

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BÚSQUEDA DE TERAPIAS ANTIMICROBIANAS ALTERNATIVAS:
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL VENENO DE SERPIENTES

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión
del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al
grado y título de
Especialista en Bacteriología Médica

RUTH ARCE BEJARANO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

Dedicatoria *Le dedico este esfuerzo a mis padres y a mis hijas,*

Keylin y Mariángel

por su paciencia, amor y su apoyo incondicional.

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar a Dios por abrir puertas donde no las hay.

*Agradezco a cada uno de mis profesores de la Facultad de Microbiología,
porque aprendí académicamente el valor del conocimiento y como personas la
valiosa oportunidad de poner mi trabajo al servicio de la salud de cada paciente.*

“Este Trabajo final de Graduación fue aceptado por la
Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en
Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial
para optar el grado y título de Especialista en
Bacteriología Médica”.

PhD. Carlos Chacón Díaz

Tutor

PhD. Bruno Lomonte Vigliotti

Lector

M.Sc. Ingrid Salas Campos

Lector

Ruth Arce Bejarano

Sustentante

ÍNDICE

Hoja de aprobación.....	III
Resumen.....	V
Cuadros, figuras y abreviaturas.....	VII
Justificación.....	09
Objetivo General y específicos.....	09
Metodología.....	10
Diseño.....	10
Estrategia de búsqueda.....	10
Capítulo I: Antimicrobianos.....	11
1. Origen y evolución de los antimicrobianos.....	11
2. La resistencia a los antimicrobianos.....	14
3. Desarrollo de nuevos antimicrobianos.....	15
Capítulo II: Alternativas terapéuticas en desarrollo.....	21
1. Nuevas moléculas.....	21
2. Alternativas no tradicionales.....	21
a. Nanopartículas.....	24
b. Derivados de plantas.....	24
c. Bacteriocinas.....	25
d. Selvamicina.....	26
e. Derivados de venenos de serpientes.....	26
Capítulo III: Potencial antimicrobiano de los venenos de serpiente.....	28
1. Fosfolipasas A ₂	28
2. Péptidos antimicrobianos.....	31
3. Péptidos sintéticos.....	32
Capítulo IV: Investigación reciente sobre el uso de venenos de serpiente.....	34
1. Estado actual de publicaciones.....	34
2. Estado actual de patentes.....	35
2.1 CN104000851B.....	35
2.2 CN101265296A.....	36
2.3 US20070128179A1.....	37
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	41

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos genera una inminente crisis de salud pública que amenaza con aumentar en los próximos años.

Desde hace varias décadas organismos internacionales se han preocupado por llamar la atención de los profesionales de la salud, investigadores y autoridades sanitarias sobre este tema, sin embargo, ya no es un problema que solo corresponda al sector salud, es una urgencia global educar a la población en cuanto al uso y abuso de estos tratamientos.

La búsqueda de antimicrobianos alternativos, de la mano de la educación para el uso responsable de los fármacos disponibles, son parte de las estrategias para disminuir el impacto de esta situación, mientras se promueven estrategias innovadoras de investigación y desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

En los últimos años ha habido un aumento importante en cuanto a la investigación de nuevas terapias no tradicionales, entre estas se ha retomado el potencial que poseen los venenos de serpiente y sus derivados estructurales como fuente de principios bioactivos que podrían ofrecer un nuevo mecanismo para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos.

Recientemente la Organización Mundial de Salud ha hecho público un documento sobre los estudios con nuevas moléculas en sus diferentes fases de ensayo, así como su potencial alcance terapéutico. Muchos autores concuerdan en la necesidad de crear incentivos científicos y económicos para darle continuidad a las nuevas propuestas que surgen de pequeños grupos de investigación, sobre todo académicos, para que estas ideas innovadoras puedan concretarse y ofrecer una alternativa nueva al problema de la resistencia a los fármacos actuales.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Origen de los primeros antibióticos y sus mecanismos de acción.....	12
Cuadro 2. Nuevos antimicrobianos no tradicionales en etapa preclínica.....	23
Cuadro 3. PLA ₂ s con actividad antibacteriana de venenos de serpiente.....	30
Cuadro 4. Catelicidinas derivadas de venenos de serpiente con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Publicaciones según el criterio de búsqueda para nuevos antimicrobianos a partir de venenos de serpiente en la base de datos PubMed entre los años 1975-2021.....	34
---	----

ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
RAM	Resistencia a los Antimicrobianos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
FAO	Food and Agriculture Organization
OIE	World Organization for Animal Health
GLASS	The Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
IND	Investigational New Drug
FDA	Food and Drug Administration
EFPIA	European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations
IMI	Iniciativa de Medicamentos Innovadores
GAIN	Generating Antibiotic Incentives Now
I+D	Investigación y Desarrollo
GARDP	Global Antibiotic Research and Development Parthnership

XDR	Multidrug Resistance
AgNP	Nanopartículas de plata
ATP	Adenosín trifosfato
NADH	Nicotamida adenina dinuclético
ROS	Reactive Oxygen Species
AMP	Antimicrobial Peptide
LAO	L-aminoácido oxidasa
PLA2	Phospolipase A2
svPLA2	snake venom Phospolipase A2
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
I.M.	Intramuscular
HPLC	High Performance liquid chromatography
FAB-MS	Fast-atom bombardment Mass Spectrometry
RP-HPLC	Reverse phase- High Performance liquid chromatography
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
LDH	Lactato Deshidrogenasa



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Ruth Arce Bejarano, con cédula de identidad 109870998, en mi condición de autor del TFG titulado

“Búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas: potencial antimicrobiano del veneno de serpientes”

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. **SI** ☒ **NO *** ☐

***En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).**

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado la resistencia a los antibióticos como una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. La búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana que cumplan con todos los requisitos para uso humano es por lo tanto un tema de interés público.

Objetivo General

Analizar cuál es la situación actual de la investigación sobre el potencial de los venenos de serpientes para la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas, según publicaciones recientes, la situación de patentes y los avances en ensayos clínicos.

Objetivos específicos

- Hacer una revisión temporal de la evolución y uso de los antibióticos utilizados en enfermedades infecciosas en humanos, así como el surgimiento de los eventos de resistencia.
- Hacer una revisión de los nuevos antimicrobianos en desarrollo, derivados de antibióticos tradicionales y propuestas no tradicionales.
- Realizar una revisión del estado actual en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas y determinar cuál es el impacto de la investigación con venenos de serpientes y sus derivados estructurales.
- Realizar una revisión del estado de patentes para el uso toxinas de serpiente como antibióticos.
- Determinar si estas investigaciones están en Fases de Ensayo Clínico, y de ser así cuáles son los avances en el proceso de convertirse en medicamentos de uso humano.
- Analizar cuál es la viabilidad y los alcances a futuro que ofrecen estas terapias alternativas para atender el problema de la Resistencia a los antimicrobianos.

Metodología

1. Diseño

Se ha realizado una revisión sistemática de documentos, revisiones y estudios recientes en revistas indexadas en la base de datos Pubmed (NCBI) dedicadas a la investigación pasada, presente y futura del uso de los antibióticos y las estrategias para contener y revertir los efectos negativos causados por el aumento de la resistencia al uso de estos medicamentos.

2. Estrategia de búsqueda

Para la delimitación del tema se utilizó el criterio de búsqueda “New antibiotic AND Snake venom” y se realizó una primera selección de artículos recientes (1975-2021) que permitiera recopilar información actualizada sobre aspectos generales sobre los antibióticos y nuevas alternativas terapéuticas.

Para la búsqueda de contenido referido al tema de potencial terapéutico de toxinas de veneno de serpientes no se usó restricción temporal. La búsqueda de patentes se realizó en el motor de búsqueda patents.google.com utilizando el mismo criterio de búsqueda.

Capítulo I: Antimicrobianos

1. Origen y evolución de los antimicrobianos

La era previa al desarrollo de los antimicrobianos estuvo marcada por enfermedades infecciosas y pandemias como la Peste Negra, causada por la bacteria *Yersinia pestis* que se estima causó la muerte de doscientos millones de personas.¹

El descubrimiento de sustancias capaces de inhibir la proliferación de ciertos microorganismos fue un proceso progresivo. En el siglo XVII John Parkinson, boticario inglés, daba los primeros pasos describiendo los efectos curativos de los mohos hacia infecciones, en su obra *Theatrum Botanicum*.²

En 1876, los estudios de Robert Koch permitieron probar la correlación entre un agente causal (*Bacillus anthracis*) y una enfermedad mediante el desarrollo de sus postulados, y por estos hallazgos es considerado el padre de la microbiología médica moderna y la bacteriología. Más tarde, Louis Pasteur observó que los cultivos de bacilos del ántrax se inhibían cuando se contaminan con mohos. Ambos con sus descubrimientos contribuyeron de forma determinante al estudio de las enfermedades infecciosas.³

En 1893 Gosio estudió la relación causal de pelagra y aisló del cultivo de *Penicillium brevi compactum*, un producto cristalino que mostraba actividad antibiótica contra *Bacillus anthracis*.⁴

Esta sucesión de descubrimientos nos lleva hasta Paul Ehrlich en 1910, quien utilizó el salvarsán como terapia dirigida, el primer antibiótico sintético derivado del arsénico arsfenamina, que se convirtió en un tratamiento innovador para las infecciones por *Treponema*, otras espiroquetas y también la tripanosomiasis.⁵

En 1929, Alexander Fleming describió que alrededor de una gran colonia de moho contaminante, las colonias de estafilococos se volvieron transparentes y sufrían lisis. Esta observación marcó el nacimiento de la era de los antibióticos. Pero fue hasta 1940 que Ernest Boris Chain aisló una pequeña cantidad del compuesto activo producido por el moho, dando origen a la penicilina.⁶

Esta observación de Fleming también contribuyó a implementar un nuevo método de detección, revolucionando la búsqueda de compuestos bioactivos de microorganismos al esparcir muestras de suelo o diluciones de estas en placas de agar, inoculadas con bacterias patógenas.³

En 1947, Waksman definió el término antibiótico como: “una sustancia química, producida por microorganismos, que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso destruir bacterias y otros microorganismos”⁷

El descubrimiento y la posterior producción a gran escala de antibióticos a principios del siglo XX fue uno de los logros más importantes en la historia de la medicina. A continuación, se resumen los antibióticos descubiertos en esta primera etapa, su origen y mecanismo de acción.

Cuadro 1. Origen de los primeros antibióticos y sus mecanismos de acción^{8,9,10,11}

Molécula	Descubrimiento	Origen	Mecanismo de acción
Betalactámicos	1928-1940	<i>Penicillium notatum</i>	Inhibidores de la síntesis de la pared celular
Sulfamidas	1932	Sintético	Análogos estructurales del ácido para-aminobenzoico, inhiben la síntesis de ADN
Colistin	1940	<i>Paenibacillus polymyxa</i> var. <i>colistinus</i>	Polipéptido, agente tensioactivo que altera la permeabilidad de la membrana y causa lisis
Bacitracina	1941	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	Inhibe la síntesis de peptidoglucano al unirse a un portador de pirofosfato lipídico.
Aminoglucósidos	1944	<i>Streptomyces</i>	Inhiben la síntesis de proteínas
	(Estreptomina)	<i>anulatus subsp. Griseus</i>	
	mediante la unión a la subunidad 16S	1963	
	(Gentamicina)	<i>purpurea</i>	<i>Micromonospora</i> ribosómica 30S

Cloranfenicol	1949	<i>Streptomyces</i>	Inhibe de la síntesis de proteínas al unirse de forma reversible a la subunidad 50S
Tetraciclinas	1948	<i>Streptomyces</i>	Inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S
Glucopéptidos	1950	Actinomicetos	Inhiben una etapa tardía en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana
Macrólidos	1952	<i>Streptomyces erythreus</i>	Inhibe de la síntesis de proteínas al unirse de forma reversible a la subunidad 50S
Estreptograminas	1953	<i>Streptomyces</i>	Se unen a los ribosomas bacterianos e inhiben la traducción del ARN mensajero en la etapa de alargamiento
Ansamicinas: Rifampicina	1957	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Se une a la subunidad β de la ARN pol dependiente de ADN, suprime la elongación de la cadena.
Lincosamidas	1962	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Inhiben la síntesis de proteínas uniéndose al 23S rRNA de la subunidad 50s
Quinolonas: Acido nalidíxico	1962	Subproducto cloroquina	de Actúan sobre dos enzimas diferentes, la ADN girasa y la topoisomerasa IV
Fosfomicina	1969	<i>Streptomyces</i>	Inactiva la enzima enolpiruvatotransferasa e inhibe la síntesis de peptidoglucano
Oxazolidinonas: Linezolid	1978	Sintético	Inhibe de la síntesis de proteínas al unirse de forma reversible a la subunidad 50S

Entre 1940 y 1970 hubo una explosión de descubrimientos de antibióticos para uso en medicina humana. Posteriormente, la situación comenzó a cambiar y se dio una rápida caída en la introducción de nuevos antibióticos.¹²

Ante la progresión de la RAM en el 2015 fue aprobado el Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos por la Asamblea Mundial de la Salud y posteriormente refrendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Desde su implementación los países han intensificado considerablemente su respuesta a la resistencia a los antimicrobianos, en abril de 2021 había 107 países inscritos en el Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (GLASS por sus siglas en inglés). Este sistema, creado en 2015, fomenta y sustenta un enfoque normalizado de la recopilación, el análisis y el intercambio de datos sobre la RAM a nivel mundial, y apoya a los países a establecer sistemas nacionales de vigilancia.¹³

Para el año 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo público un informe sobre el estado de la investigación de nuevas moléculas tanto tradicionales, como no tradicionales en fases de ensayo preclínico y clínico.¹⁴

2. La resistencia a los antimicrobianos

Desde la introducción de los antibióticos se observó la presencia de organismos capaces de sobrevivir a ellos, lo cual llevó a pensar que la resistencia a los antimicrobianos se desarrollaba dentro de los dos o tres años después de la introducción de un nuevo tratamiento. Esto se hizo más evidente en la evolución constante de las betalactamasas bajo la presión selectiva con introducciones sucesivas de nuevas penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas resistentes a betalactamasas.^{15,16}

Sin embargo, los análisis realizados en aislamientos históricos con herramientas de genómica poblacional, indican que la resistencia ha evolucionado mucho antes de lo que pensábamos. Las poblaciones de patógenos resistentes a los medicamentos son

descendientes de muy pocos clones que tienen la capacidad de propagarse rápidamente en grandes áreas.¹⁶

Un ejemplo es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). El primer MRSA se informó en 1961, un año después de la introducción del fármaco para uso clínico. Los análisis genómicos de la población de los principales linajes clonales de MRSA han proporcionado información sobre su diseminación espacial y evolución. Una cepa de MRSA asociada a la atención médica, denominada EMRSA-15, presente en Europa, Australia y partes de Asia se reportó en 1991, pero según la variación de la secuencia genómica se ha propuesto que su aparición fue en Reino Unido en los años 1970.¹⁷

Los análisis filogenéticos basados en la secuencia del genoma de EMRSA-15 demostraron que adquirió resistencia a fluoroquinolonas a principios de la década de 1980 en la ciudad de Birmingham en el Reino Unido. Lo anterior sugiere que dicha resistencia surgió en ensayos clínicos que se realizaron en varios hospitales en el área, antes de autorizar su uso general.¹⁷

En síntesis, hoy es claramente sabido que la resistencia es parte de procesos evolutivos, y el efecto de la presión selectiva que generamos al introducir el uso masivo de un antibiótico favorece la selección de microorganismos que, a través de múltiples estrategias pueden evitar el efecto tóxico de estas sustancias.

Este fenómeno se ha convertido en uno de los desafíos clave que enfrenta la medicina, ya que hay un número creciente de pacientes críticos que mueren como resultado de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. La OMS ha proyectado que para el año 2050 o aún antes debido a la pandemia causada por el Sars-CoV2 que ha acelerado la diseminación intra hospitalaria de resistencias, más personas podrían morir por infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos que por cáncer.¹³

Otros factores que aportan a esta problemática son el crecimiento de la población, el aumento de la urbanización, los hospitales superpoblados, la contaminación de las escasas fuentes de agua, y la industrialización de la cría de animales. La tendencia alarmante y creciente de la resistencia a los antibióticos en los hospitales es el resultado del uso excesivo e inapropiado de antibióticos por parte de los médicos.¹³

3. Desarrollo de nuevos antimicrobianos

Se considera como antibiótico a la molécula cuyos receptores o moléculas blanco son las proteínas microbianas. Estas serían el sitio en que actuaría el antibiótico sobre componentes esenciales de sus reacciones químicas, interfiriendo rutas fisiológicas con un efecto bacteriostático o bactericida. La clasificación de los antibióticos se basa en la clase y el espectro de microorganismos que afectan, la vía bioquímica que interfieren y la estructura química de la molécula.^{8,18}

En general, muchos fármacos se obtuvieron de la observación de sus efectos sin conocer su mecanismo ni su sitio de acción. Actualmente el desarrollo de nuevos fármacos sigue la estrategia contraria, comienza con un planteamiento o hipótesis de que la intervención crítica de una proteína o vía tienen un efecto en la patogenia de alguna enfermedad y que, al alterar su actividad, esta se interrumpe.¹⁹

El primer paso es obtener una posible molécula que interactúe con moléculas efectoras válidas y modifique sus funciones de la forma esperada. Como siguiente paso dentro de la investigación preclínica, se debe considerar los aspectos de la molécula que tienen que ver con su afinidad y selectividad para interactuar con la molécula blanco, propiedades farmacocinéticas como la absorción, distribución, metabolismo y excreción, y además aspectos de su síntesis o purificación a gran escala y sus propiedades farmacéuticas como estabilidad, solubilidad, e inocuidad.⁸

Antes de administrar a seres humanos el medicamento con posible acción terapéutica, la compañía que realiza la investigación debe llenar una solicitud de Fármaco Nuevo en Investigación (IND, por sus siglas en inglés) que es una solicitud dirigida a la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) para obtener el respectivo permiso de realizar ensayos clínicos. En esta solicitud se describen las bases teóricas y las pruebas preliminares de eficacia de los sistemas experimentales, así como la farmacología y toxicología, y además se describe el plan para realizar la investigación en seres humanos.²⁰ Los ensayos clínicos normados por la FDA se realizan en 4 fases. En la primera se da el descubrimiento del fármaco y se eligen las moléculas candidatas en función de sus propiedades farmacológicas. En la fase dos o desarrollo preclínico, se realizan estudios en

modelos animales que comprenden pruebas de toxicidad, análisis farmacocinético y farmacodinámico, así como su formulación.^{8,20}

En la fase tres o desarrollo clínico, se prueba la eficacia, los efectos secundarios y los peligros potenciales que el fármaco seleccionado provoca en voluntarios sanos y en pacientes. En síntesis, las primeras tres fases están planteadas para definir la seguridad, inocuidad y eficacia de la molécula.^{8,20}

Por último, la fase cuatro, después de un estudio de mercado, define la información adicional sobre nuevas indicaciones, riesgos, dosis y posología óptima.^{8,20}

El proceso de desarrollo por tanto es largo, costoso y arriesgado. En consecuencia, los costos de cada producto se fijarán para que se recuperen las inversiones realizadas para financiar los intentos de comercialización necesarios para la introducción de nuevos productos en la práctica clínica.²⁰

La OMS señala varios factores científicos y económicos que desincentivan el desarrollo de nuevos antibióticos. Uno de ellos es el mercado reducido, ya que por lo general estos fármacos se administran durante dos a quince días, lo que reduce el incentivo económico. Además, la identificación de nuevas dianas para la acción de los antibióticos ha resultado difícil. En su mayoría, los nuevos antibióticos son variantes químicas, y en consecuencia, la resistencia aparece rápidamente. Por otra parte, el desarrollo de nuevas moléculas conlleva el riesgo de que estas sean retiradas del mercado por efectos tóxicos inesperados, lo que frena el desarrollo de nuevos fármacos.²⁰

La asociación público-privada de la comisión de la Unión Europea, seis empresas de la Federación Europea de Industrias y Asociaciones Farmacéuticas (EFPIA), y la Iniciativa de Medicamentos Innovadores (IMI), están abordando el problema a través del costo compartido de desarrollo, mediante el cual los contribuyentes europeos están cofinanciando programas preclínicos y clínicos seleccionados.²¹

Por su parte Estados Unidos ha adoptado un enfoque diferente, resumido en la Ley de generación de incentivos antibióticos ahora (GAIN), promulgada por el Congreso en el año 2012. En este documento, a los programas clínicos seleccionados (medicamentos, formulaciones, indicaciones) se les otorga un estado calificado de producto de

enfermedades infecciosas, bajo el cual la FDA resuelve rápidamente las nuevas solicitudes de medicamentos para su aprobación, y los patrocinadores reciben una exclusividad de mercado adicional de 5 años para fomentar la investigación y el desarrollo.²¹

Una alternativa prometedora desde el punto de vista de la rentabilidad es la reutilización de farmacoterapias descubiertas previamente (a menudo aprobadas por la FDA) que podría proporcionar una búsqueda potencialmente menos riesgosa económicamente que el descubrimiento de medicamentos *de novo*.^{21,22}

Este enfoque ya ha sido evidente con el regreso del uso de colistina y fosfomicina para las infecciones por gramnegativos resistentes a múltiples fármacos, la reutilización de medicamentos más antiguos para bacterias como *Acinetobacter baumannii* y la consideración más generalizada del ácido fusídico en la práctica clínica en algunos países desde la década de 1960. Los incentivos que abogan por el descubrimiento de nuevos medicamentos, incluidos los mecanismos para acelerar los ensayos clínicos, y hacer que estos medicamentos sean atractivos para la producción industrial podrían necesitar adaptarse a dichos medicamentos reutilizados.²²

Otra estrategia propuesta es reducir los costos del desarrollo de medicamentos y los riesgos para las empresas que participan en ellos. Según el Boston Consulting Group, no solo lleva más de diez años llevar un nuevo medicamento al mercado ahora, sino que los costos incurridos son muy superiores a mil millones de dólares y de estos la fase tres representa más de la mitad del costo del desarrollo de fármacos. Lo anterior motiva la búsqueda de alternativas económicas en este sector sin comprometer la seguridad del paciente.²³

Los estudios necesarios para evidenciar la seguridad y la eficacia están esencialmente completos al final de la fase dos, mientras que en un ensayo clínico de fase tres, la eficacia de un nuevo fármaco se compara con la del tratamiento estándar, en una escala mucho más amplia que en la fase dos, pero buscando la no-inferioridad. Por lo tanto, una propuesta es reemplazar los ensayos de fase tres, por ensayos clínicos de fase 2b más grandes y extensos con el fin de proporcionar a los pacientes los medicamentos que necesitan con mayor rapidez y a un costo menor.²³

La crisis mundial del COVID-19 ha dejado lecciones sobre las implicaciones sanitarias y económicas de una pandemia no controlada. "Hay que aprovechar las oportunidades que surgen de la pandemia de COVID-19 para poner sobre la mesa la necesidad de realizar inversiones sostenibles en Investigación y Desarrollo (I+D) de antibióticos nuevos y eficaces", explica el director de Coordinación Mundial de la resistencia antimicrobiana de la Organización, Haileyesus Getahun.²⁴

Para mejorar las deficiencias financieras e impulsar las inversiones sostenibles en el desarrollo de antibióticos, la OMS y su socio Drugs for Neglected Diseases Initiative (Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Desatendidas) han creado la Global Antibiotic R&D Partnership con el objetivo de promover la investigación y desarrollo de tratamientos innovadores.²⁴

Una forma de generar la base de evidencia necesaria para informar las políticas para el manejo de la resistencia a los antibióticos es mediante el uso de modelos matemáticos. Estos modelos pueden explicar los impulsos clave de la dinámica de la transmisión de resistencia a partir de infecciones complejas y procesos evolutivos, así como predecir respuestas probables al cambio de políticas.^{25,26}

La presencia de un antibiótico selecciona una mayor frecuencia de organismos resistentes a ese antibiótico, porque la resistencia al tratamiento confiere a esas cepas un beneficio sobre las cepas susceptibles. Muchos modelos han asumido que los genes de resistencia imponen costos a las bacterias que los transportan, lo que resulta en bacterias resistentes que tienen menor aptitud en ausencia de antibióticos. En consecuencia, la fuerza de la selección para la resistencia depende del equilibrio entre los beneficios y los costos de la resistencia.²⁵

Además, la transmisión entre hospederos de cepas bacterianas resistentes, a diferencia de la mutación de *novo* o la adquisición horizontal de genes de resistencia por bacterias, es un factor importante en el mantenimiento de la resistencia a los antibióticos. Estos principios se articulan naturalmente dentro de modelos matemáticos que capturan los procesos dinámicos de transmisión, colonización y tratamiento.²⁶

El modelo propuesto por McAdams (2017) es un modelo económico-epidemiológico simple de diagnóstico de enfermedades y uso de antibióticos que sirve para resaltar cómo los avances en la tecnología de Diagnóstico de Resistencia en el Punto de Atención cambian las compensaciones económicas asociadas con tratamiento.²⁶

Cuando hay múltiples antibióticos disponibles y aún no han surgido bacterias totalmente resistentes en la población que causa la enfermedad, la adopción de métodos de diagnóstico en el punto de atención puede por lo tanto retrasar el aumento de la resistencia.²⁷

Una medida clave que puede tener éxito en la lucha contra la resistencia a los antibióticos es su rápida identificación y caracterización en los pacientes afectados, de modo que su propagación, en particular en el ámbito hospitalario, pueda controlarse desde el principio. De hecho, un reciente editorial indicó: *“Un buen lugar para enfocar la acción urgente es la demora entre el plazo en que una persona se enferma y recibe un tratamiento efectivo. Acortar ese tiempo reduciría la prescripción innecesaria, minimizaría la propagación de la resistencia y, lo más importante, daría a las personas la mejor oportunidad de recuperación”* (Nature Editorial, 17 de octubre de 2018).²⁷

Capítulo II: Alternativas terapéuticas en desarrollo

1. Nuevas moléculas

Desde el año 2017 la FDA ha aprobado el uso de once nuevos antibióticos, uno de ellos para el tratamiento de la tuberculosis XDR-TB (Pretomanid). Otras cinco moléculas son modificaciones químicas de antimicrobianos ya conocidos cuyo objetivo son patógenos de prioridad media-alta en la lista de la OMS, tres derivados de fluoroquinolonas (delafloxacin, lascufloxacin y levonadifloxacin) y dos derivados de tetraciclinas (evariciclina y omadaciclina). ¹⁴

Las moléculas químicamente novedosas incluyen el Vaborbactam que se utiliza combinado con el meropenem y tienen actividad contra cepas productoras de la carbapenemasa tipo KPC, y la Lefamulina que es de uso veterinario. ¹⁴

Entre el año 2019 y 2020 fueron aprobados el cefiderocol, un betalactámico capaz de penetrar la membrana y acumularse en el espacio periplásmico de los Gram negativos que expresan betalactamasas, AmpC y BLEE, y por último el lascufloxacin y levonadifloxacin, ambos derivados de fluoroquinolonas con actividad contra Gram positivos asociados a infecciones de vías respiratorias. ¹⁴

Según el informe de OMS para el 2020, hay setenta antibióticos en fase clínica, cuarenta y tres de ellos corresponden a variantes de fármacos ya conocidos y veintisiete corresponden a agentes innovadores, como moduladores del microbioma, anticuerpos y derivados de fagos. La cartera de antibacterianos en fase preclínica actual es mucho más amplia, consta de 407 proyectos muy diversos con propuestas innovadoras, la mayoría de las cuales provienen de pequeñas y medianas empresas. Sin embargo, estos proyectos son vulnerables ya que tienen poco acceso a tecnologías novedosas, conocimientos especializados limitados, y no cuentan con apoyo económico. ^{29,30}

2. Alternativas no tradicionales

Los productos naturales novedosos o subexplotados con actividad antimicrobiana a menudo exhiben nuevos mecanismos de acción, por lo que podrían convertirse en

alternativas terapéuticas que modifiquen el estado de la resistencia actual. Existe una creciente necesidad de investigar nuevas opciones con potencial terapéutico, y esto se refiere no solo a estudios de su mecanismo de acción y eficacia, sino también a propiedades farmacéuticas, que pueden mejorarse significativamente mediante la exploración de nuevos análogos naturales, química medicinal o enfoques de ingeniería genética para la optimización de nuevas estructuras antibacterianas.²⁸

Una de las ventajas de los nuevos mecanismos de acción es que minimizan directamente la probabilidad de una resistencia preexistente y pueden prevenir un rápido desarrollo de resistencia entre los patógenos. El análisis de las bibliotecas existentes para reutilizar medicamentos como antibióticos o el reinicio de la investigación sobre posibles antibióticos olvidados puede ser visto como un enfoque alternativo.²⁸

Las nuevas propuestas no tradicionales actualmente en etapa preclínica se resumen a continuación.

Cuadro 2. Nuevos antimicrobianos no tradicionales en etapa preclínica.^{14,29,30}

Terapia antimicrobiana	Proyectos	Estrategia	Objetivos terapéuticos	Desafíos
Fagos y péptidos derivados (endolisinas)	33	Específica de especie (terapia personalizada)	P. aeruginosa S. aureus Clostridioides	Producción, estabilidad, control de pureza y calidad.
Moduladores de la microbiota	21	Probióticos mejorados. AMP expresados en fagos	Inactivación antibióticos Absorción de toxinas bacterianas Clostridioides	de Sistemas complejos basados en ingeniería de genética. Conocimiento incompleto del microbioma humano
Anti virulencia	33	Inhibición de biopelículas, adhesión	P. aeruginosa S. aureus Enterobacterias	Sistemas avanzados de atención diagnóstica. y
Anticuerpos Ac-fármaco	29	Tratamiento preventivo complementario	o P. aeruginosa S. aureus Clostridioides Acinetobacter K. pneumoniae	Falta de pruebas preclínicas fiables y modelos predictivos. Demostrar eficacia y valor clínico de la terapia adyuvante
Vacunas	27	Tratamiento preventivo	S. aureus Acinetobacter K. pneumoniae N. gonorrhoeae Salmonella spp	Falta de pruebas preclínicas fiables y modelos predictivos. Demostrar eficacia y valor clínico de la terapia adyuvante.

Alternativamente se encuentran en la literatura otras moléculas con actividad antimicrobiana probada *in vitro*. Algunos de ellos se describen a continuación.

A. Nanopartículas

Existen 18 proyectos de nanopartículas en fase preclínica. Los nanobióticos poseen actividad antibacteriana, mientras que las partículas y los polímeros sintéticos funcionan como vectores.¹⁴

Las nanopartículas de plata (AgNP) se estudian como agentes antimicrobianos. Se ha propuesto que estos experimentan una oxidación lenta y como resultado se liberan iones de plata que inhiben la replicación del ADN y la expresión de subunidades ribosómicas, inactivando algunas proteínas celulares y enzimas necesarias para la producción de adenosina trifosfato (ATP). Según otra hipótesis, los iones de plata detienen la función normal de las enzimas que contienen grupos tiol como la NADH-deshidrogenasa II en el sistema respiratorio, que se conoce como el sitio de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) *in vivo*.³¹

Otra propuesta es que la carga positiva en los iones de plata liberados de las nanopartículas juega un papel importante en la actividad antimicrobiana a través de la atracción electrostática entre las nanopartículas cargadas positivamente y las membranas celulares de microbios cargadas negativamente, lo que afecta la permeabilidad y la respiración.³²

B. Derivados de plantas

La mayoría de los compuestos vegetales son metabolitos secundarios y se producen como resultado de interacciones recíprocas entre plantas y microbios, donde contribuyen a una mayor supervivencia de las plantas en entornos locales y a la defensa de los microorganismos patógenos. Los principales grupos de antimicrobianos derivados de plantas incluyen polifenoles, alcaloides, flavonoides, terpenoides, lectinas, taninos y saponinas.³³

Los compuestos vegetales actúan principalmente al desintegrar las paredes celulares bacterianas y las membranas celulares, lo que conduce a la fuga del contenido

celular, la interrupción de la fuerza motriz del protón, la bomba de flujo de salida y la disfunción enzimática, que finalmente causa la muerte celular. El principal efecto antimicrobiano de derivados de plantas proviene de sus componentes hidrofóbicos, que alteran las proteínas de la membrana celular y las estructuras asociadas y las hacen más permeables. Esta característica le permite modular las estrategias de resistencia a los antibióticos y les confiere efectos sinérgicos.³³

C. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos bioactivos (AMP), constituyen un grupo heterogéneo de péptidos con grandes variaciones de tamaño, estructura y modo de acción. En las bacterias gramnegativas, la mayoría de las bacteriocinas se han caracterizado a partir de *E. coli* y otras enterobacterias, y a menudo se las denomina microcinas (péptidos pequeños) o colicinas (proteínas más grandes). En las bacterias se sintetizan en el ribosoma y se liberan extracelularmente. Los mecanismos de acción se basan en la interacción electrostática de la bacteriocina cargada positivamente y la superficie de la membrana bacteriana cargada negativamente con la consecuente formación de poros en la membrana que generan cambios en la permeabilidad celular que llevan a la muerte de las bacterias.^{34,35}

Se ha propuesto la existencia de receptores específicos en células sensibles, un ejemplo de esto son los lantibióticos (bacteriocinas de clase I) utilizan la molécula precursora de la pared celular, el lípido II como molécula de acoplamiento a las células diana.³⁴ La efectividad de las bacteriocinas ha alentado el uso de estas moléculas en la inhibición de patógenos durante los procesos biotecnológicos.^{35,36}

Las bacteriocinas como fuente de nuevos antibióticos tienen las ventajas de la diversidad, objetivos específicos, se consideran seguras, y poseen la capacidad de actuar de forma sinérgica con los antibióticos. Sin embargo, dependiendo de su tamaño, pueden ser susceptibles a las enzimas proteolíticas.³⁴

D. Selvamicina

La Selvamicina es un macrólido poliénico con actividad antifúngica, descubierto en las bacterias que se encuentran en hormigas que cultivan hongos, estas bacterias protegen los nidos de las hormigas contra los patógenos fúngicos. Este compuesto tiene similitud con antifúngicos nistatina A y anfotericina B. ³⁷

La Selvamicina posee la actividad antifúngica contra *Candida albicans* (MIC 23μM), similar en un panel de hongos para *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma harzianum*, pero no se detectó actividad antibacteriana. Sin embargo, es un claro ejemplo de cómo el estudio sistemático de moléculas producidas por otros organismos continúa descubriendo compuestos antimicrobianos potencialmente útiles.³⁷

E. Veneno de serpientes

Los venenos de serpiente constituyen una biblioteca bioquímica dinámica de moléculas estructural y funcionalmente diversas, con un amplio repertorio de actividades que van desde la capacidad letal hasta las aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas. La diversidad biológica y química de los compuestos de veneno ha desempeñado un papel crucial en el desarrollo de diferentes medicamentos disponibles como herramientas terapéuticas y moleculares utilizadas con fines de investigación.³⁸

Debido a este potencial terapéutico los esfuerzos se han centrado en aislar y caracterizar los compuestos activos responsables de actividades antibacterianas, antitumorales, e inmunomoduladoras. Este es el caso de la L-aminoácido oxidasa (LAAO) y las fosfolipasas A₂ (PLA₂), las metaloproteinasas, cardio-, neuro- o miotoxinas, desintegrinas y lectinas. Estos compuestos exhiben varios mecanismos de acción, incluida la acción tóxica directa (PLA₂), la generación de radicales libres (LAAO), la inducción de apoptosis (PLA₂, LAAO y metaloproteinasas) y la anti-angiogénesis (desintegrinas y lectinas). Los AMP y péptidos anticancerígenos (ACP) completan este arsenal de componentes antiinfecciosos y antitumorales. ^{39,40}

El captopril, un antihipertensivo desarrollado con base en péptidos obtenidos del veneno de *Bothrops jararaca*, es un ejemplo de las aplicaciones farmacéuticas de los

derivados de venenos de serpiente, que actúa como inhibidor del sitio activo de la enzima convertidora de angiotensina. Otros fármacos como el Tirofiban (*Echis carinatus*), Integrilina (*Sistrurus miliarus barbouri*), Reptilasa (*Bothrops atrox* y *B. moojeni*), son derivados de venenos de serpientes que han sido aprobados por la FDA para uso clínico y otras moléculas se encuentran en ensayos preclínicos.⁴¹

Capítulo III Potencial antimicrobiano de los venenos de serpiente

El uso de veneno de serpiente se ha documentado desde la antigüedad. Su uso como medicina se ha informado desde el siglo VII para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y artritis. En la Antigua Grecia filósofos y médicos escribieron sobre las acciones farmacológicas del veneno de serpiente.³⁸

El potencial antibiótico de los venenos de diferentes familias de serpientes ha sido discutido en varios trabajos. Las bibliotecas bioquímicas a partir de las cuales se pueden estudiar estos mecanismos antibióticos incluyen, fosfolipasas A₂, las L-aminoácido oxidasas, las lectinas tipo C, las metaloproteasas, las catelicidinas, las cardiotoxinas, la crotamina, las proteínas secretoras ricas en cisteína, las desintegrinas y las serina proteasas, principalmente.⁴¹

Las fosfolipasas se encuentran entre las proteínas de veneno antibacterianas mejor estudiadas y caracterizadas, estas independientemente de su papel catalítico, exhiben múltiples actividades biológicas de interés farmacológico.^{40,41}

a. Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

Las fosfolipasas A₂ son enzimas ubicuas, multifuncionales y con potencial farmacológico importante. Por ser proteínas biológicamente activas con una gran diversidad funcional, han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de hidrolizar sustratos específicos e inducir cambios en la permeabilidad de la membrana por efecto de la hidrólisis catalítica dependiente de Ca²⁺ del enlace éster *sn*-2 de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos.⁴²

Distintas variantes de estas enzimas presentan una gran diversidad de actividades biológicas y farmacológicamente relevantes a pesar de sus altas similitudes tridimensionales.⁴³

Los venenos de serpiente contienen PLA₂s de los grupos IA y IIA encontrados en las familias Elapidae y Viperidae respectivamente. Las svPLA₂ que pertenecen al grupo II se

pueden subdividir en dos tipos principales, comúnmente conocidos como isoformas Asp49 que son toxinas que muestran actividad catalítica, e isoformas Lys49 que son catalíticamente inactivas.⁴²

La presencia y abundancia de svPLA₂s con propiedades antibacterianas en los venenos pueden conferir importantes ventajas evolutivas para las serpientes, como la disminución de la descomposición de las presas por bacterias al exponerse a materia orgánica y la protección de las glándulas del veneno contra las infecciones bacterianas.^{43,44}

A continuación, se resumen las principales svPLA₂s encontradas en la literatura, su origen y espectro de acción antimicrobiano *in vitro*.

Para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* se utilizaron diferentes métodos, uno de ellos descrito por Páramo (1998), utiliza bacterias en fase logarítmica de cultivos de TSB con una concentración de 4×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) / mL, estas se incuban con 10 μ L de concentraciones variables de péptidos durante 20 min a 37° C. Posteriormente se siembran en agar tripticasa de soja o sangre y se realiza un conteo de las bacterias viables después de 24 h de crecimiento a 37°C.⁴⁵

El método descrito por Oliveira (2002) utiliza una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^3 UFC/mL. Las PLA₂ se ajustaron para una concentración de 250 μ g/mL, se incubó una alícuota de 500 μ L de esta solución de proteína con 500 μ L de suspensión bacteriana durante 1 hora a 28 °C. Posteriormente se siembran en agar nutritivo y se realiza un conteo de las bacterias viables después de 24 h de crecimiento a 37°C.⁴⁶

Cuadro 3. PLA₂s con actividad antibacteriana de venenos de serpiente ^{39,46,47,48,49,50,51}

	PLA ₂	Especie de serpiente	Espectro actividad
Isoforma PLA ₂ Lys 49	Basic PLA ₂	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	<i>E. coli</i>
	mt - I	<i>Bothrops nummifer</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - II	<i>Bothrops godmani</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - I	<i>Bothrops schlegelii</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - II	<i>Bothrops asper</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - IV	<i>Bothrops asper</i>	<i>S. typhimurium</i>
	BthTX - I	<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>Xanthomonas axonopodis. pv. passiflorae</i>
	MjTX - II	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>E. coli</i>
	BFPA	<i>Bungarus fasciatus</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
	MTX - II	<i>Bothrops brazillii</i>	<i>E. coli</i>
	CoaTx-II	<i>Crotalus oreganus abyssus</i>	<i>P. aeruginosa</i> 31NM <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> BEC 9393
	BnuTX - I	<i>Bothrops neuwiedi urutu</i>	<i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853) <i>K.pneumoniae</i> (ATCC 13883)
	LmutTX	<i>Lachesis muta muta</i>	MRSA y <i>P. aeruginosa</i>
Isoforma PLA ₂ Asp 49 básica	mt - I	<i>Bothrops godmani</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - I	<i>B. asper</i>	<i>S. typhimurium</i>
	mt - III	<i>B. asper</i>	<i>S. typhimurium</i>
	BnpTX - I	<i>Bothrops pauloensis</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
	BnpTX - II	<i>B. pauloensis</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
	BthTX - II	<i>B. jararacussu</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
	OS2	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	<i>E. coli</i>
	MTX - I	<i>Bothrops brasiliense</i>	<i>E. coli</i>
	VRV - PL - V	<i>Daboia russellii</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> ,
	VRV-PLVIIIa	<i>pulchella</i>	<i>V. cholerae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Isoforma PLA ₂ Asp 49 ácida	BthA - 1	<i>B. jararacussu</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>
	Daboia toxina (DbTx)	<i>Daboia russelli siamensis</i>	<i>B. pseudomallei</i> (cepas KHW y TES) y <i>S. aureus</i>
	PnPLA ₂	<i>Porthidium nasutum</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 y ATCC 29213
	BmooPLA ₂	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>
	NN - XIb - PLA ₂	<i>Naja naja</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. paratyphi</i>

Mulgatoxina	<i>Pseudechis australis</i>	<i>B. pseudomallei</i> (cepas KHW y TES)
Mb - PLA ₂	<i>Montivipera bornmuelleri</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>
WaPLA ₂	<i>Walterinnesia aegyptia</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. enterica</i>

Los mecanismos moleculares que sustentan el efecto antibacteriano de las svPLA₂s son variados. Las proteínas antimicrobianas catiónicas ejercen su efecto inhibidor bacteriano a través de un proceso de adelgazamiento y desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana, lo que resulta en la permeabilización y la salida del contenido celular. En el caso de las proteínas antibacterianas aniónicas, se propone una interacción entre el grupo de la cabeza del fosfolípido y los lípidos que tendría un efecto similar: la lisis bacteriana. Además de la lisis, se ha propuesto que las svPLA₂ también inhiben la biosíntesis de macromoléculas y promueven la expresión de enzimas autolíticas.^{43,44,45}

El efecto de estas toxinas sobre monocapas y bicapas lipídicas se ha estudiado experimentalmente. Usando modelos de liposomas de células bacterianas, se determinó que las interacciones electrostáticas son importantes para la unión inicial del péptido a la membrana, mientras que las interacciones hidrofóbicas y la composición de la membrana parecen cruciales para la posterior lisis mediada por péptidos de las membranas celulares.^{43,44,45}

Según la base de datos NCBI, hay aproximadamente treinta y cinco svPLA₂ caracterizadas y descritas en la literatura con respecto a sus propiedades antibacterianas. Poseen una masa molecular de aproximadamente 14 kDa y muestran una alta similitud en su estructura primaria, compartiendo regiones altamente conservadas, como el sitio activo y la región de unión al calcio. La mayoría son básicas, con muchas regiones catiónicas en su estructura. Estos dominios catiónicos son importantes para la actividad antimicrobiana, y las regiones con mayor potencial antibacteriano en svPLA₂ son las regiones C-terminales cargadas positivamente.³⁸

b. Péptidos antimicrobianos (AMP)

Los AMP se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Son importantes moléculas de la inmunidad innata que protegen al hospedero de la infección. Según la base de datos de péptidos antimicrobianos (APD) a febrero del 2020, se encontraban 3167 AMP registrados. Estos son principalmente péptidos naturales descubiertos después de 1980, de los cuales 553 AMP tienen actividad contra bacterias principalmente Gram positivas y 316 contra bacterias Gram negativas.³⁵

La familia más grande de péptidos antimicrobianos derivados de venenos de serpientes descrita hasta la fecha son las catelicidinas, un grupo de péptidos bioactivos estructuralmente diversos con funciones antimicrobianas, anticancerígenas e inmunomoduladoras. A continuación, se resumen las catelicidinas identificadas hasta la fecha su origen y sus propiedades, todas ellas con actividad hemolítica variable.³⁵

Cuadro 4. Catelicidinas derivadas de venenos de serpiente con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas ³⁶

Origen	Catelicidina
Ophiophagus Hannah	Oh-CATH Oh-CATH
Bungarus fasciatus	Bf-CATH30
Naja atra	Na-CATH
Hydrophis cyanocinctus	Hc-CATH
Crotalus durissus terrificus	Cdt-CATH
Bothrops atrox	Ba-CATH
Pseudonaja textiles	Pt-CATH1 Pt-CATH2
Python bivittatus	Pb-CATH1 ΔPb-CATH1 Pb-CATH2
	ΔPb-CATH2 Pb-CATH4
	ΔPb-CATH4
Sinonatrix annularis	Sa-CATCH

c. Péptidos sintéticos

La construcción de moléculas farmacológicamente activas, así como el estudio de la relación estructura-función de proteínas a partir de péptidos sintéticos son considerados herramientas muy importantes en la investigación biomédica actual, debido a la automatización de las técnicas de síntesis y con esto la reducción de costos.⁵²

Estudios realizados con miotoxinas en el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, presente en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae*, han demostrado que péptidos sintéticos a partir de fosfolipasas A₂ tipo Lys49, pueden ser sintetizados (segmento de 13 aminoácidos, ubicados cerca de su extremo carboxiloterminial).⁵³

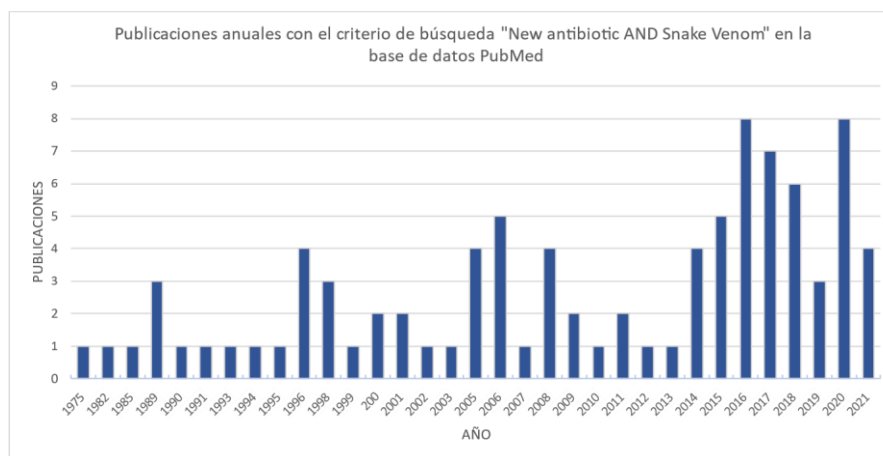
Estos péptidos C-terminales Lys49 inducen citotoxicidad y actividad antimicrobiana *in vitro* utilizando el método descrito por Páramo (1998) así como mionecrosis y edema en animales de experimentación.^{43,44,45}

Capítulo IV Investigación reciente sobre el uso de venenos de serpiente como antimicrobianos

El problema de la resistencia a los antibióticos ha dado lugar a un aumento de los estudios sobre búsqueda de nuevos antibióticos. Antes de 1990 el 13% de la literatura sobre antibióticos se refería a la resistencia (según el análisis de publicaciones en PubMed con las palabras clave "new antibiotic" and "snake venom"). Después de 1990, la literatura relacionada con la resistencia a los antibióticos aumentó más del doble (31%).⁵⁴

1. Estado actual de publicaciones

De acuerdo con el análisis de publicaciones de PubMed con las palabras “nuevo antibiótico” y “veneno de serpiente” hay un aumento importante en la búsqueda e investigación de nuevas moléculas a partir de proteínas del veneno de serpientes por su conocida toxicidad celular. En el siguiente gráfico generado a partir de los datos de 81 publicaciones de PubMed entre el año 1975 y 2021 podemos evidenciar esta tendencia.



Fuente:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=NEW+ANTIBIOTIC+AND+SNAKE+VENOM&timeline=expanded>

Figura 1. Publicaciones según el criterio de búsqueda para nuevos antimicrobianos a partir de venenos de serpiente en la base de datos PubMed entre los años 1975-2021

Entre el año 2013 y 2021 se realizó el 50% de estas publicaciones, lo cual se explica por el impacto tan importante que tiene la resistencia a antibióticos en la salud pública y el interés de ciertos grupos de investigación por buscar opciones en terapias no tradicionales, que permitan darle un nuevo enfoque al tratamiento de las enfermedades infecciosas.

2. Estado actual de patentes

Al lado de este aumento, analizamos con los mismos parámetros de búsqueda la publicación de patentes. Actualmente en esta base de datos se puede consultar el estado de tres patentes, se describe a continuación el fundamento y el avance de estas.

2.1 “Extracto de veneno de serpiente capaz de sustituir al antibiótico y al método de preparación y aplicación de este”. Código CN104000851B ⁵⁵

Esta patente se originó en la Universidad Tecnológica del Sur de China, su objetivo es sustituir el uso de antibióticos en ganado y aves de corral con un tratamiento alternativo para las infecciones veterinarias causadas por *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp. a la vez reducir el impacto ambiental que el uso de antibióticos genera.

Se utiliza veneno de cobra liofilizado, el extracto se obtiene después de varios de pasos de adsorción en resina de intercambio iónico para eliminar la fibrolisina ácida, ultrafiltración para eliminar los componentes neurotóxicos, y una nanofiltración para reducir la salinidad, en diferentes protocolos para probar el mayor rendimiento en la recuperación del componente antimicrobiano.

El extracto se ha probado *in vitro* usando como control positivo gentamicina y se obtiene inhibición de crecimiento bacteriano. Para los ensayos se utilizan aislamientos de *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp. (10⁸ UFC/mL) obtenidas de muestras diarreicas de cerdos y aves de corral, con diluciones de diferentes concentraciones del extracto de veneno de cobra en solución salina. Como resultado se obtuvo una CIM de 1 µg/mL con el extracto de veneno.

También se han realizado pruebas *in vivo* agregando 0,01g/kg en el agua potable para consumo e inyectando por vía intramuscular (I.M.) con una dosis de 0.1mg/Kg/día durante 3 días animales enfermos, se obtienen buenos resultados con baja toxicidad, sin mortalidad.

La solicitud de esta patente fue presentada en el año 2014 y aprobada en el 2017, su estado es activo al momento de presentar este documento y tiene vigencia hasta el 2034.

2.2 “Péptido antibiótico de catelicidinas de reptil, derivados, y su aplicación” Código CN101265296A ⁵⁶

Esta patente fue presentada por el Instituto de Zoología de Kunming de CAS, en China. Su objetivo es obtener catelicidinas a partir de la glándula de veneno de la serpiente Cobra india con el fin de investigar su efecto antimicrobiano en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes en humanos y a nivel veterinario.

Se selecciono el AMP con la secuencia (*Naja naja*):

SEC ID No.1: Val Lys Arg Phe Lys Lys Phe Phe Lys Lys Leu Lys Asn Ser Val Lys Lys Arg AlaLys Lys Phe Phe Lys Lys Pro Lys Val Ile Gly Val Thr Phe Pro Phe.

Otras secuencias con funciones equivalentes seleccionadas para el estudio presentan algunas modificaciones químicas (amidación, acetilación, glicosilación).

La purificación de péptido se realizó por cromatografía HPLC en una columna de C18, la identificación por medio de FAB-MS (fast-atom bombardment mass spectrometry), se determina la estructura por medio de secuenciación.

No se tienen datos en la presente invención de pruebas sobre la actividad antimicrobiano de los péptidos extraídos, solamente el protocolo de extracción de diferentes ensayos.

La solicitud de esta patente fue presentada en el año 2008 y aprobada en el 2011, su estado es activo al momento de presentar este documento y tiene vigencia hasta el 2028.

2.3 “Fosfolipasas y uso de estas” Código US20070128179A1 ⁵⁷

La tercera patente fue presentada por la Universidad de Singapur en el 2005, su objetivo es el estudio de un posible tratamiento con dosis terapéuticas de PLA₂s, isoformas o fragmentos de éstas, para tratar infecciones bacterianas en humanos.

Las fosfolipasas se obtuvieron a partir del veneno de las siguientes especies: *Daboia russelli russelli*, *Daboia russelli siamensis*, *Daboia russelli pulchella*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus durissus terrificus*, *Pseudechis australis*, *Agkistrodon halys*, *Pseudechis guttata*, *Bitis arietans*, *Bitis gabonica rhinoceros*, *Echis carinatus*, *Acanthopis antarcticus*, *Bungarus candidus*, *Bothrops asper*, *Bothrops jararacussu*

Los péptidos aislados contienen al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:1

Ser Leu Leu Gly Phe Gly Cys Met Ile Leu Glu Glu Thr Gly Val Met Ile Glu Leu Glu Lys Asn
Cys Asn Gln Su Pro Glu

SEQ ID NO:2

Ser Leu Leu Glu Phe Gly Met Met Ile Leu Glu Glu Thr Gly Lys Leu Ala Val Pro Phe Tyr Ser
Lys Tyr Gly Leu Tyr Cys Gly Cys Gly Gly Lys Thr Pro Asp Asp

Esta patente se basó en la obtención de la fracción de una PLA₂ isoforma o fragmento con actividad antimicrobiana a una dosis terapéuticamente eficaz para el tratamiento precoz de infecciones bacterianas causadas por *Burkholderia pseudomallei*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante un mecanismo que induce la formación de poros, la cual fue demostrado por estudios ultraestructurales con imagen de microscopio electrónico de barrido, mostrando una morfología suave y una pared celular clara y visible. La imagen de microscopía electrónica de transmisión mostró que la membrana bacteriana se desintegró por efecto de las toxinas después del tratamiento, en bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas, sin presentar efectos citotóxicos ni hemolíticos en células humanas.

Se realizó la purificación de las PLA₂ mediante cromatografía de filtración en gel, el fraccionamiento se realizó en RP-HPLC, y se determinó la masa molecular (15kDa.) por MALDI-TOF/MS. La pureza de la fracción final se comprobó en SDS-PGE.

Para los ensayos *in vitro* se probó:

- a. La actividad antimicrobiana del veneno crudo en concentraciones de 20-100 µg/mL de las diferentes especies de serpientes, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas, las zonas de inhibición fueron comparadas con cloranfenicol (30 µg/disco) como control positivo.
- b. La actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas de veneno se probó mediante la medición de zonas de inhibición y también por microdilución en caldo. (CLSI 1997) Según las condiciones ensayadas con el veneno completo.
- c. Los cambios morfológicos en la línea celular de macrófagos humanos U-937 posterior a la exposición a PLA₂ en concentraciones variables (0.05-10 µg/mL) usando como control positivo ceftazidima. Los efectos citotóxicos fueron evaluados mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)
- d. Actividad hemolítica se ensayó con eritrocitos humanos lavados, con diferentes concentraciones de las PLA₂ purificadas (10-125 µM) incubadas durante 30 minutos, utilizando como control positivo Triton X-100 al 10% (100% de hemólisis). Posteriormente se centrifugaron las muestras y se determinó el grado de hemólisis por cambios en la absorbancia (540nm) de los sobrenadantes en placas de poliestireno.

Como resultados se obtuvieron dos fracciones DRR1-PLA₂ y DRR2-PLA₂. La segunda mostró una actividad antimicrobiana más potente, induciendo la formación de poros en bacterias Gram negativas.

DRR2-PLA₂ a una concentración de 0,1mM posee actividad antimicrobiana, las células monocíticas no mostraron ningún efecto dañino ni hemólisis, con esta concentración.

La solicitud de esta patente fue presentada en el año 2006 y aprobada en el 2007, su estado es abandonada al momento de presentar este documento.

De acuerdo con la más reciente publicación de la OMS (2020) sobre los agentes antibacterianos en desarrollo, no se encontró ningún compuesto derivado de toxinas de veneno de serpientes que se encuentre actualmente en fases de ensayo preclínico o clínico.¹⁴

Conclusiones

Se han demostrado algunos potenciales farmacológicos en moléculas extraídas del veneno de serpientes o sus derivaciones estructurales.

Se ha demostrado actividad antimicrobiana a partir de diferentes componentes del veneno de serpientes, y de forma diferencial sobre diferentes grupos de bacterias. Una limitación en este campo es que la mayoría de los estudios se han quedado en la etapa de pruebas *in vitro*, mientras apenas pocos trabajos han explorado el potencial terapéutico en modelos experimentales de infección.

Los principales desafíos científicos como la penetración, la salida y el riesgo asociado de toxicidad debido a las altas dosis requeridas, necesitan una agenda de investigación concertada para avanzar en los esfuerzos de descubrimiento de antibióticos no tradicionales.⁵⁰

Actualmente hay apertura de parte de la OMS para la investigación de nuevas moléculas, desde herramientas bioinformáticas hasta aumento en los incentivos económicos.

Los antimicrobianos no tradicionales en desarrollo preclínico son diversos e innovadores en comparación con los proyectos en fase clínica. Sin embargo, varios autores coinciden en que esta innovación no resuelve los problemas terapéuticos más críticos y puede no traducirse en efectos clínicos relevantes.

La mayoría de las instituciones académicas con proyectos para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos no están lo suficientemente avanzadas. Por otra parte, pocas corporaciones farmacéuticas globales tienen programas de desarrollo clínico activos de acuerdo con sus proyectos publicados, y la mayoría de estas empresas no participan activamente en la investigación y el desarrollo de nuevos antibacterianos.⁵⁸

Bibliografía

1. Haensch S, et al. (2010) Distinct Clones of *Yersinia pestis* Caused the Black Death. *PLOS Pathogens* 6(10): e1001134.
2. Zimdahl RL (2015) Six chemicals that changed agriculture. 1st edn. Academic Press Elsevier
3. Mohr K.I., et al. (2016) History of Antibiotics Research. In: Stadler M., Dersch P. (eds) *How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 398. Springer
4. Nord C (2010) Mycophenolic Acid—The road from an early antibiotic to a modern drug. *Biologiskt aktiva naturprodukter I läkemedelsutvecklingen*, pp 1–11
5. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* 51:72-80.
6. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* ii: 226–228
7. Waksman S.A. What is an antibiotic or an antibiotic substance. *Mycologia*. 1947 Sep-Oct;39(5):565-9.
8. Goodman & Gilman. *Manual de farmacología y terapéutica*. McGraw-Hill, 2da Ed. 2014.
9. Husain MA (2004) Bacitracin, glycopeptide antibiotics, and the polymyxins. In: Craig CR, Stitzel RE (eds) *Modern pharmacology with clinical applications* 48:552
10. Jovetic S, et al. (2010) β -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends Biotechnol* 28:596–60

11. Jorge Calvo; Luis Martínez-Martínez (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. , 27(1), 0–52.
12. Davies J, et al. (1997) Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol 5:234–240 you understand
13. Davies J (2006) Where have all the antibiotics gone? Can J Infect Dis Med Microbiol 17:287–290
14. Antimicrobial Resistance Division, Global Coordination and Partnership, Tripartite Joint Secretariat (2021). Antimicrobial resistance and the United Nations sustainable development cooperation framework: guidance for United Nations country teams. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240036024>
15. WHO 2020 report on the antibacterial production and development pipeline.
16. Hesterkamp T (2015) Antibiotics clinical development and pipeline. Curr Top Microbiol Immunol. Springer (Chapter 451)
17. Nübel U. (2016) Emergence and Spread of Antimicrobial Resistance: Recent Insights from Bacterial Population Genomics. In: Stadler M., Dersch P. How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer. Vol 398. (Chapter 505)
18. Holden M.T. et al, (2013) A genomic portrait of the emergence, evolution and global spread of a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. Genome Res 23:653–664
19. Hornischer K., Häußler S. (2016) Diagnostics and Resistance Profiling of Bacterial Pathogens. In: Stadler M., Dersch P. (eds) How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology.
20. Julian Davies, Dorothy Davies. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance Microbiology and Molecular Biology Reviews Aug 2010, 74 (3) 417-433.

21. Hesterkamp T. (2015) Antibiotics Clinical Development and Pipeline. In: Stadler M., Dersch P. (eds) How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 398. Springer, Cham
22. Holmes A., et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. The Lancet, Volume 387, Issue 10014 (2016) Pages 176-187
23. Cole S. T. (2014). Who will develop new antibacterial agents? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1645), 20130430. doi:10.1098/rstb.2013.0430
24. Årdal C, Balasegaram M, Laxminarayan R, McAdams D, Outtersen K, Rex JH, Sumpradit N. (2019) Antibiotic development economic, regulatory, and societal challenges. Nat Rev Microbiol. 2020 May;18(5):267-274.
25. ONU (2021). La incapacidad para fabricar antibióticos nuevos favorece la resistencia de las bacterias a los medicamentos.
<https://news.un.org/es/story/2021/04/1490872>
26. Knight, G.M., Davies, N.G., Colijn, C. et al. Mathematical modelling for antibiotic resistance control policy: do we know enough? *BMC Infect Dis* 19, 1011 (2019) doi:10.1186/s12879-019-4630-y
27. McAdams, D. (2017), Resistance diagnosis and the changing economics of antibiotic discovery. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1388: 18-25.
28. Nature Editorial. (2018) Progress on antibiotic resistance. Nature 562, 307
29. Herrmann J. et al. (2016) Strategies for the Discovery and Development of New Antibiotics from Natural Products: Three Case Studies. In: Stadler M., Dersch P. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 398. Springer.

30. Organización Mundial de la Salud . (2020) Agentes antibacterianos en desarrollo clínico y preclínico: descripción general y análisis. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340694>
31. Theuretzbacher U, et al. (2020) The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature* 18, 275-285
32. M. Rai, K. et al., (2016) Antibiotic Resistance: Can Nanoparticles Tackle the Problem?, Academic Press, P 121-143
33. M. Banerjee, S. Mallick, et al. (2010) Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three-component iodinated chitosan silver nanoparticle composite *Langmuir*, 26: 5901-5908
34. A. Upadhyay, et al., (2016) Controlling Bacterial Antibiotic Resistance Using Plant Derived Antimicrobials, Academic Press, p. 205-226
35. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D. and Lotfipour, F. (2012), Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*, 113: 723-736.
36. G.M. Preciado, et al. (2016), Bacteriocins and Its Use for Multidrug-Resistant Bacteria Control. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Academic Press. p. 329-349.
37. Dang X. et al, (2020). Spotlight on the Selected New Antimicrobial innate Immune Peptides Discovered during 2015-2019. *Curr Top Med Chem* 20(32):2884-2998.
38. Van Arnem E.B. et al., (2016). Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proceeding of the National Academy of Science* 113 (46): 12940-12945.
39. Almeida, J. et al. (2016). CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon*, 120, 147–158.

40. Almeida, JR, et al. Harnessing snake venom phospholipases A₂ to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. *Drug Dev Res.* 2019; 80: 68– 85.
41. Mohamed Abd El-Aziz T, Garcia Soares A, Stockand JD. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins (Basel)*. 2019;11(10):564. Published 2019 Sep 25.
42. Pérez-Peinado C, Defaus S, Andreu D. Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4):255. doi:10.3390/toxins12040255
43. Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2013). Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*, 62, 27–39.
44. Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60(4), 520–530.
45. Lomonte, B., et al. (2010). Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake venoms: Biomimetic activities and potential applications. *Current Pharmaceutical Design*, 16(28), 3224–3230.
46. Páramo, L., et al. (1998). Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *European Journal of Biochemistry*, 253(2), 452–461.
47. Oliveira, D. G., et al., (2002). Structural and functional characterization of basic PLA 2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of protein chemistry*, 21(3), 161-168.
48. Santamaria, C., et al. (2005). Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A₂. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1340–1345.

49. Barbosa, P. S. et al., (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, 46(4), 376–386
50. Rodrigues, V. M., et al., (2004). Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 44(3), 305–314.
51. Sudarshan, S., & Dhananjaya, B. L. (2014). Antibacterial potential of a basic phospholipase A2 (VRV-PL-V) of *Daboia russellii pulchella* (Russell's viper) venom. *Biochemistry (Moscow)*, 79(11), 1237–1244
52. Lomonte, B. (2013). Utilidad de los Péptidos Sintéticos en Estudios de EstructuraFunción e Identificación de Epitopos en Toxinas. Temas seleccionados de toxinas con implicaciones biomédicas y métodos para su estudio. BIOTOX Toxinas para la biomedicina Red CYTED.212RT0467 p.71-80.
53. Rheubert JL, et al. Predicción de la actividad antibacteriana de los proteomas del veneno de serpiente. *PLoS One* . 2020; 15 (1): e0226807.
54. Pérez-Peinado C, Defaus S, Andreu D. Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4):255.
55. <https://patents.google.com/patent/CN104000851B>
56. <https://patents.google.com/patent/CN102311492A>
57. <https://patents.google.com/patent/US20070128179A1>
58. Article Source: A novel pre-clinical antibacterial pipeline database Paulin S, Alm RA, Beyer P (2020) A novel pre-clinical antibacterial pipeline database. *PLOS ONE* 15(7): e0236604.