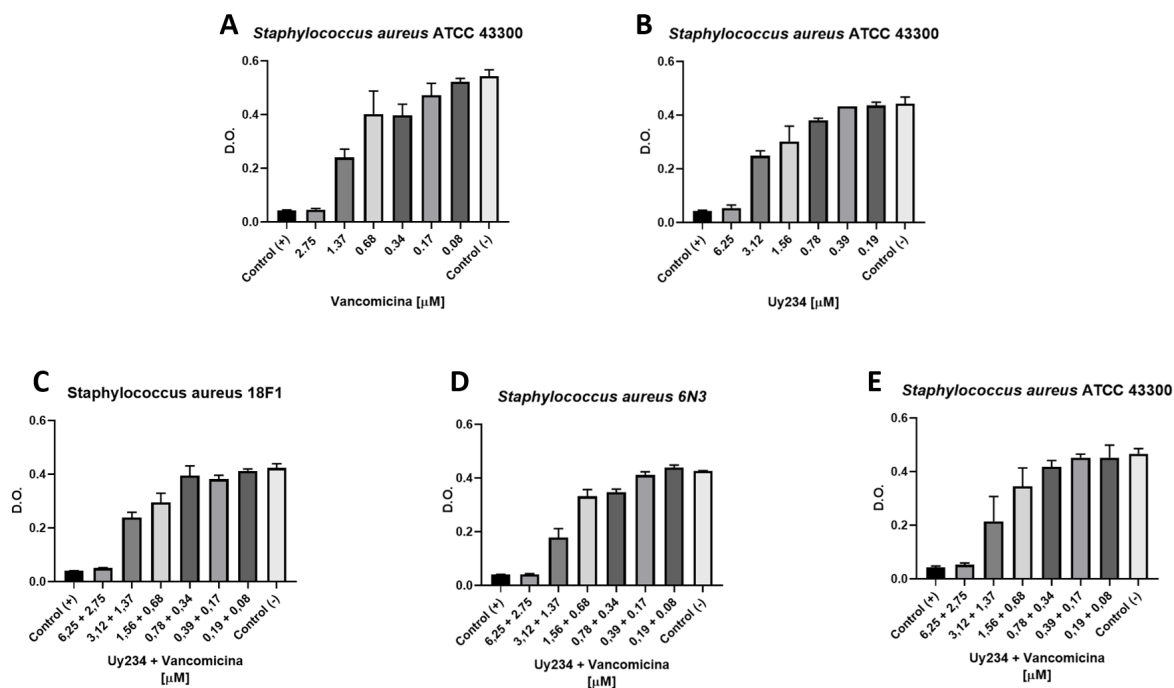


Figura 7. Evaluación del sinergismo de la combinación del péptido Uy234 y vancomicina. A) Actividad antimicrobiana individual de vancomicina contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, B) Actividad antimicrobiana individual del péptido Uy234 contra *Staphylococcus aureus*, C) Actividad antimicrobiana de la combinación de Uy234 y vancomicina contra el aislado clínico *Staphylococcus aureus* 18F1, D) Actividad antimicrobianas de la combinación de Uy234 y vancomicina contra *Staphylococcus aureus* 4330, E) Actividad antimicrobianas de la combinación de Uy234 y vancomicina contra el aislado clínico *Staphylococcus aureus* 6N3.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, el incremento de cepas bacterianas multidrogo-resistentes (MDR) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial (122).

Desafortunadamente, la frecuencia de resistencia bacteriana ha sido superior al desarrollo de nuevos antibióticos lo que, aunado al uso irracional de antibióticos, hace que el tratamiento de infecciones por bacterias MDR sea un verdadero desafío, restringiendo las alternativas terapéuticas. Por lo anterior, la investigación global se centra en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos como los péptidos antimicrobianos (PAMs) (84). Sin embargo, pocos péptidos antimicrobianos aislados del veneno de los alacranes han sido caracterizados y evaluados contra bacterias MDR (89, 124, 125, 126). Con el fin de ampliar el número de PAMs candidatos para posibles tratamientos contra microorganismos multidrogoresistentes (MDR), en el presente trabajo se evaluó la actividad hemolítica y antimicrobiana de dos PAMs sintéticos obtenidos a partir de secuencias reportadas por Luna-Ramírez *et al.* (119) y que sufrieron una modificación la amidación de su residuo C-terminal; Uy234 procedente del veneno del alacrán *U. yaschenkoi* y QnCs-BUAP, el cual es un péptido consenso de péptidos de alacrán de cadena corta.

Como primer paso, se evaluó el porcentaje de hemólisis de la combinación Uy234-QnCs-BUAP. Como resultado tenemos que provocaron menor al 4% de hemólisis en eritrocitos humanos, siendo este menor que el reportado por Cesa-Luna (71) cuando evaluó dicha actividad de estos péptidos por separado, y que además es menor que el obtenido por Parente *et al.* al evaluar los péptidos StigA6 y StigA16 derivados igualmente del veneno de alacrán (128), indicando así que la combinación de nuestros péptidos no representa un riesgo importante en su uso.

Por otra parte, determinamos la actividad antimicrobiana de Uy234 y QnCs-BUAP utilizando los métodos de disco y pozo descritos por Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), lo que nos indicaría si nuestros péptidos tienen un efecto bacteriostático, para ello se utilizaron tanto cepas bacterianas ATCC como cepas provenientes de aislados clínicos. En estos ensayos obtuvimos diferentes resultados aun cuando se utilizaron las mismas concentraciones de péptidos, siendo por el método de pozo en donde se observó una mejor actividad del péptido Uy234, y no así del QnCs-BUAP, pudiendo deberse principalmente a que por pozo los péptidos no se someten a interacciones electrostáticas con los iones hidroxilo

(-OH) de las moléculas de glucosa que conforman a la celulosa lo que retiene al péptido en la superficie del papel filtro por su naturaleza catiónica como estaría sucediendo en el método de difusión en disco, como lo describió Valgas *et al.*, (156) lo que explicaría por qué en el ensayo por difusión en disco no obtuvimos resultados. Por otra parte, el efecto inhibitorio del péptido Uy234 se observó únicamente en cepas clínicas y ATCC de *Staphylococcus aureus* indicando que es muy probable que la composición de su membrana juegue un rol importante en la unión con el péptido, en dicha composición se encuentran enriquecidos lípidos como: fosfatidilglicerol y cardiolipina cuyas cargas negativas podrían estar favoreciendo la interacción péptido-membrana como reportan algunos autores cuyos resultados son similares (130, 131).

Adicionalmente, se evaluó la actividad de los péptidos por el método de microdilución con el fin de determinar la CMI de nuestros péptidos sobre diversas cepas de *S. entérica*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. faecalis*, *M. tuberculosis*. Se obtuvo que el péptido Uy234 tuvo efecto sobre *A. baumannii* ATTC 17978 con una CMI de 50 μM , *Bacillus subtilis* 168 con una CMI de 25 μM y nuevamente el mayor efecto se observó en *S. aerus* con una CMI de 6.25 μM . Nuestros resultados muestran un efecto similar al reportado por Zhao *et al.* (131), con el péptido lausporin-2 derivado del veneno de un alacrán. Asimismo, la discrepancia de nuestros resultados obtenidos a través de los 3 métodos sobre *A. baumannii*, nos indican que a diferencia de los métodos de difusión en disco y pozo, que fueron sólidos y en los cuales no se había registrado efecto sobre esta bacteria, podría deberse a que el uso del método de microdilución propicia a una mayor biodisponibilidad del péptido optimizando las interacciones electroestáticas logrando así envolver por completo a la membrana externa bacteriana ocasionando una disrupción de ésta. Por otra parte, se determinó la actividad antimicrobiana contra cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* y en las cuales no fue posible observar un efecto inhibitorio en ninguna de las diferentes concentraciones evaluadas de ambos péptidos. Es muy probable que este resultado se deba a que la gruesa capa lipídica de la pared celular impide la unión de nuestros

péptidos a la membrana (133, 134). Debido a esta complejidad, es por ello que existen muy pocos estudios de nuevos compuestos antimicrobianos en contra de *M. tuberculosis* (135).

Así mismo, evaluamos la actividad bactericida (CMB) debido a que es clave en la caracterización de péptidos antimicrobianos. La CMB se realizó a partir de un sellado en placa para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano que indicaría una actividad bactericida. En este ensayo obtuvimos que el péptido Uy234 presenta actividad bactericida a una concentración de 50 μM contra cepas de *B. subtilis* y de 12.5 μM contra cepas de *S. aureus*, nuestros resultados son similares a los reportados por Cesa-Luna y menores que los reportados por Erviana *et al.* en donde obtiene una CMB por encima de 60 μM usando un péptido de alacrán contra *B. subtilis* y *S. aureus* (132). Con ello se logra determinar que Uy234 no solo tiene un efecto bacteriostático sino también bactericida en cepas de *S. aureus* y *Bacillus subtilis* 168. Estos resultados se suman a la poca información que se tiene hasta el momento sobre la actividad bactericida que pueden tener los PAMs.

Derivado de nuestros resultados de CMI y CMB, se decidió hacer ensayos con *S. aerus* usando combinaciones de nuestro péptido Uy234 con vancomicina para evaluar la posible actividad sinérgica entre estos compuestos. Sin embargo, la combinación entre Uy234 y vancomicina no mostró un efecto sinérgico ni tampoco aditivo. Nuestro resultado puede deberse al mecanismo acción de la Vancomicina ya que, al dirigirse a la síntesis de la pared celular, y el péptido Uy234 a la membrana celular, la combinación pudiera suprimir la actividad mutuamente. Además, este resultado se alinea con otro estudio que se centró en una combinación similar entre vancomicina y colistina, donde la colistina desencadenó cambios en la expresión génica en las bacterias, como la mutante resistente a la vancomicina (156)

Algunos PAMs de venenos de alacrán muestran un gran potencial para inhibir el crecimiento de un amplio espectro de bacterias, incluidos aislados clínicos MDR; sin embargo, la alta citotoxicidad y la actividad hemolítica que algunos presentan limitan

su uso clínico (136, 137, 139, 140). Sin embargo, las modificaciones pertinentes para solventar estos efectos indeseables los convierten en candidatos potenciales a fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos MDR que de otro modo serían intratables (146).

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que el péptido antimicrobiano sintético del alacrán *U. yaschenkoj*, Uy234, posee una buena actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas principalmente ante *Staphylococcus aureus* MDR. Además, presenta baja actividad citotóxica contra eritrocitos humanos, lo cual lo hace un candidato ideal para el estudio y diseño de nuevos péptidos antimicrobianos. Este péptido podría convertirse en una nueva propuesta de un agente terapéutico para combatir infecciones causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* MDR.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El experimento relacionado con la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos fue aprobado por el comité de ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Referencias

1. Jeśman, C., Młudzik, A., & Cybulska, M. (2011). Historia odkrycia antybiotyków i sulfonamidów [History of antibiotics and sulphonamides discoveries]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 30(179), 320–322.
2. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
3. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
4. Felix, M. M. R., Aun, M. V., Menezes, U. P., Queiroz, G. R. E. S., Rodrigues, A. T., D'Onofrio-Silva, A. C., Perelló, M. I., Camelo-Nunes, I. C., & Malaman, M. F. (2021). Allergy to penicillin and betalactam antibiotics. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 19, eMD5703. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021MD5703
5. Luxton, T., King, N., Wälti, C., Jeuken, L., & Sandoe, J. (2022). A systematic review of the effect of therapeutic drug monitoring on patient health outcomes during treatment with penicillins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 77(6), 1532–1541. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac101>
6. Bruni, G. N., & Kralj, J. M. (2020). Membrane voltage dysregulation driven by metabolic dysfunction underlies bactericidal activity of aminoglycosides. *eLife*, 9, e58706. <https://doi.org/10.7554/eLife.58706>
7. Matt, T., Ng, C. L., Lang, K., Sha, S. H., Akbergenov, R., Shcherbakov, D., Meyer, M., Duscha, S., Xie, J., Dubbaka, S. R., Perez-Fernandez, D., Vasella, A., Ramakrishnan, V., Schacht, J., & Böttger, E. C. (2012). Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 109(27), 10984–10989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204073109>

8. Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., & Gagnon, M. G. (2018). Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annual review of biochemistry*, 87, 451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>

9. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

10. Wachino, J., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 15(3), 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.05.001>

11. Jednačak, T., Mikulandra, I., & Novak, P. (2020). Advanced Methods for Studying Structure and Interactions of Macrolide Antibiotics. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7799. <https://doi.org/10.3390/ijms21207799>

12. Gray, D. A., & Wenzel, M. (2020). More Than a Pore: A Current Perspective on the In Vivo Mode of Action of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010017>

13. Jančić, U., & Gorgieva, S. (2021). Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. *Pharmaceutics*, 14(1), 76. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>

14. Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, J. S., & Mankin, A. S. (2014). The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 15958–15963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417334111>

15. Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(9), a025361. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361>
16. Jednačak, T., Mikulandra, I., & Novak, P. (2020). Advanced Methods for Studying Structure and Interactions of Macrolide Antibiotics. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7799. <https://doi.org/10.3390/ijms21207799>
17. Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., & Pace, J. L. (2016). Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(12), a026989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026989>
18. Olademehin, O. P., Shuford, K. L., & Kim, S. J. (2022). Molecular dynamics simulations of the secondary-binding site in disaccharide-modified glycopeptide antibiotics. *Scientific reports*, 12(1), 7087. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10735-6>
19. Blaskovich, M. A. T., Hansford, K. A., Butler, M. S., Jia, Z., Mark, A. E., & Cooper, M. A. (2018). Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS infectious diseases*, 4(5), 715–735. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00258>
20. Ruiz J. (2019). Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00007-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-19>
21. Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5662. <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>
22. Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of medical microbiology*, 66(5), 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>

23. Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(4), 268. <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>
24. LaPlante, K. L., Dhand, A., Wright, K., & Lauterio, M. (2022). Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Annals of medicine*, *54*(1), 1686–1700. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2085881>
25. Tehrani, A. H., & Gilbride, K. A. (2018). A closer look at the antibiotic-resistant bacterial community found in urban wastewater treatment systems. *MicrobiologyOpen*, *7*(4), e00589. <https://doi.org/10.1002/mbo3.589>
26. Møller, T. S., Overgaard, M., Nielsen, S. S., Bortolaia, V., Sommer, M. O., Guardabassi, L., & Olsen, J. E. (2016). Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, *16*, 39. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0649-z>
27. Sternbach, G., & Varon, J. (1992). Alexander Fleming: the spectrum of penicillin. *The Journal of emergency medicine*, *10*(1), 89–91. [https://doi.org/10.1016/0736-4679\(92\)90016-m](https://doi.org/10.1016/0736-4679(92)90016-m)
28. Atif, M., Azeem, M., Sarwar, M. R., Shahid, S., Javaid, S., Ikram, H., Baig, U., & Scahill, S. (2016). WHO/INRUD prescribing indicators and prescribing trends of antibiotics in the Accident and Emergency Department of Bahawal Victoria Hospital, Pakistan. *SpringerPlus*, *5*(1), 1928. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3615-1>
29. Pérez de la Lastra, J. M., Anand, U., González-Acosta, S., López, M. R., Dey, A., Bontempi, E., & Morales delaNuez, A. (2022). Antimicrobial Resistance in the COVID-19 Landscape: Is There an Opportunity for Anti-Infective Antibodies and Antimicrobial Peptides?. *Frontiers in immunology*, *13*, 921483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.921483>
30. Band, V. I., Hufnagel, D. A., Jaggavarapu, S., Sherman, E. X., Wozniak, J. E., Satola, S. W., Farley, M. M., Jacob, J. T., Burd, E. M., & Weiss, D. S. (2019). Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to

multiple drugs effectively control infection. *Nature microbiology*, 4(10), 1627–1635. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0480-z>

31. Blaskovich, M. A. T., Hansford, K. A., Butler, M. S., Jia, Z., Mark, A. E., & Cooper, M. A. (2018). Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS infectious diseases*, 4(5), 715–735. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00258>

32. Davey, P., Marwick, C. A., Scott, C. L., Charani, E., McNeil, K., Brown, E., Gould, I. M., Ramsay, C. R., & Michie, S. (2017). Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2(2), CD003543. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003543.pub4>

33. Band, V. I., Hufnagel, D. A., Jaggavarapu, S., Sherman, E. X., Wozniak, J. E., Satola, S. W., Farley, M. M., Jacob, J. T., Burd, E. M., & Weiss, D. S. (2019). Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nature microbiology*, 4(10), 1627–1635. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0480-z>

34. Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

35. Jančič, U., & Gorgieva, S. (2021). Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. *Pharmaceutics*, 14(1), 76. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>

36. Fodor, A., Abate, B. A., Deák, P., Fodor, L., Gyenge, E., Klein, M. G., Koncz, Z., Muvevi, J., Ötvös, L., Székely, G., Vozik, D., & Makrai, L. (2020). Multidrug Resistance (MDR) and Collateral Sensitivity in Bacteria, with Special Attention to Genetic and Evolutionary Aspects and to the Perspectives of Antimicrobial Peptides-A Review. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(7), 522. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070522>

37. Ayoub Moubareck C. (2020). Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of

<https://doi.org/10.3390/membranes10080181>

38. Khosa, S., Frieg, B., Mulnaes, D., Kleinschrodt, D., Hoepfner, A., Gohlke, H., & Smits, S. H. (2016). Structural basis of lantibiotic recognition by the nisin resistance protein from *Streptococcus agalactiae*. *Scientific reports*, 6, 18679. <https://doi.org/10.1038/srep18679>

39. Samael Olascoaga-Del, A. K., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, M., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). *Gaceta medica de Mexico*, 154(6), 681–688. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>

40. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>

41. Patel, S., & Akhtar, N. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential 'offense and defense' molecules are more than antimicrobials. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 95, 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>

42. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

43. Gashaw, M., Berhane, M., Bekele, S., Kibru, G., Teshager, L., Yilma, Y., Ahmed, Y., Fentahun, N., Assefa, H., Wieser, A., Gudina, E. K., & Ali, S. (2018). Emergence of high drug resistant bacterial isolates from patients with

health care associated infections at Jimma University medical center: a cross sectional study. *Antimicrobial resistance and infection control*, 7, 138. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0431-0>

44. Abat, C., Fournier, P. E., Jimeno, M. T., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2018). Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality?. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 37(9), 1687–1697. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3300-0>

45. Rolain, J. M., Abat, C., Jimeno, M. T., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2016). Do we need new antibiotics?. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(5), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.012>

46. Rhim, H., Ben Trad, R., Haddad, O., Kadri, Y., & Mastouri, M. (2022). Comparative study of multidrug-resistant bacterial infections in hospitals and community settings in the region of Monastir - Tunisia. *La Tunisie medicale*, 100(5), 390–395.

47. Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>

48. Mahrt, N., Tietze, A., Künzel, S., Franzenburg, S., Barbosa, C., Jansen, G., & Schulenburg, H. (2021). Bottleneck size and selection level reproducibly impact evolution of antibiotic resistance. *Nature ecology & evolution*, 5(9), 1233–1242. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01511-2>

49. Lukačšínová, M., Fernando, B., & Bollenbach, T. (2020). Highly parallel lab evolution reveals that epistasis can curb the evolution of antibiotic resistance. *Nature communications*, 11(1), 3105. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16932-z>

50. Hiltunen, T., Virta, M., & Laine, A. L. (2017). Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philosophical transactions of the Royal*

Society of London. Series B, Biological sciences, 372(1712), 20160039.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>

51. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

52. Gil-Gil, T., Ochoa-Sánchez, L. E., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2021). Antibiotic resistance: Time of synthesis in a post-genomic age. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 3110–3124. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.034>

53. Jahn, L. J., Simon, D., Jensen, M., Bradshaw, C., Ellabaan, M. M. H., & Sommer, M. O. A. (2021). Compatibility of Evolutionary Responses to Constituent Antibiotics Drive Resistance Evolution to Drug Pairs. *Molecular biology and evolution*, 38(5), 2057–2069. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab006>

54. Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, 7(6), 180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>

55. Organización Mundial de la Salud (2017). La OMS publica una lista de bacterias para las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (consultado el 12 de noviembre , 2022).

56. Khare, T., Anand, U., Dey, A., Assaraf, Y. G., Chen, Z. S., Liu, Z., & Kumar, V. (2021). Exploring Phytochemicals for Combating Antibiotic Resistance in Microbial Pathogens. *Frontiers in pharmacology*, 12, 720726. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.720726>

57. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*

(London, England), 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

58. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

59. Saha, M., & Sarkar, A. (2021). Review on Multiple Facets of Drug Resistance: A Rising Challenge in the 21st Century. *Journal of xenobiotics*, 11(4), 197–214. <https://doi.org/10.3390/jox11040013>

60. Baquero F. (2021). Threats of antibiotic resistance: an obliged reappraisal. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 24(4), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y>

61. Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, 14(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>

62. Jagielski, T., Minias, A., van Ingen, J., Rastogi, N., Brzostek, A., Żaczek, A., & Dziadek, J. (2016). Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 239–290. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-15>

63. Goossens, S. N., Sampson, S. L., & Van Rie, A. (2020). Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 34(1), e00141-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00141-20>

64. Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>

65. Bosch, T. C. G., & Zasloff, M. (2021). Antimicrobial Peptides-or How Our Ancestors Learned to Control the Microbiome. *mBio*, 12(5), e0184721. <https://doi.org/10.1128/mBio.01847-21>
66. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
67. Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2014). De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(1), 121–132. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>
68. Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
69. Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C. A., Seow, S. V., Zhang, S., & Yang, Y. Y. (2011). Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, 32(8), 2204–2212. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.054>
70. Han, H. M., Gopal, R., & Park, Y. (2016). Design and membrane-disruption mechanism of charge-enriched AMPs exhibiting cell selectivity, high-salt resistance, and anti-biofilm properties. *Amino acids*, 48(2), 505–522. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2104-0>
71. Cesa-Luna, C., Muñoz-Rojas, J., Saab-Rincon, G., Baez, A., Morales-García, Y. E., Juárez-González, V. R., & Quintero-Hernández, V. (2019). Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *PloS one*, 14(11), e0222438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>
72. Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>

73. Andersson, D. I., Hughes, D., & Kubicek-Sutherland, J. Z. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 26, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
74. Vanzolini, T., Bruschi, M., Rinaldi, A. C., Magnani, M., & Fraternali, A. (2022). Multitalented Synthetic Antimicrobial Peptides and Their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 545. <https://doi.org/10.3390/ijms23010545>
75. Mankoci, S., Ewing, J., Dalai, P., Sahai, N., Barton, H. A., & Joy, A. (2019). Bacterial Membrane Selective Antimicrobial Peptide-Mimetic Polyurethanes: Structure-Property Correlations and Mechanisms of Action. *Biomacromolecules*, 20(11), 4096–4106. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00939>
76. Mabrouk D. M. (2022). Antimicrobial peptides: features, applications and the potential use against covid-19. *Molecular biology reports*, 49(10), 10039–10050. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07572-1>
77. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
78. Wang, G., Vaisman, I. I., & van Hoek, M. L. (2022). Machine Learning Prediction of Antimicrobial Peptides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2405, 1–37. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1855-4_1
79. Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current biology : CB*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
80. Wang, X., & Wang, G. (2016). Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. *Protein and peptide letters*, 23(8), 707–721. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160511151320>
81. Ahmadi, S., Knerr, J. M., Argemi, L., Bordon, K. C. F., Pucca, M. B., Cerni, F. A., Arantes, E. C., Çalışkan, F., & Laustsen, A. H. (2020). Scorpion

Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines*, 8(5), 118.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8050118>

82. Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 46(8), 831–844.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.006>

83. Luna-Ramirez, K., Skaljac, M., Grotmann, J., Kirfel, P., & Vilcinskis, A. (2017). Orally Delivered Scorpion Antimicrobial Peptides Exhibit Activity against Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and Its Bacterial Symbionts. *Toxins*, 9(9), 261. <https://doi.org/10.3390/toxins9090261>

84. Furtado, A. A., Daniele-Silva, A., Silva-Júnior, A. A. D., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2020). Biology, venom composition, and scorpionism induced by brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae): A mini-review. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 185, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.015>

85. de Oliveira, U. C., Nishiyama, M. Y., Jr, Dos Santos, M. B. V., Santos-da-Silva, A. P., Chalkidis, H. M., Souza-Imberg, A., Candido, D. M., Yamanouye, N., Dorce, V. A. C., & Junqueira-de-Azevedo, I. L. M. (2018). Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PloS one*, 13(3), e0193739.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193739>

86. Rodríguez, A. A., Otero-González, A., Ghattas, M., & Ständker, L. (2021). Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1381.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101381>

87. Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 88, 115–137.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.006>

88. Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *93*, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>
89. Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides*, *51*, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>
90. Pucca, M. B., Cerni, F. A., Pinheiro-Junior, E. L., Zoccal, K. F., Bordon, K. C. F., Amorim, F. G., Peigneur, S., Vriens, K., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Júnior, R. B. M., Arruda, E., Faccioli, L. H., Tytgat, J., & Arantes, E. C. (2016). Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. *Peptides*, *82*, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.05.008>
91. Luo, X., Ding, L., Ye, X., Zhu, W., Zhang, K., Li, F., Jiang, H., Zhao, Z., & Chen, Z. (2021). An Smp43-Derived Short-Chain α -Helical Peptide Displays a Unique Sequence and Possesses Antimicrobial Activity against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Toxins*, *13*(5), 343. <https://doi.org/10.3390/toxins13050343>
92. Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *88*, 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.006>
93. Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced drug delivery reviews*, *78*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.003>
94. Mischnik, A., Lübbert, C., & Mutters, N. T. (2018). Neue β Laktam-Antibiotika und β Laktamase-Inhibitoren gegen multiresistente Gram-negative Erreger [New β lactam antibiotics and β lactamase inhibitors against multidrug-resistant Gram-negative bacteria]. *Der Internist*, *59*(12), 1335–1343. <https://doi.org/10.1007/s00108-018-0508-0>

95. Lin, X., & Kück, U. (2022). Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(24), 8007–8020. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12272-8>
96. Raj GM. *Introduction to basics of pharmacology and toxicology, Vol 2: Essentials of systemic pharmacology : from principles to practice*. 1. Singapore: Springer; 2021. Penicillins, cephalosporins and other beta-lactam antibiotics; pp. 821–834.
97. Lebeaux, D., Fernández-Hidalgo, N., Pilmis, B., Tattevin, P., & Mainardi, J. L. (2020). Aminoglycosides for infective endocarditis: time to say goodbye?. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(6), 723–728. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.017>
98. Kros, C. J., & Steyger, P. S. (2019). Aminoglycoside- and Cisplatin-Induced Ototoxicity: Mechanisms and Otoprotective Strategies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(11), a033548. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033548>
99. Gagetti, P., Bonofiglio, L., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Vigliarolo, L., von Specht, M., Toresani, I., & Lopardo, H. A. (2019). Resistance to β -lactams in enterococci. *Revista Argentina de microbiologia*, 51(2), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.007>
100. Mikłasińska-Majdanik M. (2021). Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406>
101. Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Feßler, A. T., & Vester, B. (2016). Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(11), a027037. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027037>
102. Wang, M., Zhao, Q., Zhang, Q., & Liu, W. (2016). Differences in PLP-Dependent Cysteinylyl Processing Lead to Diverse S-Functionalization of

Lincosamide Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 138(20), 6348–6351. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01751>

103. Dilley, M., & Geng, B. (2022). Immediate and Delayed Hypersensitivity Reactions to Antibiotics: Aminoglycosides, Clindamycin, Linezolid, and Metronidazole. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 62(3), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08878-x>

104. de la Salud Bea, R., Petraglia, A. F., Ascuitto, M. R., & Buck, Q. M. (2017). Antibacterial Activity and Toxicity of Analogs of Scorpion Venom IsCT Peptides. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 6(3), 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6030013>

105. Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., & Nakajima, T. (2001). IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(4), 820–825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5472>

106. Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K. S., & Kim, Y. (2004). Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(2), 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.144>

107. Nie, Y., Zeng, X. C., Yang, Y., Luo, F., Luo, X., Wu, S., Zhang, L., & Zhou, J. (2012). A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*, 38(2), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.012>

108. Wu, S., Nie, Y., Zeng, X. C., Cao, H., Zhang, L., Zhou, L., Yang, Y., Luo, X., & Liu, Y. (2014). Genomic and functional characterization of three new venom peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*, 53, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.012>

109. Megdad-Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S., & Laraba-Djebari, F. (2019). Cerebrospinal inflammatory response following scorpion envenomation: role of histamine H1 and H3 receptors. *Inflammopharmacology*, 27(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-00553-6>

110. Béchohra, L., Laraba-Djebari, F., & Hammoudi-Triki, D. (2016). Cytotoxic activity of *Androctonus australis hector* venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 22, 29. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0085-4>
111. de Jesus Oliveira, T., Oliveira, U. C., & da Silva Junior, P. I. (2019). Serrulin: A Glycine-Rich Bioactive Peptide from the Hemolymph of the Yellow *Tityus serrulatus* Scorpion. *Toxins*, 11(9), 517. <https://doi.org/10.3390/toxins11090517>
112. Teerapo, K., Roytrakul, S., Sistaniyanarain, A., & Kunthalert, D. (2019). A scorpion venom peptide derivative BmKn–22 with potent antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, 14(6), e0218479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218479>
113. Molchanova, N., Hansen, P. R., & Franzyk, H. (2017). Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(9), 1430. <https://doi.org/10.3390/molecules22091430>
114. Shai, Y., & Oren, Z. (2001). From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629–1641. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(01\)00498-3](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00498-3)
115. Mukhopadhyay, S., Bharath Prasad, A. S., Mehta, C. H., & Nayak, U. Y. (2020). Antimicrobial peptide polymers: no escape to ESKAPE pathogens—a review. *World journal of microbiology & biotechnology*, 36(9), 131. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02907-1>
116. Tuerkova, A., Kabelka, I., Králová, T., Sukeník, L., Pokorná, Š., Hof, M., & Vácha, R. (2020). Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *eLife*, 9, e47946. <https://doi.org/10.7554/eLife.47946>
117. Khoo, S. C., Goh, M. S., Alias, A., Luang-In, V., Chin, K. W., Ling Michelle, T. H., Sonne, C., & Ma, N. L. (2022). Application of antimicrobial,

potential hazard and mitigation plans. *Environmental research*, 215(Pt 1), 114218. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114218>

118. Zhang, C., He, X., Gu, Y., Zhou, H., Cao, J., & Gao, Q. (2014). Recombinant scorpine produced using SUMO fusion partner in *Escherichia coli* has the activities against clinically isolated bacteria and inhibits the *Plasmodium falciparum* parasitemia in vitro. *PloS one*, 9(7), e103456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103456>

119. Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C. V., Winkel, K. D., & Possani, L. D. (2013). Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 63, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.017>

120. Li, Z., Xu, X., Meng, L., Zhang, Q., Cao, L., Li, W., Wu, Y., & Cao, Z. (2014). Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. *PloS one*, 9(5), e97539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097539>

121. Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(8), 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>

122. Luo, X., Ye, X., Ding, L., Zhu, W., Yi, P., Zhao, Z., Gao, H., Shu, Z., Li, S., Sang, M., Wang, J., Zhong, W., & Chen, Z. (2021). Fine-Tuning of Alkaline Residues on the Hydrophilic Face Provides a Non-toxic Cationic α -Helical Antimicrobial Peptide Against Antibiotic-Resistant ESKAPE Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 12, 684591. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684591>

123. Tamura, M., Tatsushiro, C., Morita, E. H., & Ohki, S. (2022). Structural and functional studies of LaIT2, an antimicrobial and insecticidal peptide from

Liocheles australasiae. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 214, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.04.015>

124. Furtado, A. A., Daniele-Silva, A., de Oliveira, I. R. R., Mendes, R. F. V., Santos, E. C. G. D., Carvalho, E., Damasceno, I. Z., Parente, A. M. E. S., Sena, K. X. D. F. R., Silva-Júnior, A. A. D., Ximenes, R. M., Vieira, D. S., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2022). In silico and in vitro structure-stability-function relationship of analog peptides of Stigmurin and its antibacterial and antibiofilm activities. *Pharmacological research*, 181, 106245. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106245>

125. Daniele-Silva, A., Rodrigues, S. C. S., Dos Santos, E. C. G., Queiroz Neto, M. F., Rocha, H. A. O., Silva-Júnior, A. A. D., Resende, J. M., Araújo, R. M., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2021). NMR three-dimensional structure of the cationic peptide Stigmurin from *Tityus stigmurus* scorpion venom: In vitro antioxidant and in vivo antibacterial and healing activity. *Peptides*, 137, 170478. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170478>

126. Acevedo, I. C. C., Silva, P. I., Jr, Silva, F. D., Araújo, I., Alves, F. L., Oliveira, C. S., & Oliveira, V. X., Jr (2019). IsCT-based analogs intending better biological activity. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 25(12), e3219. <https://doi.org/10.1002/psc.3219>

127. Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific reports*, 10(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>

128. Parente, A. M. S., Daniele-Silva, A., Furtado, A. A., Melo, M. A., Lacerda, A. F., Queiroz, M., Moreno, C., Santos, E., Rocha, H. A. O., Barbosa, E. G., Carvalho, E., Silva-Júnior, A. A., Silva, M. S., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2018). Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin:

Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. *Toxins*, 10(4), 161. <https://doi.org/10.3390/toxins10040161>

129. He, S., Stone, T. A., & Deber, C. M. (2021). Uncoupling Amphipathicity and Hydrophobicity: Role of Charge Clustering in Membrane Interactions of Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, 60(34), 2586–2592. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00367>

130. Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2015). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PloS one*, 10(12), e0144611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144611>

131. Zhao, Z., Zhang, K., Zhu, W., Ye, X., Ding, L., Jiang, H., Li, F., Chen, Z., & Luo, X. (2021). Two new cationic α -helical peptides identified from the venom gland of *Liocheles australasiae* possess antimicrobial activity against methicillin-resistant staphylococci. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 196, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.002>

132. Erviana, R., Saengkun, Y., Rungsa, P., Jangpromma, N., Tippayawat, P., Klaynongsruang, S., Daduang, J., & Daduang, S. (2021). Novel Antimicrobial Peptides from a Cecropin-Like Region of *Heteroscorpine-1* from *Heterometrus laoticus* Venom with Membrane Disruption Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(19), 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules26195872>

133. Ehrt S, Schnappinger D, Rhee KY. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Aug;16(8):496-507. doi: 10.1038/s41579-018-0013-4. PMID: 29691481; PMCID: PMC6045436.

134. Jurkowitz MS, Azad AK, Monsma PC, Keiser TL, Kanyo J, Lam TT, Bell CE, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* encodes a YhhN family

membrane protein with lysoplasmalogenase activity that protects against toxic host lysolipids. *J Biol Chem.* 2022 May;298(5):101849. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101849. Epub 2022 Mar 18. PMID: 35314194; PMCID: PMC9052158.

135. Ibekwe NN, Nvau JB, Oladosu PO, Usman AM, Ibrahim K, Boshoff HI, Dowd CS, Orisadipe AT, Aiyelaagbe O, Adesomoju AA, Barry CE 3rd, Okogun JI; collaboration with 73 Visited Herbalists. Some Nigerian anti-tuberculosis ethnomedicines: a preliminary efficacy assessment. *J Ethnopharmacol.* 2014 Aug 8;155(1):524-32. doi: 10.1016/j.jep.2014.05.059. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24911338; PMCID: PMC4154137.66

136. Ramírez-Carretero S, Jiménez-Vargas JM, Rivas-Santiago B, Corzo G, Possani LD, Becerril B, Ortiz E. Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. *Peptides.* 2015 Nov;73:51-9. doi: 10.1016/j.peptides.2015.08.014. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26352292.

137. Amorim-Carmo, B., Daniele-Silva, A., Parente, A. M. S., Furtado, A. A., Carvalho, E., Oliveira, J. W. F., Santos, E. C. G., Silva, M. S., Silva, S. R. B., Silva-Júnior, A. A., Monteiro, N. K., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2019). Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Analogs from the Scorpion Peptide Stigmurin. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 623. <https://doi.org/10.3390/ijms20030623>

138. Almaaytah, A., Abualhajaa, A., & Alqudah, O. (2019). The evaluation of the synergistic antimicrobial and antibiofilm activity of AamAP1-Lysine with conventional antibiotics against representative resistant strains of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Infection and drug resistance*, 12, 1371–1380. <https://doi.org/10.2147/IDR.S204626>

139. Hong, M. J., Kim, M. K., & Park, Y. (2021). Comparative Antimicrobial Activity of Hp404 Peptide and Its Analogs against *Acinetobacter baumannii*. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5540. <https://doi.org/10.3390/ijms22115540>

140. Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific reports*, *10*(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
141. Hong, M. J., Kim, M. K., & Park, Y. (2021). Comparative Antimicrobial Activity of Hp404 Peptide and Its Analogs against *Acinetobacter baumannii*. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 5540. <https://doi.org/10.3390/ijms22115540>
142. Zhang, S. K., Song, J. W., Gong, F., Li, S. B., Chang, H. Y., Xie, H. M., Gao, H. W., Tan, Y. X., & Ji, S. P. (2016). Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific reports*, *6*, 27394. <https://doi.org/10.1038/srep27394>
143. Luo, X., Ding, L., Ye, X., Zhu, W., Zhang, K., Li, F., Jiang, H., Zhao, Z., & Chen, Z. (2021). An Smp43-Derived Short-Chain α -Helical Peptide Displays a Unique Sequence and Possesses Antimicrobial Activity against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Toxins*, *13*(5), 343. <https://doi.org/10.3390/toxins13050343>
144. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, *11*, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
145. Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International journal of molecular sciences*, *22*(21), 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
146. Erviana, R., Saengkun, Y., Rungsa, P., Jangpromma, N., Tippayawat, P., Klaynongsruang, S., Daduang, J., & Daduang, S. (2021). Novel Antimicrobial Peptides from a Cecropin-Like Region of Heteroscorpine-1

from *Heterometrus laoticus* Venom with Membrane Disruption Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(19), 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules26195872>

147. Fan Z, Cao L, He Y, Hu J, Di Z, Wu Y, Li W, Cao Z. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):5220-9. doi: 10.1128/AAC.00369-11. Epub 2011 Aug 29. PMID: 21876042; PMCID: PMC3195061.

148. Luna-Ramirez, K., Tonk, M., Rahnamaeian, M., & Vilcinskas, A. (2017). Bioactivity of Natural and Engineered Antimicrobial Peptides from Venom of the Scorpions *Urodacus yaschenkoi* and *U. manicatus*. *Toxins*, 9(1), 22. <https://doi.org/10.3390/toxins9010022>

149. Kim, M. K., Kang, H. K., Ko, S. J., Hong, M. J., Bang, J. K., Seo, C. H., & Park, Y. (2018). Mechanisms driving the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, 8(1), 1763. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19434-7>

150. Liu, G., Yang, F., Li, F., Li, Z., Lang, Y., Shen, B., Wu, Y., Li, W., Harrison, P. L., Strong, P. N., Xie, Y., Miller, K., & Cao, Z. (2018). Therapeutic Potential of a Scorpion Venom-Derived Antimicrobial Peptide and Its Homologs Against Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 1159. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01159>

151. Amorim-Carmo, B., Daniele-Silva, A., Parente, A., Furtado, A. A., Carvalho, E., Oliveira, J., Santos, E., Silva, M. S., Silva, S., Silva-Júnior, A. A., Monteiro, N. K., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2019). Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Analogs from the Scorpion Peptide Stigmurin. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 623. <https://doi.org/10.3390/ijms20030623>

152. Almaaytah, A., Abualhajjaa, A., & Alqudah, O. (2019). The evaluation of the synergistic antimicrobial and antibiofilm activity of AamAP1-Lysine with conventional antibiotics against representative resistant strains of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Infection and drug resistance*, 12, 1371–1380. <https://doi.org/10.2147/IDR.S204626>
153. Song, C., Wen, R., Zhou, J., Zeng, X., Kou, Z., Zhang, J., Wang, T., Chang, P., Lv, Y., & Wu, R. (2022). Antibacterial and Antifungal Properties of a Novel Antimicrobial Peptide GK-19 and Its Application in Skin and Soft Tissue Infections Induced by MRSA or *Candida albicans*. *Pharmaceutics*, 14(9), 1937. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091937>
154. Pedron, C. N., Araújo, I., da Silva Junior, P. I., Dias da Silva, F., Torres, M. T., & Oliveira Junior, V. X. (2019). Repurposing the scorpion venom peptide VmCT1 into an active peptide against Gram-negative ESKAPE pathogens. *Bioorganic chemistry*, 90, 103038. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103038>
155. Gao, B., Dalziel, J., Tanzi, S., & Zhu, S. (2018). Meucin-49, a multifunctional scorpion venom peptide with bactericidal synergy with neurotoxins. *Amino acids*, 50(8), 1025–1043. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2580-0>
156. Valgas C., Souza S. M., Smânia E. F., Jr. A., (2007) "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 38, pp. 369. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.
157. Haaber, J., Friberg, C., McCreary, M., Lin, R., Cohen, S. N., & Ingmer, H. (2015). Reversible antibiotic tolerance induced in *Staphylococcus aureus* by concurrent drug exposure. *mBio*, 6(1), e02268-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02268-14>

