



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

**Identificación y caracterización funcional de péptidos de
defensa del hospedero en cocodrilianos**

PRESENTA

Lic. Félix Leonardo Santana Morera

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete
Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. María Esperanza Martínez Romero
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. Gabriel del Río Guerra
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Prefacio

La presente tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM). La misma contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante una beca de doctorado (No. 595253) y el proyecto denominado "Venenos y antivenenos" (No. 303045), así como de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, proyecto IT200321).

Parte del trabajo experimental aquí presentado se realizó en el laboratorio del Dr. Robert E. W. Hancock en la *University of British Columbia* (UBC), Vancouver, Canadá. Esta estancia de investigación contó con el apoyo económico del *Canadian Bureau for International Education* a través de una beca del *Emerging Leaders in the Americas Program* (ELAP), así como del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) y dos becas del Programa de Movilidad del CONACyT otorgadas a Félix L. Santana.

Diversos aspectos de esta tesis fueron incluidos en las siguientes publicaciones:

1. Santana FL, Arenas I, Haney EF, Estrada K, Hancock REW, Corzo G. Identification of a crocodylian β -defensin variant from *Alligator mississippiensis* with antimicrobial and antibiofilm activity. *Peptides*. 2021;141:170549. PMID: 33865931.
2. Santana FL, Estrada K, Ortiz E, Corzo G. Reptilian β -defensins: expanding the repertoire of known crocodylian peptides. *Peptides*. 2021;136:170473. PMID: 33309943.
3. Alford MA, Baquir B, Santana FL, Haney EF, Hancock, REW. Cathelicidin host defense peptides and inflammatory signaling: striking a balance. *Front Microbiol*. 2020;11,1902. PMID: 32982998.

“Human subtlety...will never devise an invention more beautiful, more simple or more direct than does Nature, because in her inventions nothing is lacking, and nothing is superfluous”

Leonardo da Vinci

Agradecimientos

Sin ninguna duda admito que la culminación de esta etapa ha sido posible gracias a un extraordinario esfuerzo colectivo, más que individual. Así que quisiera reconocer a algunas de las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo. Me disculpo de antemano con todos aquellos que por premura o descuido no intencionado pudiera haber omitido.

Quiero expresar mi absoluta gratitud al Dr. Gerardo Corzo por aceptarme como su estudiante y fomentar mi desarrollo profesional y personal durante todos estos años. Gracias por la confianza depositada, por todas las enseñanzas y los momentos inolvidables, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ser más que un supervisor, por ser casi familia, por el apoyo constante a todas mis locuras científicas. Las palabras “ánimo chico” las recordaré por siempre.

A los miembros de su grupo, en particular a la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero y al Dr. Iván Arenas Sosa por toda la ayuda técnica. A este último también por su amistad. Agradezco también a María del Carmen Martínez por su invaluable ayuda en innumerables tareas administrativas.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. María E. Martínez Romero y el Dr. Gabriel del Río Guerra, por sus innumerables sugerencias y consejos durante el desarrollo de este proyecto. A los miembros del jurado de grado, los doctores José Federico del Río Portilla, Jesús Silva Sánchez y Ramón Garduño Juárez, así como a la doctora Cinthia Ernestina Núñez López, por todas las correcciones al manuscrito de la tesis y valiosos comentarios.

Al Dr. Alejandro Alagón y a su grupo, en particular al M.C. Alejandro Olvera Rodríguez y el Biol. Felipe Olvera Rodríguez por la asistencia técnica brindada. Asimismo reconozco la ayuda proporcionada por Angelica Linares Labastida, Manuela Ávila y Ricardo Mondragon Cortes. También quiero agradecer la ayuda proporcionada por los miembros

del consorcio Corzo-Alagón-Becerril-Possani, en especial al Dr. Fernando Zamudio Zuñiga y al Dr. Ernesto Ortiz Suri. A este último igualmente le agradezco todos los consejos y ayuda profesional y personal.

A todos los herpetólogos y veterinarios con los que tuve el gusto de aprender tanto acerca del manejo y cría de reptiles. En especial a Meli, Neri, Oscar Jiménez, Oscar Aguayo, Alberto Reyna, Marco Manriquez y Fernando Fergo, por su ayuda en la toma de muestras y el cuidado de Juancho.

Por su apoyo técnico, agradezco a los integrantes de la unidad de cómputo del Ibt, al M. en T.I. Juan Manuel Hurtado y al M.E.M. David Castañeda. Asimismo reconozco la asesoría de los miembros de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, en particular del M.C Jerome Jean Verleyen y Dr. Fidel Sanchez. Agradezco al M.C. Karel Johan Estrada Guerra por la inmensa e invaluable ayuda con las búsquedas genómicas.

A mis queridos amigos, Dubhe, Alier, Karel, Mabel, Deborah, Marcos y Arline, por estar siempre presentes, en las buenas y malas, por todas las noches de dominó y Palapa, por hacer de Cuernavaca un hogar. A Daya y a su familia, por permitirme disfrutar tantos momentos como uno más.

Muy agradecido estoy con el Prof. Dr. Robert (Bob) Hancock de la UBC por acogerme en su laboratorio y ser otro supervisor más, por la oportunidad. A todos los miembros de su grupo, en particular a Susan, Jillian, Manjeet y Reza por toda la ayuda técnica y administrativa. También quiero agradecer al Dr. Evan Haney por su mentoría y gran apoyo, por todas las discusiones que han dado forma a muchas de mis ideas sobre ciencia y mi tema de investigación. Agradezco a Catherine (Bing) Wu y Noushin Akhound-sadegh por la ayuda con los experimentos en el modelo de piel; también a Morgan Alford por el trabajo con el modelo de absceso en ratones. A los doctores Daniel Pletzer y Michael (Mike) Trimble por los consejos útiles y varias pláticas que contribuyeron a mejorar tantos experimentos. Mi tiempo en el laboratorio y en Vancouver no habría sido el mismo sin Travis, Arjun, Bev, Corrie, Javier, Andy y Lucas. Muchas gracias por toda la di-

versión y los buenos ratos. Agradezco también a la Dra. Suzana Straus de la UBC por su ayuda con los experimentos de difracción circular.

A mis estudiantes Mariana Ruedas Tamayo y Pavneet Kalsi por la paciencia y dedicación para conmigo, los momentos compartidos y por permitirme aprender tanto junto a ustedes.

Debo mencionar el gran aporte del Dr. Yoamel Milián y la Dra. Vivian Morera en la concepción y desarrollo inicial de parte de este proyecto. Sus ideas y asesoría marcaron la trayectoria de lo que terminaría siendo mi proyecto de doctorado. Muy apreciada fue también la ayuda obtenida de la Dra. Vivian Montero durante esta etapa.

A mi querida familia, en especial a mis padres Lisette y Felix, y a mis hermanas Laura y Adriana, por los sacrificios, porque a pesar de la distancia siempre encuentran la manera de animarme y comprenderme, de estar conmigo. Este logro es tan suyo como mío. También a Santi y a mi tía Vivian, parcialmente responsables de mi inclinación profesional. Por último pero no menos importante, quisiera agradecer a mi esposa Melanie, por su apoyo incondicional, por siempre creer en mi, por su amor y cariño, por su paciencia.

Resumen

Los péptidos de defensa del hospedero (HDPs) constituyen una alternativa promisoría para combatir la actual crisis de resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales. Estos están ampliamente distribuidos en los diferentes reinos de la vida y los organismos con frecuencia expresan tipos o familias distintas de HDPs según su historia evolutiva particular. Los cocodrilianos son especies interesantes para el estudio de estas moléculas debido a su potente sistema inmune, el cual les confiere una alta resistencia a las infecciones. En este trabajo, se emplearon varias herramientas bioinformáticas para investigar el repertorio de HDPs de las familias de las β -defensinas y catelicidinas en cuatro especies de cocodrilianos. Este análisis permitió identificar y seleccionar novedosas secuencias para su caracterización funcional, con énfasis en sus actividades antimicrobiana y antibiopelícula contra cepas de interés clínico, así como en su capacidad citotóxica e inmunomoduladora contra células humanas. Unas pocas variantes de β -defensina identificadas fueron entonces sintetizadas y plegadas *in vitro*, con distinto grado de eficiencia en la reacción de plegamiento. En especial, la variante Am23SK se plegó en una sola isoforma mayoritaria y reveló una amplia actividad antimicrobiana y antibiopelícula, la cual fue superior a la observada para la β -defensina humana HBD3. Adicionalmente, Am23SK no fue citotóxica y mostró una moderada capacidad anti-inflamatoria contra una línea celular humana. Por otra parte, las catelicidinas de cocodrilianos sintetizadas demostraron una amplia actividad antimicrobiana y antibiopelícula contra varios aislados clínicos resistentes a antibióticos. En particular As-CATH8 evidenció una potente capacidad anti-infecciosa en un modelo de piel humana y en un modelo murino de absceso bacteriano, superando en ambos casos a la catelicidina humana LL-37. No obstante, este péptido mostró una moderada citotoxicidad contra células humanas, aunque esta fue similar a lo observado para LL-37. De manera interesante, la catelicidina de cocodrilianos Gg-CATH7 no fue citotóxica y mostró buena actividad anti-inflamatoria contra una línea celular de epitelio pulmonar humano. En general, este trabajo contribuye a resaltar el potencial terapéutico de los HDPs de cocodrilianos y amplía nuestra visión acerca del posible rol de estas moléculas en la inmunidad de cocodrilianos y de reptiles en general.

Abstract

Host defense peptides (HDPs) are a promising alternative to combat the current crisis of bacterial resistance to conventional antibiotics. They are widely distributed in the different kingdoms of life and organisms often express distinct types or families of HDPs according to their particular evolutionary history. Crocodylians are interesting species for the study of these molecules because of their potent immune system, which confers them high resistance to infection. In this work, several bioinformatics tools were employed to investigate the repertoire of HDPs of the β -defensin and cathelicidin families in four crocodylian species. This analysis allowed the identification and selection of novel sequences for functional characterization, with emphasis on their antimicrobial and antibiofilm activities against strains of clinical interest, as well as their cytotoxic and immunomodulatory capacity against human cells. A few identified β -defensin variants were then synthesized and folded *in vitro*, with varying degree of efficiency in the folding reaction. Notably, the Am23SK variant folded into a single major isoform and showed broad antimicrobial and antibiofilm activity, which was superior to that observed for the human β -defensin HBD3. Additionally, Am23SK was not cytotoxic and showed moderate anti-inflammatory capacity against a human cell line. On the other hand, the synthesized crocodylian cathelicidins displayed broad antimicrobial and antibiofilm activity against several antibiotic-resistant clinical isolates. In particular As-CATH8 showed potent anti-infective action in a human skin model and in a murine model of bacterial abscess, outperforming in both cases the human cathelicidin LL-37. However, this peptide showed moderate cytotoxicity against human cells, although this was similar to that observed for LL-37. Interestingly, the crocodylian cathelicidin Gg-CATH7 was non-cytotoxic and showed good anti-inflammatory capacity against a human lung epithelial cell line. Overall, this work contributes to highlight the therapeutic potential of crocodylian HDPs and broadens our view on the possible role of these molecules in crocodylians and reptile immunity in general.

Índice general

1	Introducción.....	1
2	Hipótesis.....	3
3	Objetivos del proyecto.....	3
3.1	Objetivo general.....	3
3.2	Objetivos específicos.....	3
4	Antecedentes.....	5
4.1	Péptidos de defensa del hospedero.....	5
4.2	Familia de las defensinas.....	7
4.2.1	Organización genómica y número de genes de β -defensinas.....	9
4.2.2	Características de los precursores de β -defensinas.....	10
4.2.3	Actividad biológica de las β -defensinas de los reptiles.....	12
4.3	Familia de las catelicidinas.....	14
4.3.1	Número de genes, organización genómica y características de los precursores de catelicidinas.....	14
4.3.2	Expresión y procesamiento de los precursores de catelicidinas.....	16
4.3.3	Actividad biológica de las catelicidinas en reptiles.....	17
4.4	Mecanismos de acción antimicrobiana de β -defensinas y catelicidinas de reptiles.....	19
4.5	Métodos bioinformáticos para la identificación de HDPs.....	22
5	Materiales y métodos.....	24
5.1	Predicción y análisis <i>in silico</i> de secuencias de HDP de cocodrilianos.....	24
5.1.1	Identificación de secuencias tipo β -defensinas y catelicidinas usando modelos ocultos de Markov.....	24
5.1.2	Análisis filogenético de las secuencias tipo β -defensinas.....	26
5.1.3	Modelado estructural <i>in silico</i> y análisis de las características físico-químicas de las variantes de β -defensinas.....	27
5.1.4	Análisis filogenético de las secuencias tipo catelicidinas.....	28
5.1.5	Predicción de las características físico-químicas y estructurales de las catelicidinas de cocodrilianos.....	28
5.2	Péptidos y reactivos generales.....	29
5.2.1	Síntesis y purificación de HDPs.....	29
5.2.2	Plegamiento <i>in vitro</i> de las variantes sintéticas de β -defensinas.....	30

5.2.3	Reactivos generales.....	31
5.3	Determinación de la estructura secundaria de las catelicidinas sintéticas mediante dicroísmo circular.....	31
5.4	Cepas bacterianas, líneas celulares y condiciones de cultivo.....	32
5.4.1	Medios de cultivo bacterianos.....	32
5.4.2	Medios de cultivo de células superiores.....	32
5.4.3	Cepas bacterianas.....	32
5.4.4	Líneas celulares y PBMCs humanos.....	33
5.5	Ensayos de actividad antibacteriana y antibiopelícula.....	34
5.5.1	Actividad antimicrobiana de las variantes sintéticas de β -defensinas.....	34
5.5.2	Actividad antibiopelícula de las variantes sintéticas de β -defensinas.....	35
5.5.3	Actividad antimicrobiana y antibiopelícula de las catelicidinas sintéticas....	36
5.6	Actividad citotóxica e inmunomoduladora de β -defensinas y catelicidinas.....	37
5.6.1	Tratamiento de células HBE y PBMC.....	37
5.6.2	Ensayos de liberación de LDH.....	38
5.6.3	Cuantificación de la producción de citocinas.....	38
5.7	Modelo de piel humana.....	39
5.8	Modelo murino de infección de abscesos subcutáneos.....	40
5.8.1	Aprobación del estudio y animales.....	40
5.8.2	Formación de los abscesos bacterianos y tratamiento con péptidos.....	40
5.9	Análisis estadístico.....	41
6	Resultados.....	43
6.1	Identificación y caracterización funcional de β -defensinas en cocodrilianos.....	43
6.1.1	La organización genómica de los genes de β -defensinas se conserva entre las distintas especies de cocodrilianos.....	43
6.1.2	Las secuencias de β -defensinas identificadas en cocodrilianos mostraron las características típicas de esta familia de HDPs.....	44
6.1.3	Variantes recortadas de β -defensinas de cocodrilianos forman dos grupos de acuerdo a su carga e índice de hidrofobicidad.....	47
6.1.4	La variante sintética Am23SK mostró una sola isoforma mayoritaria al ser plegada <i>in vitro</i>	50
6.1.5	Am23SK presentó una actividad antimicrobiana y antibiopelícula superior a la defensina humana HBD3.....	54

6.1.6	Las isoformas de plegamiento de una misma variante de β -defensina mostraron similar actividad antimicrobiana y antibiopelícula.....	57
6.1.7	Am23SK no es citotóxica e inhibe moderadamente la expresión de mediadores pro-inflamatorios en células HBE.....	59
6.2	Identificación y caracterización funcional de catelicidinas en cocodrilianos.....	62
6.2.1	Las secuencias de catelicidinas identificadas mostraron las características típicas de esta familia de HDPs.....	62
6.2.2	Las catelicidinas sintéticas son moléculas cargadas positivamente, anfipáticas y adquieren una conformación de tipo α -hélice en presencia de micelas lipídicas	64
6.2.3	Las catelicidinas de cocodrilianos presentan amplia actividad antimicrobiana y antibiopelícula.....	69
6.2.4	Las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5 son moderadamente citotóxicas contra células humanas.....	70
6.2.5	La catelicidina Gg-CATH7 suprime la producción de mediadores pro-inflamatorios en células HBE estimuladas con poli(I:C).....	72
6.2.6	Las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5 mostraron mejor actividad antibiopelícula contra <i>S. aureus</i> que la LL-37 en un modelo de piel humana.....	72
6.2.7	As-CATH8 mostró un fuerte efecto anti-infeccioso contra <i>S. aureus</i> y <i>A. baumannii</i> en un modelo murino de absceso cutáneo.....	75
7	Discusión.....	77
7.1	Plegamiento de las variantes de β -defensinas sintéticas.....	78
7.2	Actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los HDPs de cocodrilianos.....	79
7.3	Citotoxicidad e inmunomodulación de los HDPs de cocodrilianos.....	81
7.4	Actividad <i>in vivo</i> de As-CATH8.....	84
8	Conclusiones.....	86
9	Bibliografía.....	87
10	Anexos.....	110

Índice de figuras

Figura 1: Estructuras tridimensionales de β -defensinas y catelicidinas de humanos, aves y reptiles.....	6
Figura 2: Topología de los puentes disulfuro en las <i>cis</i> - y <i>trans</i> -defensinas.....	7
Figura 3: Diversidad de las catelicidinas entre los distintos grupos de vertebrados.....	15
Figura 4: Mecanismos de acción propuestos para la actividad antimicrobiana de los HDPs.....	20
Figura 5: Esquema general de los pasos de la estrategia bioinformática utilizada.....	25
Figura 6: Esquema de la formación y tratamiento de biopelículas de <i>S. aureus</i> con péptidos catelicidina en un modelo de piel humana.....	40
Figura 7: Esquema de la formación y tratamiento de abscesos bacterianos de <i>S. aureus</i> y <i>A. baumannii</i> con péptidos catelicidinas en un modelo murino.....	41
Figura 8: Estructura genómica de las β -defensinas en cocodrilianos.....	43
Figura 9: Alineamiento múltiple de las secuencias de β -defensinas de cocodrilianos....	45
Figura 10: Análisis filogenético de las β -defensinas de reptiles.....	46
Figura 11: Relación entre la carga neta y el índice de hidrofobicidad de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y de otros vertebrados.....	48
Figura 12: Modelos estructurales y análisis de la superficie accesible al solvente de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y la HBD3.....	51
Figura 13: Cromatogramas de la purificación por RP-HPLC de las variantes reducidas de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos.....	52
Figura 14: Cromatogramas analíticos de la purificación por RP-HPLC de las variantes oxidadas de β -defensinas de cocodrilianos.....	54
Figura 15: Actividad inhibitoria de biopelícula bacteriana de AM23SK y HBD3.....	56
Figura 16: Actividad inhibitoria de biopelícula bacteriana de las isoformas de β -defensinas de cocodrilianos.....	59
Figura 17: Actividad citotóxica de Am23SK y HBD3 contra células HBE.....	60
Figura 18: Actividad inmunomoduladora de Am23SK y HBD3 contra células HBE.....	61
Figura 19: Alineamiento múltiple de las secuencias de catelicidinas de cocodrilianos....	63
Figura 20: Análisis filogenético de las catelicidinas de reptiles.....	65
Figura 21: Análisis estructural de las catelicidinas sintéticas de cocodrilianos.....	67
Figura 22: Actividad citotóxica de las catelicidinas de cocodrilianos contra células humanas en cultivo.....	71

Figura 23: Actividad inmunomoduladora de la catelicidinas de cocodrilianos As-CATH7 y Gg-CATH7 células HBE humanas.....	73
Figura 24: Actividad de erradicación de biopelículas bacterianas de las crocCATH en un modelo de piel humana.....	74
Figura 25: Capacidad anti-infecciosa de As-CATH8 en un modelo murino de absceso bacteriano.....	76
Figura S1: Actividad antibacteriana de Am23SK y HBD3.....	122
Figura S2: Actividad antibacteriana de las isoformas de β -defensinas de cocodrilianos.....	123

Índice de tablas

Tabla 1: Propiedades físico-químicas y alineamiento múltiple de secuencias de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y HBD3.....	50
Tabla 2: Actividad antimicrobiana de Am23SK y HBD3.....	55
Tabla 3: Actividad antimicrobiana de las isoformas de β -defensinas de cocodrilianos....	58
Tabla 4: Propiedades físico-químicas de las catelicidinas de cocodrilianos y LL-37.....	66
Tabla 5: Actividad antimicrobiana de las catelicidinas de cocodrilianos.....	69
Tabla 6: Actividad inhibitoria de biopelículas de catelicidinas de cocodrilianos.....	70
Tabla S1: Secuencias de β -defensinas identificadas en <i>A. mississippiensis</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>C. porosus</i> y <i>G. gangeticus</i>	110
Tabla S2: Propiedades físico-químicas de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y de otros vertebrados.....	117
Tabla S3: Masas moleculares y tiempos de retención de las isoformas oxidadas de las variantes de β -defensinas purificadas.....	121
Tabla S4: Secuencias de catelicidinas identificadas en <i>A. mississippiensis</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>C. porosus</i> y <i>G. gangeticus</i>	124
Tabla S5: Resumen de la predicción de las secuencias de catelicidinas identificadas <i>A. mississippiensis</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>C. porosus</i> y <i>G. gangeticus</i>	126

1 Introducción

La aparición y el desarrollo de resistencia a las diferentes clases de antibióticos utilizados por parte de patógenos bacterianos, constituye un problema crítico para la salud pública a nivel mundial. Estimados sugieren que de continuar desatendida, la resistencia antimicrobiana pudiera cobrar 10 millones de muertes anualmente [1]. Por si fuera poco, otros eventos asociados a la salud humana como la actual pandemia de SARS-CoV-2 pudieran agravar directa e indirectamente este problema [2].

Dentro de las bacterias de mayor preocupación se encuentran las del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*) [3], las cuales fueron clasificadas por la Organización Mundial de la Salud como patógenos priorizados para el desarrollo de nuevos tratamientos, dado sus altos niveles de resistencia y gran impacto en la salud humana nivel mundial [3,4]. Frecuentemente, estas bacterias pueden encontrarse formando biopelículas, las cuales son altamente resistentes a los tratamientos y a la acción del sistema inmune [5] y llegan a causar cerca de dos tercios de las infecciones bacterianas [6].

Los péptidos de defensa del hospedero (HDPs, del inglés *host defense peptides*) constituyen una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales [7], y presentan varias ventajas comparados con los primeros ya que actúan a través de múltiples mecanismos de acción, presentan buena actividad contra biopelículas bacterianas y tienen propiedades fármaco-dinámicas más favorables [8], lo que contribuye a su capacidad anti-infecciosa *in vivo* y disminuye la propensión a la aparición de resistencias en los microbios patógenos.

Hay 24 especies de cocodrilianos reconocidas en la actualidad, las cuales pueden dividirse en tres familias: Alligatoridae (8 especies; caimanes y aligátors), Crocodylidae (14 especies; “verdaderos” cocodrilos) y Gavialidae (2 especies; Gharial y Tomistoma) [9]. Desde el punto de vista inmunológico, los cocodrilianos son muy interesante para estudiar los HDPs debido a su alta resistencia a las infecciones. Por ejemplo, estos animales

pueden sobrevivir en ambientes con una alta exposición a microbios, tanto acuáticos como terrestres, incluso ante la presencia de lesiones graves sufridas a consecuencia de peleas con otros individuos o presas [10]. En este sentido, varios HDPs han sido identificados en cocodrilianos [11–13]; sin embargo, hasta la fecha muchos de estos péptidos, especialmente las β -defensinas, no han sido funcionalmente caracterizados y la mayoría de las restantes especies permanecen mayormente inexploradas. Afortunadamente, la secuenciación de los genomas de *Alligator mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus* [14,15] ha abierto una nueva posibilidad para el estudio de estas familias de HDPs mediante el empleo de estrategias bioinformáticas, como los modelos ocultos de Markov, los cuales han sido utilizado con éxito para caracterizar HDPs en varias especies de vertebrados [16–18].

2 Hipótesis

El análisis *in silico* de los genomas de cocodrilianos permitirán identificar nuevas secuencias de β -defensinas y catelicidinas con amplia y potente actividad antibacteriana contra patógenos de importancia clínica, así como con capacidad inmunomoduladora contra células humanas.

3 Objetivos del proyecto

3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar funcionalmente novedosas secuencias de β -defensinas y catelicidinas codificadas en los genomas de *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar mediante el uso de modelos ocultos de Markov específicos para cada familia las secuencias de β -defensinas (crocBDs) y catelicidinas (crocCATHs).
2. Seleccionar para su posterior síntesis química algunas secuencias de crocBDs y crocCATHs mediante un análisis de sus propiedades físico-químicas, estructurales y sus relaciones filogenéticas.
3. Establecer condiciones de purificación y plegamiento *in vitro* para las crocBD sintetizadas químicamente.

4. Evaluar la actividad antimicrobiana, de inhibición de biopelícula, citotóxica e inmunomoduladora de las crocBDs plegadas y las crocCATHs sintetizadas utilizando ensayos *in vitro*.

5. Evaluar la actividad de erradicación de biopelícula de las crocCATHs sintéticas contra *S. aureus* en un modelo de piel humana.

6. Investigar la capacidad anti-infecciosa de las crocCATHs sintéticas más promisorias contra las bacterias *S. aureus* y *A. baumannii* en un modelo murino de formación de abscesos.

4 Antecedentes

4.1 Péptidos de defensa del hospedero

Todos los organismos poseen varios mecanismos de defensa para protegerse contra los patógenos invasores. Independientemente de su complejidad biológica, todos dependen en cierta medida de la secreción de sustancias antimicrobianas [19], lo cual demuestra que esta es una estrategia de gran éxito en la naturaleza. En sistemas más sofisticados, como el sistema inmunitario de los vertebrados, estos compuestos pueden actuar de manera coordinada con otras moléculas y células para organizar la respuesta inmune [20]. En los animales, el sistema inmune se divide en dos ramas principales: innato y adaptativo [21].

Los HDPs, también conocidos como péptidos antimicrobianos, son una parte esencial del sistema inmune innato en los organismos pluricelulares. Por lo general, estas moléculas son cortas (<50 aminoácidos), compuestas por aproximadamente un 50 % de residuos hidrofóbicos, y con carga neta positiva, la cual normalmente oscila entre +2 y +9 debido a la abundancia de residuos de arginina y lisina [22,23]. Adicionalmente, en la estructura tridimensional de estas moléculas es frecuente encontrar una distribución asimétrica de los residuos polares e hidrofóbicos, lo que les confiere a los HDPs propiedades anfipáticas [22].

En general, los HDPs difieren significativamente en su secuencia primaria y estructura, y a grandes rasgos pueden clasificarse en cuatro grupos estructurales sobre la base de su conformación: péptidos lineales α -helicoidales, péptidos con hojas- β estabilizadas por puentes disulfuro, péptidos cíclicos y péptidos con estructuras de bucle flexible extendido [24]. Probablemente los dos primeros grupos son los más comunes y mejor estudiados; ejemplos clásicos de ellos son las β -defensinas y varios miembros de las catelicidinas (**Figura 1**).

Aunque inicialmente fueron reconocidos por su actividad antimicrobiana directa y a menudo de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus [25], otras funciones bioló-

gicas de los HDPs como la capacidad de modular el sistema inmune [26], la actividad antibiopelícula [27] y la actividad anticancerígena [28] han sido también descritas. Así, estos hallazgos han dado lugar a décadas de de la investigación, con varios candidatos en ensayos clínicos lo que pone de manifiesto el gran potencial de los HDPs como terapéuticos [24].

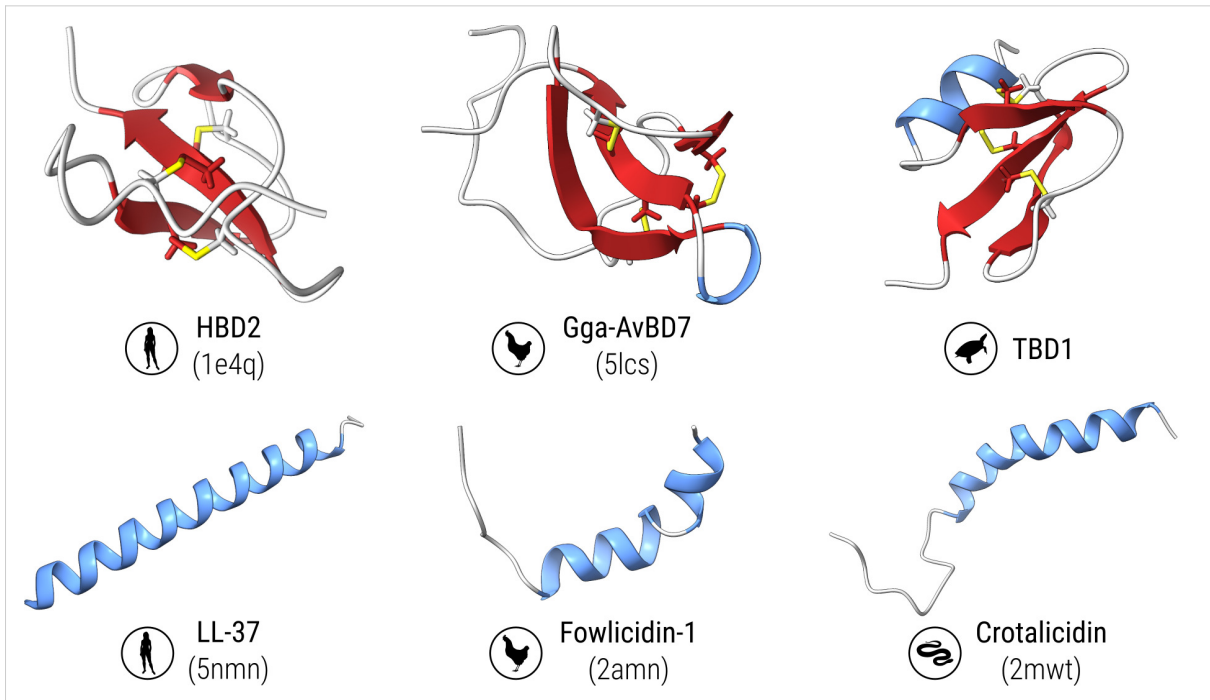


Figura 1: Estructuras tridimensionales de β -defensinas y catelicidinas de humanos, aves y reptiles. Los elementos de estructura secundaria se muestra resaltados en diferentes colores (hélices: azul, hojas- β : rojo, lazos: gris). También se aprecian los puentes disulfuro coloreados en amarillo. Las estructuras representativas de β -defensinas y catelicidinas fueron descargadas del PDB¹ y los números de acceso para cada una aparecen entre paréntesis. TBD1 fue modelada usando AlphaFold². Las siluetas de animales fueron creadas por NASA (mujer), Steven Traver (gallina) y Brian O'Meara (tortuga) y descargadas de PhyloPic³. Por otro parte, la silueta de la serpiente fue dibujada en Inkscape versión 1.1⁴.

1 PDB: del inglés *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>)

2 <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=kOblAo-xetgx>

3 <http://phylopic.org/>

4 <https://inkscape.org/>

4.2 Familia de las defensinas

Las defensinas son uno de los principales grupos de HDPs presentes en plantas, animales y hongos [29]. Típicamente, estos péptidos presentan un motivo estructural característico compuesto por un motivo de triple cadena de hojas- β antiparalelas, normalmente empaquetado contra una α -hélice, que se estabiliza mediante tres a seis enlaces disulfuro [29,30].

Debido a diferencias en su secuencia primaria, orientación de la estructura secundaria, conectividades de los enlaces disulfuro y en las similitudes de la estructura terciaria, las defensinas se han clasificado recientemente en dos superfamilias: *cis*- y *trans*-defensinas [31] (**Figura 2**). La mayor de estas superfamilias comprende a las *cis*-defensinas, las cuales poseen dos enlaces disulfuro paralelos que conectan la hoja- β final con la α -hélice e incluye las proteínas $\alpha\beta$ estabilizadas por cisteína presentes en hongos, invertebrados y plantas. La segunda, las *trans*-defensinas, abarca secuencias que tienen dos enlaces disulfuro análogos que están orientados en direcciones opuestas a la hoja- β final, por lo que los conectan a diferentes elementos de la estructura secundaria. Esta superfamilia incluye a las defensinas de los vertebrados, así como las grandes defensinas de los invertebrados, los péptidos similares a las β -defensinas de las langostas y varias secuencias similares a las defensinas de los cnidarios recientemente identificadas [31–33].

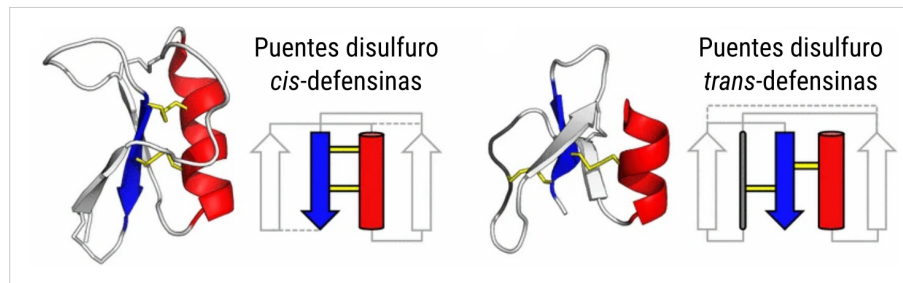


Figura 2: Topología de los puentes disulfuro en las *cis*- y *trans*-defensinas. Elementos de estructura secundaria están representados mediante flechas (hojas- β), cilindros (α -hélices) o varillas (regiones desordenadas). Imagen modificada de Shafee et al. [32].

Sin embargo, si estas dos superfamilias tienen un origen evolutivo independiente o comparten un ancestro común sigue siendo un tema polémico [31,34], lo que evidencia la dificultad de inferir relaciones evolutivas distantes en estos péptidos. Sin embargo, el motivo estructural de las defensinas ha demostrado ser un buen andamio para la adquisición de una amplia gama de nuevas funciones biológicas y varios miembros de ambas superfamilias muestran propiedades como actividad antimicrobiana, modulación de la respuesta inmune del hospedero, actividad anticancerígena, perturbación de los canales iónicos e inhibición enzimática [32].

Las defensinas de los vertebrados pueden clasificarse en tres subfamilias estructurales: α -, β - y θ -defensinas, teniendo en cuenta las conectividades disulfuro y del número de residuos intercalados entre las cisteínas conservadas [35]. Desde una perspectiva evolutiva, las α -defensinas están restringidas a los mamíferos y parecen haber evolucionado a partir de los genes ancestrales de las β -defensinas [36], tras la divergencia entre éstos y los reptiles, hace aproximadamente 300 millones de años [37]. Curiosamente, algunas especies de mamíferos (ej. ganado vacuno) han perdido esta subfamilia durante la evolución, aunque la razón de esta pérdida no se entiende completamente [38]. Por su parte, las θ -defensinas son los miembros más jóvenes y se producen a partir de genes de α -defensina mutados que contienen un codón de parada prematuro y que por tanto codifican para un péptido maduro de sólo 12 residuos. Dos de estos precursores se procesan para formar un péptido circular octa-deca que está estabilizado estructuralmente por tres disulfuros [39]. Las θ -defensinas sólo se encuentran en primates, concretamente en los monos del Viejo Mundo, pero otros primates como los humanos, los chimpancés y los gorilas pueden presentar varios pseudogenes en sus genomas [40].

A su vez, se ha sugerido que las β -defensinas evolucionaron a partir del dominio C-terminal de las defensinas grandes (*big defensins*) de invertebrados, ya que ambas familias comparten el motivo de puentes disulfuro, funciones y lugares de expresión similares [41]. Esta subfamilia es la más extendida de todas las defensinas de vertebrados, y ha sido identificada en todos los grupos estudiados hasta ahora, incluyendo peces, anfibios,

reptiles, aves y mamíferos [42]. Curiosamente, también se han encontrado en dos especies de langostas [43], lo que acentúa su antiguo origen en la evolución animal.

4.2.1 Organización genómica y número de genes de β -defensinas

En mamíferos, los genes de β -defensinas se agrupan en cuatro o cinco regiones cromosómicas (ej. en los cromosomas 6, 8 y 20 en los humanos) [44], y el orden y la orientación de los genes ortólogos suelen conservarse entre las distintas especies [45–47]. Se ha sugerido que la presencia de estos grupos en diferentes cromosomas en mamíferos podría ser el resultado de eventos de rápida duplicación de genes, diversificación de secuencias y translocación cromosómica que ocurrieron tras la divergencia de este linaje [42,48]. Por el contrario, los genes de las β -defensinas de aves se agrupan en un solo clúster (ej. en el cromosoma 3 de los pollos) [48,49], y al igual que en mamíferos muestran un orden y orientación similar en los distintos genomas [49].

Los genes de β -defensina de los reptiles parecen tener una organización similar a los de las aves, y se localizan principalmente en un solo grupo en el genoma [13,50]. Aunque los informes que comparan la estructura genómica de los genes de β -defensina entre diferentes especies o grupos de reptiles son generalmente escasos, se han observado varias relaciones sintéticas y de ortología entre los cocodrilianos y los lagartos [13].

En las tortugas y lagartos, el clúster de β -defensinas parece estar flanqueado a un extremo por el gen que codifica la proteína catepsina B (CTSB) [50], lo que también ha sido observado en mamíferos y aves [48,49]. Además, en aves y tortugas, este clúster está flanqueado en el otro extremo por el gen que codifica la proteína de membrana asociada a la translocación 2 (TRAM2) [49,50]. Por lo tanto, tanto los genes CTSB como TRAM2 se han utilizado como marcadores para ayudar a la identificación de los grupos de β -defensinas en los nuevos genomas [50].

El número de genes de β -defensinas entre los vertebrados es extremadamente variable. Por ejemplo, un análisis de 29 genomas que el número de genes de β -defensinas en mamíferos varía desde menos de 10, en especies como los delfines, elefantes y pandas,

hasta más de 40 en vacas, ratas y humanos [42]. Por otro lado, en las aves los números varían entre 10 y 20 entre las distintas especies [49].

En reptiles, 37 genes han sido identificados en el lagarto verde [18], 66 en el dragón de Komodo [50], 14-16 en serpientes (tabla suplementaria de van Hoek et al. [50]) y 26 en tortugas [51]. Adicionalmente, 19 genes de β -defensina fueron previamente identificados en el aligátor chino *A. sinensis* [13]; aunque es probable que el número definitivo de genes de β -defensina en los reptiles, y en los vertebrados en general, cambie a medida que más genomas sean secuenciados y anotados correctamente.

4.2.2 Características de los precursores de β -defensinas

Las β -defensinas son sintetizadas *in vivo* como precursores peptídicos, o sea, contienen un péptido señal hidrofóbico y rico en leucinas (también llamado secuencia señal o pre-péptido), una pro-pieza intermedia (también llamada pro-péptido o pro-secuencia), y una región C-terminal que corresponde al péptido maduro [35,52]. La mayoría de las β -defensinas tienen pro-piezas muy cortas o a veces inexistentes, en contraste con las α -defensinas que suelen poseer pro-piezas aniónicas relativamente largas (~45 aminoácidos) [35]. En las α -defensinas, la pro-pieza contrarresta el péptido maduro catiónico, manteniéndolo inactivo durante la síntesis [53]. También parece ser importante para la clasificación subcelular y el correcto plegado del péptido maduro [54,55]. La causa y las implicaciones biológicas de las diferencias en longitud de las pro-piezas entre ambas subfamilias no están del todo claras, pero podrían indicar que los requisitos estructurales para la biosíntesis, el correcto plegamiento y/o el tráfico intracelular son notablemente distintas para cada una de ellas [52].

Entre los reptiles, los genes de las β -defensinas se organizan en dos o cuatro exones. En los aligátors, la variante de dos exones parece ser la más común y cuando el arreglo de cuatro exones está presente, el primer y el cuarto exón sólo codifican para el 5'- y el 3'-UTR (del inglés *Untranslated Region*), respectivamente [13]. Por el contrario, la mayoría de los genes de β -defensinas del lagarto *Anolis carolinensis* contienen tres exones; el primero y el segundo codifican para el péptido señal, la pro-pieza y la mayor par-

te de la secuencia madura, mientras que el último exón codifica el resto de la secuencia madura y el 3'-UTR [18]. En la organización génica de cuatro exones, el primer exón adicional contiene el 5'-UTR y los restantes exones siguen el patrón descrito anteriormente. Las variantes de dos exones también están presentes en el genoma de *A. carolinensis* [18]. A pesar de su estrecha relación evolutiva con los lagartos, los genes de β -defensina de las serpientes muestran menos diversidad en sus estructuras y contienen mayoritariamente dos o tres exones [56,57]. En general, en estos animales la mayor parte del péptido señal es codificada por el primer exón y el resto más el péptido maduro es codificado por el segundo exón (y el tercero si está presente). Curiosamente, las defensinas de serpiente parecen carecer de la por-pieza [56], la cual está presente en la mayoría de las β -defensinas de vertebrados.

En la mayoría de los casos, los péptidos maduros de la β -defensina son pequeños (36-50 aminoácidos de longitud), cargados positivamente y anfipáticos. Seis cisteínas conservadas forman tres enlaces disulfuro intramoleculares (**Figura 1**), con la topología Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, y Cys3-Cys6 [58,59]. Sin embargo, variaciones de este arquetipo han sido también descritas. Uno de los ejemplos más notorios son las secuencias con repeticiones del motivo β -defensina, que han sido encontradas en aves y lagartos [18,49,50].

Los péptidos AvBD11 son defensinas atípicas y altamente conservadas en todas las especies aviares, los cuales contienen dos dominios β -defensinas empaquetados a través de un grupo hidrofóbico [60]. En concreto, la AvBD11 de gallinas (Gga-AvBD11) presenta una actividad anti-infecciosa contra bacterias y parásitos [60,61], y este efecto se ha atribuido principalmente al dominio β -defensina presente en el N-terminal de esta molécula, el cual es más catiónico e hidrofóbico. La adquisición de un segundo dominio β -defensina, aunque tiene un menor impacto sobre la actividad antibacteriana y antiparasítica, parece mejorar algunas propiedades biológicas de Gga-AvBD11, como las actividades anticancerígenas [58]. Es atractivo especular que razones similares podrían haber apoyado la aparición de un segundo dominio en algunas β -defensinas de reptiles. Sin embargo, estas β -defensinas sólo se han descrito hasta ahora en lagartos, y sus actividades no han

sido evaluadas. Por tanto, el papel biológico y evolutivo de estas moléculas sigue sin explorarse en las especies de reptiles.

En los reptiles también se ha descrito la expresión de β -defensinas con carga neta negativa [13,18,50]. Aunque menos abundantes y caracterizadas que sus homólogas catiónicas, las β -defensinas aniónicas con actividad de amplio espectro también pueden desempeñar un papel importante en las defensas del hospedero contra infecciones bacterianas, como atestigua la presencia de estas moléculas en las secreciones de algunas especies de anfibios [62].

4.2.3 Actividad biológica de las β -defensinas de los reptiles

A nivel funcional, las defensinas humanas (y las de mamíferos en general) han desempeñado un papel importante en nuestra comprensión del papel de estos péptidos en la inmunidad, y muchas de sus actividades biológicas han sido ampliamente exploradas [26,63,64]. Sin embargo, varios miembros de la subfamilia de las β -defensinas de vertebrados han atraído menos atención y permanecen en gran medida sin caracterizar.

Aunque inicialmente fueron reconocidas por sus actividades antimicrobianas [65], actualmente hay varias evidencias que apoyan un papel más amplio de las β -defensinas en la inmunidad de los organismos [26,63]. En los reptiles, estas moléculas sólo han sido caracterizadas funcionalmente en tortugas, con énfasis en su actividad antimicrobiana *in vitro* [51,66]. Por ejemplo, la TBD1, una β -defensina aislada de los leucocitos de la tortuga europea *Emys orbicularis*, mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y hongos, en un rango de concentraciones similares a lo observado para la α -defensina humana HNP1 [66]. Adicionalmente, la actividad antimicrobiana de la β -defensina Ps-BD2 de *Pelodiscus sinensis* ha sido investigada. En este caso, la Ps-BD2 recombinante, expresada en levaduras, también mostró una amplia actividad antimicrobiana [51].

Aunque la actividad biológica de las β -defensinas de otros grupos de reptiles no ha sido evaluada directamente, pero sí se han obtenido algunos datos sobre su posible pa-

pel en la inmunidad de estos animales a partir de estudios de expresión de ARNm y citología. Al igual que en los mamíferos y las aves, la expresión de las β -defensinas es variable en reptiles de acuerdo a la especie y el tejido estudiado. En este sentido, la expresión de genes de β -defensinas ha sido descrita en varios tejidos, desde la piel y las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, reproductivo o respiratorio, hasta órganos "menos expuestos" como el cerebro, el corazón, el hígado o incluso los músculos [13,18,51,67]. Algunas defensinas también están presentes en los gránulos citoplasmáticos de los granulocitos de varias especies de reptiles [68,69].

Estudios de inmunomarcado en *A. carolinensis* han demostrado que algunas defensinas son almacenadas en los gránulos inespecíficos de los granulocitos polimorfonucleados o heterófilos, y que en su mayoría están ausentes en otros tejidos [70,71]. Durante el proceso de cicatrización, los granulocitos son reclutados en el lugar del daño, y tras su activación, las β -defensinas son liberadas hacia el espacio extracelular, contribuyendo a generar una barrera defensiva inicial contra los microbios. También ha sido descrito que la concentración de β -defensinas es mayor en los fagosomas que contienen bacterias en degradación. Todos estos elementos apoyan el papel activo de las β -defensinas en la eliminación de las infecciones bacterianas en reptiles [70,72].

Aunque la función antibacteriana de las β -defensinas de los reptiles parece más evidente, su potencial papel como inmunomoduladores permanece poco explorado. Algunos estudios sugieren que la ausencia de un ambiente inflamatorio severo en la cola de los lagartos favorece la regeneración de los tejidos [73]. Por tanto, se ha propuesto que la secreción de β -defensinas podría contribuir a la angiogénesis y a la cicatrización de los tejidos, aunque todavía no se ha demostrado ninguna actividad anti-inflamatoria por parte de las defensinas de lagarto.

Muchas de las propiedades descritas anteriormente sí han sido demostradas para las defensinas de mamíferos [64]. También, hay evidencias que sugieren una asociación significativa entre los genes que codifican a las Gg-AvBD-2 y -7 en gallinas y la respuesta de anticuerpos a una vacuna contra *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [74], lo que

sugiere un papel activo de las defensinas de aves en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedero. Por lo tanto, resulta atractivo especular que las actividades inmunomoduladoras podrían formar parte de las "actividades básicas" de la mayoría de las β -defensinas de los vertebrados, incluidas las de los reptiles.

4.3 Familia de las catelicidinas

Al igual que las defensinas, las catelicidinas son una de las familias más importantes de HDPs en vertebrados. Estos péptidos fueron descubiertos inicialmente en gránulos de neutrófilos bovinos [75,76] y contienen en su N-terminal una región denominada dominio catelina, la cual presenta cuatro cisteínas altamente conservadas [75]. El nombre de este dominio proviene de observaciones iniciales que indicaron que esta región compartía un alto por ciento de identidad con una catelina de cerdos, un péptido inhibidor de la endopeptidasa cathepsin L aislado de los neutrófilos de este animal [76]. En la actualidad, péptidos tipo catelicidina han sido identificados en todos los grupos de vertebrados estudiados [7] (**Figura 3**).

4.3.1 Número de genes, organización genómica y características de los precursores de catelicidinas

El número de genes de catelicidina puede variar según la especie. Por ejemplo, sólo existe un único gen en humanos, ratones y perros, mientras que en la mayoría de los otros vertebrados y muchos de los mamíferos contienen de 2 a 11 genes codificantes para catelicidinas [49,77–79]. Específicamente en reptiles, 4 genes de catelicidinas han sido descritos en el lagarto *A. carolinensis* [80], 3 en el dragón de Komodo [50] y 6 en tortugas [81] y aligátors [12]. No obstante estas diferencias en el número de secuencias, los genes de catelicidinas se agrupan en la misma región del genoma (ej. cromosoma 3 en humanos) [49,50,76], y la posición y orientación de los mismos se encuentra de cierta manera conservada entre especies relacionadas [49,75].

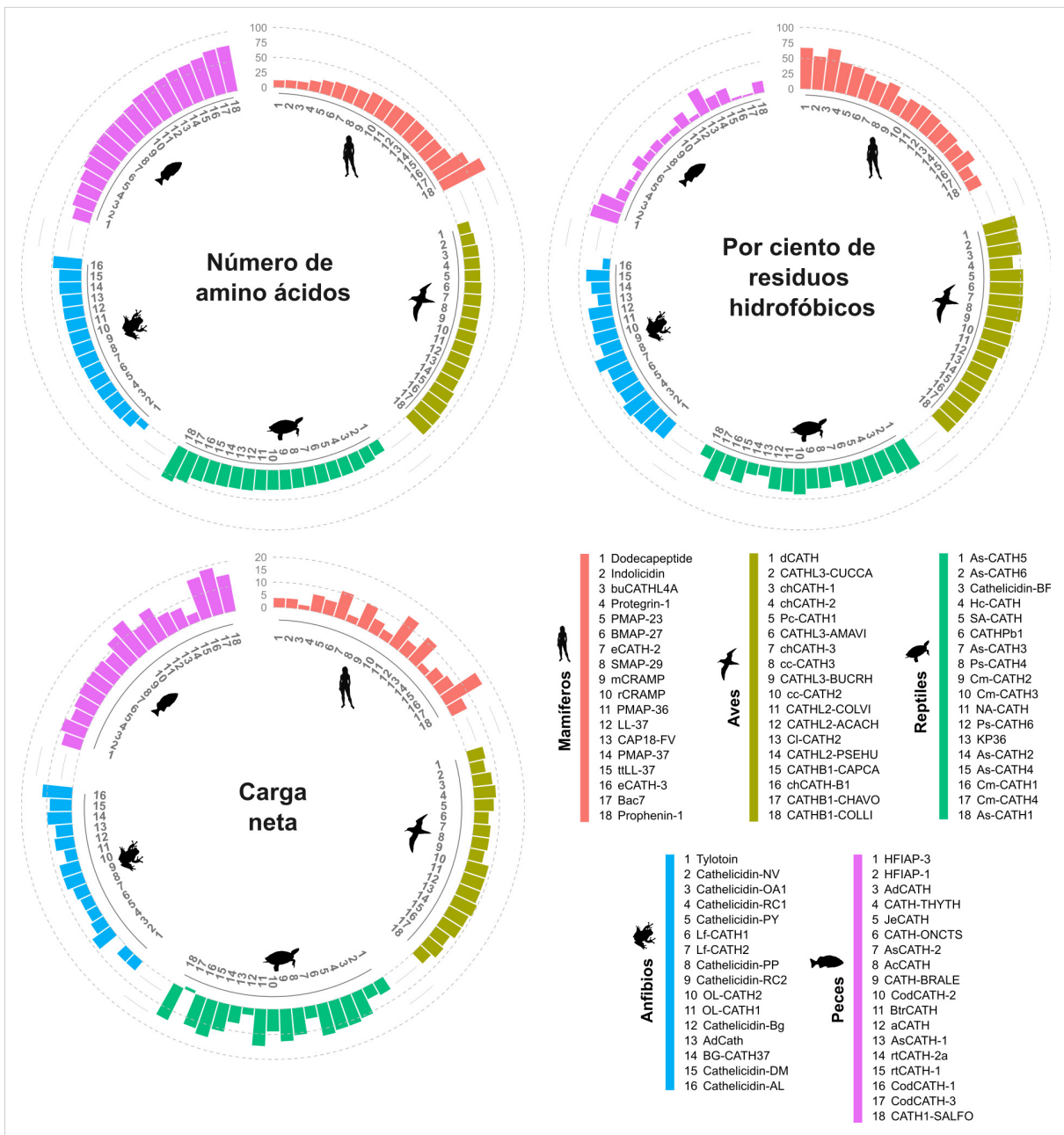


Figura 3: Diversidad de las catelicidinas entre los distintos grupos de vertebrados. Los gráficos de barras circulares muestran la distribución de la longitud, la carga neta y la proporción de aminoácidos hidrofóbicos entre catelicidinas representativas de varias especies de vertebrados. Imagen modificada de Alford et al. [7].

En contraste con las defensinas, la estructura de los genes de catelicidina parece estar bien conservada entre los vertebrados, la cual está compuesta por cuatro exones que codifican colectivamente para el péptido precursor consistente en un péptido señal, una pro-pieza relativamente larga (~100 aminoácidos) correspondiente al dominio catelina y la secuencia madura [77,82]. En particular, la región del péptido maduro está normalmente codificada por el último exón. Aunque existe una mayor identidad de secuencia de aminoácidos para el dominio de la catelina entre diferentes especies, los péptidos maduros de las catelicidinas son notablemente diversos en cuanto a su longitud, composición, carga neta y estructura (**Figura 3**). Estructuras tipo α -hélices son las más comunes en esta familia de HDPs y se pueden observar en catelicidinas de todos los grupos de vertebrados [7], incluidos los reptiles (**Figura 1**); no obstante, otras clases estructurales también están presentes [7].

4.3.2 Expresión y procesamiento de los precursores de catelicidinas

Los péptidos de catelicidinas son expresados de manera constitutiva, principalmente por células del sistema inmune, aunque también pueden encontrarse en células epiteliales, superficies de las mucosas y la piel [26,82]. Adicionalmente, estos niveles pueden incrementarse en respuesta a infecciones, mediadores inflamatorios y otras moléculas como la vitamina D [7]. En especial, muchas catelicidinas son almacenadas en los gránulos de los neutrófilos [76], listas para ser liberadas al medio circundante luego de la estimulación celular. Curiosamente, varias catelicidinas han sido identificadas como parte del veneno de varias serpientes [83].

En mamíferos, los precursores de catelicidinas son procesados por proteasas residentes en los diferentes tejidos para dar lugar al péptido maduro, y con frecuencia a otras variantes más cortas [7]. Por ejemplo, la proteinasa 3 y varias kalikreinas procesan a la LL-37 en humanos [7], mientras que varias catelicidinas en caballos y ganado son procesadas por la elastasa de neutrófilos [84]. En este sentido, también se ha sugerido un papel importante para esta última en el procesamiento de las catelicidinas de aves [85], peces [86] y reptiles [87]. Aunque esto no ha sido experimentalmente verificado en la

mayoría de los casos. De manera interesante, proteasas tipo tripsina han sido propuestas también, además de la elastasa, para el procesamiento de las catelicidinas en anfibios [88,89].

4.3.3 Actividad biológica de las catelicidinas en reptiles

Entre las primeras catelicidinas identificadas y mejor caracterizadas en reptiles son aquellas derivadas del veneno de serpientes [83]. Diversos trabajos han demostrado que estos péptidos y las catelicidinas de otros reptiles ejercen una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos [12,80,83,90]. Con frecuencia, las catelicidinas de reptiles también son capaces de inhibir la formación y erradicar biopelículas de varias especies de bacterias [12,83,90].

Muchas de estos péptidos presentan además baja actividad hemolítica y citotóxica contra las células de mamíferos [12,83,90] y pueden inhibir la producción de mediadores proinflamatorios inducidos por LPS en los macrófagos de mamíferos *in vitro* [12,90]. Por otro lado, también se ha observado la capacidad de inducción de quimiocinas y citoquinas anti-inflamatorias en varias catelicidinas de reptiles [81,91].

Varios estudios han demostrado que las catelicidinas de reptiles pueden incluso influir en otros procesos inmunitarios. Por ejemplo, la catelicidina de serpiente denominada catelicidina-WA (también conocida como catelicidina-BF) promovió la polarización hacia un tipo M2 de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados por *Escherichia coli* [92]. Cuando esta fue co-administrada en conjunto con bacterias, la catelicidina-WA suprimió indirectamente la producción de mediadores proinflamatorios, y los macrófagos tipo M2 CD206+ resultantes mostraron una mayor expresión de varias citoquinas anti-inflamatorias, pero otras funciones celulares importantes como la fagocitosis no fueron modificadas. Este péptido también se evaluó como tratamiento para la diarrea bacteriana en lechones destetados [93]. En este sentido, la administración de la catelicidina de serpiente atenuó la diarrea y redujo los niveles de inflamación sistémica y en el yeyuno de los lechones, de forma similar a lo observado con el antibiótico Enrofloxacin. Sin embargo, sólo el tratamiento con la catelicidina-WA mejoró la morfología, integridad, funciones de

barrera, así como la composición y el metabolismo microbiano en los intestinos de los animales tratados [93].

Recientemente, Chen et al. [12] caracterizaron las actividades de seis nuevas catelicidinas (As-CATH1-6) identificadas en el aligátor chino *A. sinensis*. En general, estos péptidos difirieron en sus perfiles de actividad *in vitro* y en su eficacia en modelos murinos de peritonitis bacteriana. Curiosamente, dicha eficacia estuvo más relacionada con la capacidad de estos péptidos para reclutar células inmunitarias en el lugar de la infección que con las actividades antimicrobianas evaluadas. Así, los péptidos As-CATH4-6 mostraron una buena actividad antimicrobiana, antibiopelícula y de neutralización de LPS *in vitro*, a la vez que suprimían la producción de mediadores proinflamatorios (óxido nítrico, interleucina (IL)-6, IL-1 β y TNF- α) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Estos resultados contrastaron con las limitadas actividades observadas *in vitro* para As-CATH1-3. Sin embargo, cuando se evaluaron *in vivo*, As-CATH2-6 fueron capaces de reclutar neutrófilos, monocitos y macrófagos al lugar de la infección y protegieron a los ratones contra la infección bacteriana en distintos grados. Por el contrario, As-CATH-1 solo reclutó macrófagos de forma moderada y no mostró ningún efecto protector *in vivo* [12], lo que sugiere un papel menor de esta catelicidina en la prevención de infecciones bacterianas en aligátos.

Aparte de la amplia y potente actividad antimicrobiana y antibiopelícula de las catelicidinas As-CATH4 y As-CATH5, así como de su capacidad inmunomoduladora en ratones [12], estos péptidos fueron capaces de acentuar la actividad enzimática de la lisozima y las fosfatasa ácida y alcalina del cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*), incrementando la supervivencia de estos animales al ser retados con varias bacterias patógenas [94]. Por otro lado, As-CATH5 además mostró un efecto antiviral en el camarón siberiano *Exopalaemon modestus*, el cual fue también asociado con su capacidad inmunomoduladora [95]. Estos resultados destacan la importancia de la modulación inmune para la actividad anti-infecciosa de las catelicidinas de cocodrilianos *in vivo* y ponen de manifiesto el potencial terapéutico de estas catelicidinas, y las catelicidinas de reptiles en general, para el tratamiento de infecciones causadas por diversos patógenos.

4.4 Mecanismos de acción antimicrobiana de β -defensinas y catelicidinas de reptiles

El mecanismo de acción de los HDPs para ejercer su actividad antimicrobiana es un fenómeno complejo, que probablemente se ve influenciado por varios factores como las características de las superficies bacterianas y de los péptidos investigados (ej. secuencia primaria, estructura, propiedades físico-químicas, etc.) [22,96]. Adicionalmente, dada la diversidad de HDPs y especies bacterianas en la naturaleza, es improbable que un solo mecanismo de acción universal, o unos pocos, logren explicar completamente la actividad antimicrobiana de los HDPs en todos los casos posibles. No obstante, varios estudios han brindado algo de información al respecto, lo que ha contribuido a entender un poco mejor este enrevesado problema.

En general se piensa que los HDPs interactúan electrostáticamente en una primera instancia con estructuras y componentes de las membranas bacterianas cargados negativamente (ej. moléculas de LPS en bacterias Gram-negativas y de ácido teicoico en Gram-positivas) [22,96]. Luego de esta aproximación inicial, se ha sugerido que estos péptidos interactúan con las membranas bacterianas, e igualmente dicha unión pudiera estar estabilizada por interacciones electrostáticas entre los residuos básicos de los péptidos y las cabezas polares de los lípidos aniónicos bacterianos[22]. Adicionalmente, los residuos hidrofóbicos de los HDPs juegan un papel importante al interactuar con las cadenas apolares de los lípidos de la membrana [22]. Una vez alcanzada una cantidad suficiente de péptido unido a la membrana, esta interacción puede llegar a tener un efecto disruptivo, conllevando a la pérdida de la integridad de la membrana y a la liberación del contenido intracelular, o no disruptivo, resultando en este caso en la translocación de los HDPs hacia el interior celular [22,96].

Varios modelos derivados de estudios *in vitro*, en particular con modelos de membrana, han sido propuestos para explicar la interacción disruptiva de los HDPs hacia las membranas bacterianas. Entre ellos se pueden mencionar el mecanismo de barril, el de poro toroidal o el mecanismo de carpeta (**Figura 4**) [22]. Aunque dichos modelos son

informativos en cuanto a posibles propiedades de los HDPs que pudieran ser importantes para su actividad biológica, estos han sido difíciles de replicar utilizando bacterias completas y otras limitaciones en las condiciones experimentales empleadas han puesto en duda la validez *in vivo* [23].

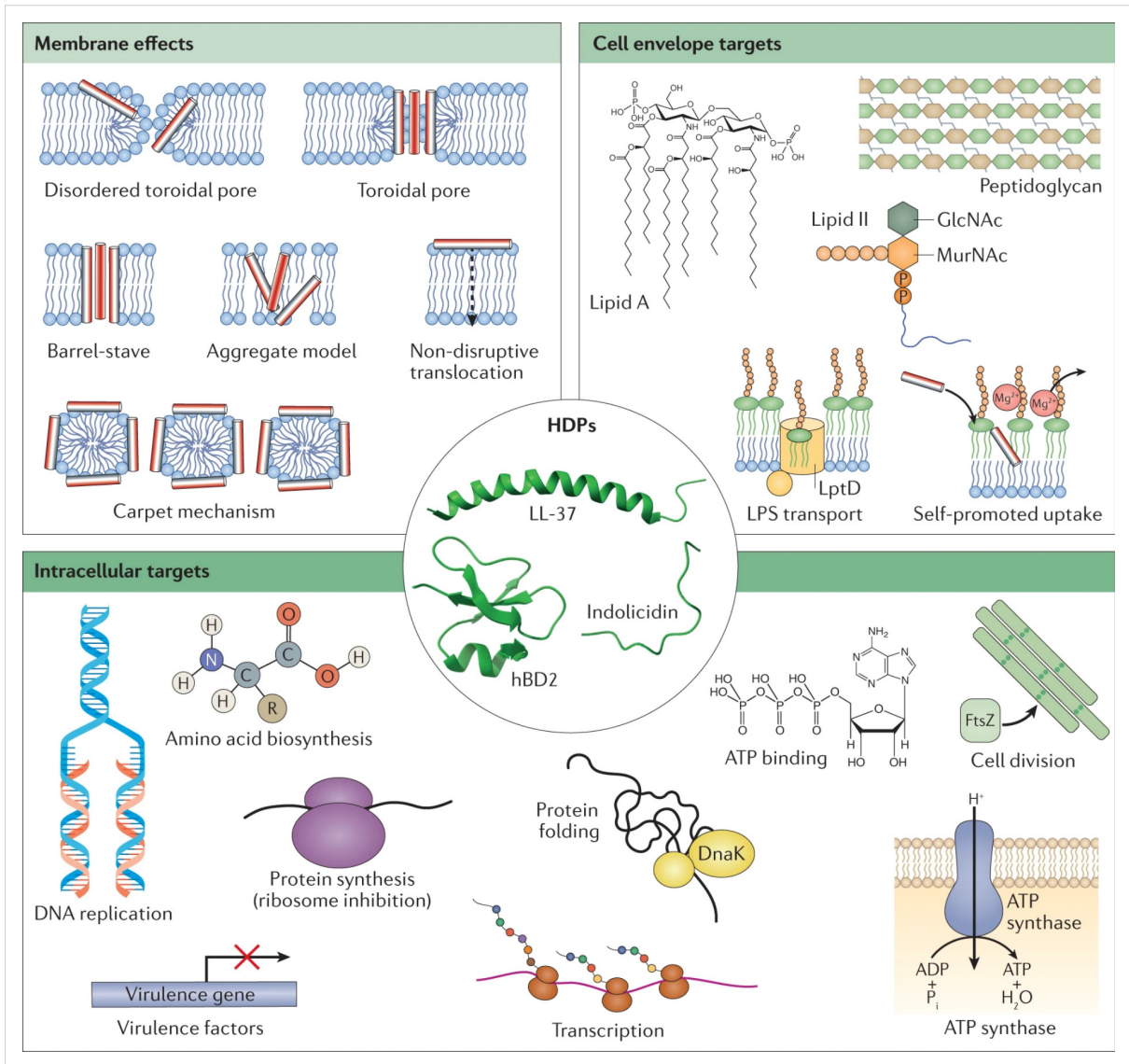


Figura 4: Mecanismos de acción propuestos para la actividad antimicrobiana de los HDPs. Estos péptidos pueden interactuar con elementos extracelulares como la membrana citoplasmática o la pared celular, así como con varios elementos intracelulares, interfiriendo de esta manera con procesos claves para la supervivencia bacteriana. Imagen tomada de Hancock et al. [23].

Mientras que la interrupción de la membrana plasmática puede ser importante para la actividad antimicrobiana de algunos HDPs, otros estudios han demostrado que algunos péptidos no actúan causando lisis celular, sino mediante la interacción con otros componentes bacterianos intra y extra-celulares, afectando así varios procesos vitales para la supervivencia bacteriana (**Figura 4**) [23,96].

En el caso de las β -defensinas, varios mecanismos han sido propuestos para explicar su efecto antimicrobiano, como la permeabilización de las membranas bacterianas [97,98] y la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana al interactuar con el precursor lípido II [99]. Aunque esta actividad ha sido descrita previamente para algunos péptidos de esta familia en reptiles, sus mecanismos de acción específicos no fueron investigados [51,66]. No obstante, dado que los mecanismos descritos anteriormente parecen ser compartidos por miembros de diferentes subfamilias de las defensinas de vertebrados e invertebrados [100–102], es razonable especular que las β -defensinas de reptiles podrían actuar de manera similar.

Otros trabajos apuntan a que las catelicidinas de reptiles, a altas concentraciones (ej. $5 \times \text{MIC}$), causan alteraciones morfológicas en las membranas plasmáticas bacterianas con la consecuente lisis celular [12,91,103], sugiriendo que estos péptidos actúan mayormente a nivel de membrana. Esto es consistente con lo observado para otros miembros de la familia de las catelicidinas con estructura α -helicoidal, como la LL-37 [104]. No obstante, un estudio reciente con una catelicidina de serpiente indicó que a bajas concentraciones (ej. $1/4 \times \text{MIC}$), este péptido no causa daño en la membrana o lisis celular, pero es capaz ingresar al interior celular y formar agregados en la región del nucleóide bacteriano, posiblemente afectando el proceso de transcripción [103]. Estos resultados resaltan complejidad de los mecanismo de acción de los HDPs (**Figura 4**) y soportan la idea de que, en dependencia del contexto, HDPs pueden seguir diferentes vías para ejercer su actividad biológica [23,96].

4.5 Métodos bioinformáticos para la identificación de HDPs

El crecimiento exponencial de la información en bases de datos públicas derivado de las tecnologías ómicas, como la genómica y transcriptómica, posibilita la identificación y el estudio de nuevas secuencias de HDPs utilizando herramientas *in silico*. Entre las bases de datos más conocidas podemos mencionar la UniProtKB⁵ (del inglés *Universal Protein Resource Knowledgebase*) [105] y el GenBank⁶ [106], esta última manejada por el NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Aunque no son las únicas, estas dos bases de datos albergan una enorme cantidad de información; por ejemplo, solamente GenBank contiene millones de secuencias de nucleótidos de más de 450,000 especies [106] y continúa creciendo de manera exponencial cada año.

Debido al interés que despiertan los HDPs por su gran potencial terapéutico, varios trabajos se han enfocado en tratar de automatizar y perfeccionar los métodos para la identificación de nuevas secuencias utilizando diversos algoritmos computacionales, incluyendo varios de *machine learning* [107–110]. No obstante, muchos de estos programas presentan algunas desventajas ya que son diseñados para predecir regiones o secuencias con potencial antimicrobiano una vez identificada la región del péptido maduro, y por tanto son incompatibles con la utilización de fragmentos genómicos directos, donde es necesario predecir las regiones codificantes y estas están frecuentemente interrumpidas por intrones. Esto conlleva en algunos casos a una baja precisión de predicción [110]. Adicionalmente, muchas de estas herramientas son diseñadas como aplicaciones web [109] por lo que presentan una pobre integración en flujos de trabajo con otras herramientas de predicción y análisis de secuencias.

Estrategias basadas en homología de secuencia utilizando alineamientos locales o búsqueda de patrones conservados han probado ser de mucha utilidad para el estudio de HDPs [111]. En este sentido, dos de las herramientas más populares para cada una de estas metodologías son BLAST⁷ (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) [112] y

5 <https://www.uniprot.org/uniprot/>

6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

7 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

HMMER3⁸ [113]. En especial, HMMER3 muestra una gran precisión y sensibilidad en la detección de homólogos debido a la utilización de modelos de probabilidad asociados (denominados modelos ocultos de Markov) [111,114].

Estas metodologías, o combinación de ellas, han sido aplicadas con éxito en el estudio de secuencias de β -defensinas y catelicidinas en varias especies de vertebrados [13,16–18]. Las predicciones genómicas son usualmente seguidas de experimentos de biología molecular para confirmar la identidad de las secuencias y ganar información acerca del patrón de expresión de las mismas [16,17]. Sin embargo, este último paso, con frecuencia limitado por la disponibilidad de muestras biológicas, no es indispensable para la identificación de secuencias con buena actividad biológica [11,115,116].

Específicamente en reptiles, varias secuencias de estas familias han sido identificadas mediante estas herramientas *in silico* en lagartos [18,50,80], serpientes [116], tortugas [51,117] y cocodrilianos [11–13].

8 <http://hmmer.org/>

5 Materiales y métodos

5.1 Predicción y análisis *in silico* de secuencias de HDP de cocodrilianos

5.1.1 Identificación de secuencias tipo β -defensinas y catelicidinas usando modelos ocultos de Markov

Para la identificación de secuencias de β -defensinas y catelicidinas en las cuatro especies de cocodrilianos se utilizaron las versiones iniciales de los ensamblajes de los genomas generadas por St John et al. [14], así como las versiones descargadas de GenBank ASM28112v4 (No. acceso: GCA_000281125.4) de *A. mississippiensis*, ASM45574v1 (No. acceso: GCA_000455745.1) de *A. sinensis* [15], CroPor_comp1 (No. acceso: GCA_001723895.1) de *C. porosus* y GavGan_comp1 (No. acceso : GCA_001723915.1) de *G. gangeticus*.

Posteriormente se desarrolló un flujo de trabajo utilizando el programa Snakemake versión 5.3.0 [118], lo que permitió automatizar el análisis. Primeramente, modelos ocultos de Markov específicos (motivos estructurales) para cada familia de HDPs fueron generados usando el paquete de programas HMMER versión 3.22, a partir del alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos correspondientes a β -defensinas o catelicidinas de amniotas (reptiles, aves y mamíferos). Dichas secuencias fueron obtenidas de las bases de datos Genbank y UniProtKB, así como de la literatura científica publicada. Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el programa MAFFT versión 7.310 (del inglés *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) [119], empleando el método iterativo con refinamiento L-INS-i y fueron curados manualmente utilizando el programa AliView versión 1.26 [120].

La búsqueda de los motivos estructurales generados se realizó con HMMER en los seis marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) para cada versión de los genomas utilizada. Aquellas regiones genómicas donde se encontraron coincidencias fueron extraídas y ampliadas 5 kilo pares de bases río arriba y abajo de cada

coincidencia. Seguidamente, se realizó un alineamiento de estas regiones contra las secuencias de amniotas utilizadas al inicio del análisis, empleando la función protein2genome del programa Exonerate versión 2.4 [121] y el programa SCIPPO versión 1.4 [122].

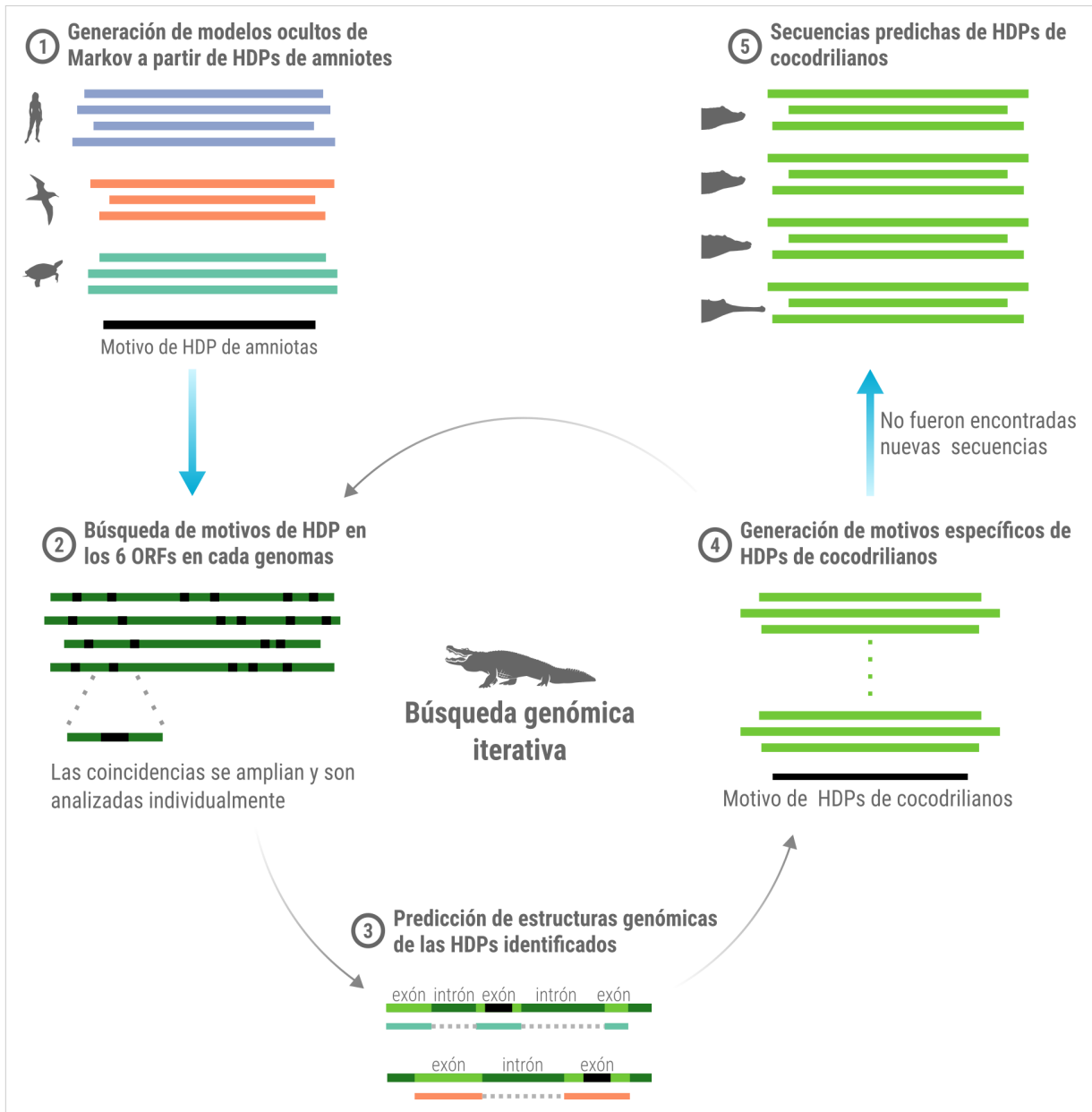


Figura 5: Esquema general de los pasos de la estrategia bioinformática utilizada. La estrategia seguida para la identificación de β -defensinas y catelicidinas en los genomas de los cocodrilianos consistió de cinco pasos principales.

Luego de seleccionar para cada coincidencia el mejor par de alineamiento región-HDP, este fue cuidadosamente revisado y curado para obtener la mejor predicción de exones e intrones de los genes ortólogos. El proceso descrito anteriormente fue repetido hasta que no se logró encontrar ninguna nueva secuencia, partiendo para cada nueva búsqueda de un nuevo alineamiento conformado solamente con las secuencias de cocodrillanos encontradas en las iteraciones anteriores (**Figura 5**).

Los dominios del péptido señal en las secuencias crocBDs y crocCATHs identificadas fueron predichos empleando el SignalP 5.0 server⁹ [123]. En cambio, la predicción de las regiones de los péptidos maduros se realizó a partir de la información de otras secuencias de reptiles previamente publicadas en la literatura.

5.1.2 Análisis filogenético de las secuencias tipo β -defensinas

El análisis filogenético de las crocBDs se realizó con el programa PhyML versión 3.3.20190321 [124] utilizando el criterio de máxima verosimilitud. En este análisis se incluyeron secuencias de reptiles, aves y mamíferos que contenían las regiones del péptido señal, pro-pieza y péptido maduro. Las β -defensinas de anfibios CFBD1 (No. acceso en GenBank: AHF22421) y RpuBD1 (No. acceso en GenBank: AJQ17189) de *Cynops fudingensis* y *Rhacophorus puerensis*, respectivamente, fueron utilizadas como grupo externo para enraizar el árbol. Se consideró al JTT+I+G como mejor modelo de sustitución de aminoácidos, según los criterios de información de Aikaike y Bayesiano implementados en el programa Protest versión 3.4.2 [125]. La topología, las longitudes de rama y los parámetros de tasa del árbol fueron optimizados por PhyML al iniciar el análisis utilizando los algoritmos NNI (del inglés *Nearest Neighbor Interchange*) y SPR (del inglés *Subtree Pruning and Regrafting*). Además, la proporción de sitios invariables y la forma de la distribución gamma con cuatro categorías fueron estimados por PhyML. Finalmente, el árbol filogenético fue editado en iTOL versión 4 [126].

⁹ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>

5.1.3 Modelado estructural *in silico* y análisis de las características físico-químicas de las variantes de β -defensinas

Las secuencias de aminoácidos de las crocBDs identificadas y otras previamente descritas en la literatura [13] fueron alineadas con AliView y la región que comprende el marco de cisteínas (incluyendo un residuo extra en el N- y C-terminal) fue extraída para cada una de ellas. La carga neta de las regiones fue entonces predicha con el paquete Peptides versión 2.4.2 [127] en R versión 4.1.1 [128] y RStudio versión 1.4.1103 [129], utilizando la escala de Bjellqvist [130] y considerando pH 7.0. El índice de hidrofobicidad, definido como la suma de los valores de hidrofobicidad de los aminoácidos individuales dividida por el número de residuos en la secuencia, se calculó utilizando la escala de Kyte-Doolittle [131], implementada en el mismo paquete.

El análisis de agrupamientos también fue realizado en R utilizando el algoritmo PAM (del inglés *Partitioning Around Medoids*) implementado en el paquete fpc versión 2.2-8. El número de particiones (k) se estimó utilizando los métodos de la brecha (*gap*) y de la silueta. También se empleó el paquete NbClust versión 3 [132], que proporciona 30 índices diferentes para determinar k .

Los modelos tridimensionales de las crocBDs seleccionadas para su síntesis química fueron generados usando el servidor I-TASSER1 [133], especificando los puentes disulfuro de acuerdo a las conectividades encontradas en las β -defensinas de otros vertebrados: Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6 [58,59]. Posteriormente, las estructuras fueron minimizadas utilizando el programa GROMACS versión 2018.1 [134] con el campo de fuerza amber99sb-ildn. Los modelos se visualizaron utilizando el programa UCSF Chimera versión 1.14 [135] y posteriormente fueron alineados utilizando como referencia la β -defensina 3 humana (HBD3, No. acceso en PDB: 1KJ6). La superficie de los modelos fue coloreada en Chimera basada en los valores del potencial electrostático (superficie coulombica) y de hidrofobicidad de los residuos expuestos al solvente (superficie hidrofóbica). En este último caso fue usada nuevamente la escala de Kyte-Doolittle [131].

Adicionalmente, las estructuras fueron artificialmente divididas en dos mitades a través de su eje longitudinal. Este plano divisorio se construyó en Chimera utilizando el punto central de cada molécula, el cual fue estimado utilizando todos los residuos de aminoácidos. La carga neta de cada mitad fue entonces calculada mediante el programa GROMACS, mientras que el índice de hidrofobicidad se determinó sumando los valores de los residuos individuales según la escala de Kyte-Doolittle [131].

5.1.4 Análisis filogenético de las secuencias tipo catelicidinas

El análisis filogenético de las crocCATHs se realizó utilizando el programa RaxML versión 8.2.12 [136], el cual utiliza el criterio de máxima verosimilitud. Secuencias de catelicidinas provenientes de varias especies reptiles, aves, mamíferos que contenían las regiones del péptido señal, pro-pieza y péptido maduro fueron incluidas en el análisis. Las secuencias de anfibios Ol-CATH2 de *Odorrana livida* (No. acceso en Genbank: AXR75914) y Bg-CATH de *Bufo gargarizans* (No. acceso en Genbank: ANV28414) fueron utilizadas como grupo externo para enraizar el árbol. Se adoptó el modelo VT+G4 como mejor modelo de sustitución de aminoácidos, según los criterios de información de Aikaike y Bayesiano implementados en el programa ModelTest-NG versión 0.1.6 [137]. El análisis rápido con 1,000 repeticiones de *bootstrap* y la determinación del árbol de máxima verosimilitud de mayor puntuación se realizó en una misma corrida en RaxML. Finalmente, el árbol filogenético resultante fue visualizado y editado usando los paquetes treeio [138] y ggtree [139] en R.

5.1.5 Predicción de las características físico-químicas y estructurales de las catelicidinas de cocodrilianos

Varias propiedades físico-químicas como la longitud, carga neta e índice de hidrofobicidad de las catelicidinas sintéticas fueron predichas con el paquete Peptides versión 2.4.2 [127] en RStudio versión 1.4.1103 [129]. En el caso de la carga neta, fue utilizada la escala de Bjellqvist [130], suponiendo pH 7.0, mientras que el índice de hidrofobicidad fue calculado utilizando la escala de Kyte-Doolittle [131]. Por otro lado, el momento hidrofóbico medio fue estimado con el paquete modIAMP versión 4.3.0 [140] en Python

versión 3.9.6, empleando un ángulo de 100° (recomendado para estructuras tipo α -hélices [141]). Adicionalmente, representaciones en rueda de la distribución de los residuos hidrofóbicos y cargados de las catelicidinas fueron también generadas utilizando dicho paquete.

Modelos tridimensionales de las crocCATHs fueron obtenidos usando una versión ligeramente simplificada del algoritmo AlphaFold versión 2.0 [142], la cual fue implementada en Google colab¹⁰ [143] y es de acceso gratuito. Las estructuras fueron finalmente visualizadas en el programa Chimera X versión 1.2.5 [144].

5.2 Péptidos y reactivos generales

5.2.1 Síntesis y purificación de HDPs

Las secuencias de aminoácidos de las crocBDs y crocCATHs utilizadas en esta tesis se muestran en la **Tabla 1** y **Tabla 4** de la sección de Resultados.

La variante Cp13QK de crocBD fue sintetizada químicamente por la compañía ChinaPeptides (China), mientras que Am2HR, Am11RR, Am17RV, Am23SK se obtuvieron de Genscript (EEUU). Los péptidos crudos fueron purificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC, del inglés *Reversed-Phase-High Performance Liquid Chromatography*) utilizando una columna semipreparativa Discovery® BIO Wide Pore C18 (Supelco, Millipore Sigma, EE.UU.). Las fracciones que contenían las masas moleculares esperadas de los péptidos reducidos, determinadas por el análisis de espectrometría de masas por ionización de electrospray (ESI-MS, del inglés *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) (Finnigan LCQFleet, Thermo Scientific, EE.UU.) fueron liofilizadas y conservadas a -20 °C.

La variante recombinante de la HBD3, el cual que contiene un residuo de metionina adicional en el N-terminal (MGIINTLQKYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKRKK), fue producida en *E. coli* (BL-21) y purificada según lo descrito anteriormente [145].

¹⁰ <https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>

El péptido sintético 1018 (VRLIVAVRIWRR-NH₂) utilizado como control en los experimentos de inmunomodulación [146], así como la catelicidina humana LL-17 (LLGDFFR-KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES) fueron obtenidos comercialmente de CPC Scientific Inc. (EE.UU.) con una pureza superior al 95 %.

Por otra parte, las cuatro catelicidinas de cocodrilianos fueron sintetizadas químicamente por Genscript (EE.UU.) con una pureza superior al 95 %.

Para su caracterización funcional, todos los péptidos purificados fueron resuspendidos en agua destilada libre de endotoxinas (Baxter, EE.UU.). Sus concentraciones fueron entonces estimadas por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro tipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) usando los coeficientes de extinción teóricos de cada molécula. Dichos coeficientes fueron estimados usando la herramienta ProtParam¹¹ del servidor ExPASy [147]. En el caso de LL-37, dado que no contiene residuos que absorben a 280 nm, su concentración fue estimada por peso, suponiendo que el liofilizado contiene aproximadamente un 70 % de masa peptídica.

5.2.2 Plegamiento *in vitro* de las variantes sintéticas de β -defensinas

Para la formación de los puentes disulfuro de las variantes de β -defensinas sintetizadas, los péptidos purificados y en estado reducido fueron plegados siguiendo la metodología descrita en Boniotto et al. [148]. Brevemente, el plegamiento oxidativo se realizó en presencia de cloruro de guanidinio 1 M, acetato de amonio 0.1 M y EDTA 2 mM (pH 7.5). El par redox cistina-cisteína (proporción 0.1:1 mM) se preparó inmediatamente antes de su uso y la mezcla se saturó con N₂ antes de añadir el péptido a una concentración final de 10 μ M (relación final péptido:cistina:cisteína = 1:10:100). La reacción procedió a 4°C durante 96 horas, momento en el que el pH se redujo a 2 con la adición de HCl 6 N. A continuación, los péptidos oxidados fueron desalados y purificados mediante RP-HPLC analítica usando una columna Discovery C18 (Supelco, EE.UU.) con un gradiente lineal de acetonitrilo 10-40 % en ácido trifluoroacético 0.1 % durante 90 minutos (flujo de 1 mL/min), con detección a 230 nm. Los picos principales fueron luego colectados y

¹¹ <https://web.expasy.org/protparam/>

las masas moleculares confirmadas por ESI-MS. Sólo se seleccionaron para su posterior análisis aquellos picos con masas moleculares correspondientes a lo esperado para péptidos en estado oxidado.

5.2.3 Reactivos generales

Todos los reactivos utilizados en este trabajo, a no ser que se especifique lo contrario, fueron adquiridos de las casas comerciales Thermo Fisher Scientific (EE.UU), VWR (Canadá) o Millipore Sigma (EE.UU).

5.3 Determinación de la estructura secundaria de las catelicidinas sintéticas mediante dicroísmo circular

Todas las muestras fueron preparadas en solución amortiguadora de fosfato de sodio 25 mM (pH 7.4) a una concentración final de 100 μ M de péptido. Adicionalmente a las lecturas en esta solución, los espectros de las crocCATH fueron obtenidos en presencia de micelas de dodecil-sulfato (SDS) 10 mM o de dodecil-fosfocolina (DPC) 7.5 mM, preparadas en también en fosfato de sodio.

Los experimentos de dicroísmo circular (DC) en solución se llevaron a cabo utilizando un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco, Canadá) a temperatura ambiente, como se ha descrito anteriormente [149]. Brevemente, los espectros fueron obtenidos en un rango de longitudes de onda de 190-250 nm, utilizando un modo de barrido continuo con una respuesta de 1 segundo, con pasos de 0.5 nm, un ancho de banda de 1.5 nm y una velocidad de barrido de 50 nm/min. Para cada péptido, tres lecturas fueron utilizadas para mejorar la relación señal-ruido y los espectros fueron corregidos restando el fondo de la muestra. Las lecturas fueron realizadas en una celda de 0.1 cm de longitud con 200 μ L de volumen. Las celdas se enjuagaron con 600 μ L de solución amortiguadora y 100 μ L de la muestra antes de cada ejecución.

Finalmente, los datos fueron analizados como valores de elipticidad residual media y graficados en R. Adicionalmente, el por ciento de α -hélice en cada condición fue calculado utilizando el servidor online K2D3¹² [150].

5.4 Cepas bacterianas, líneas celulares y condiciones de cultivo

5.4.1 Medios de cultivo bacterianos

Los medios de cultivo bacteriano LB (Luria-Bertani), BHI (del inglés *Brain Heart Infusion*), TSB (del inglés *Tryptic Soy Broth*), THB (del inglés *Todd Hewitt Broth*) y MHB (del inglés *Mueller Hinton Broth*), así como los anticuerpos para los ensayos tipo ELISA (del inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific, EE.UU.

5.4.2 Medios de cultivo de células superiores

A no ser que se indique lo contrario, los suplementos y medios de cultivo de células superiores, así como los utilizados en el modelo de piel humana fueron adquiridos de Millipore Sigma (EE.UU).

5.4.3 Cepas bacterianas

En este trabajo fueron utilizadas las cepas bacterianas: *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC¹³ 14028 (en adelante *S. Typhimurium*), *S. aureus* SAP0017¹⁴, *S. aureus* USA300 LAC [151], *P. aeruginosa* PAO1 H103 [152], *Proteus vulgaris*¹⁵, *E. faecium* #1-1 (recursos BEI¹⁶, NR-31903), *A. baumannii* Ab5075 [153], *E. cloacae* 218R1 [154] y *K. pneumoniae* KPLN49 [155].

12 <http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>

13 <https://www.atcc.org/>

14 Aislado clínico resistente a la Metilina, donado por el Dr. T. Chow del *Vancouver General Hospital*, Canadá.

15 Obtenida de la colección de cepas bacterianas del laboratorio del Dr. Robert Hancock, *University of British Columbia*, Canadá.

16 BEI Resources, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), EE.UU. <https://www.beiresources.org/Home.aspx>

Para su utilización, las bacterias fueron sembradas en placas LB o BHI (en el caso de *E. faecium*) a partir de gliceroles congelados. Al día siguiente, precultivos bacterianos fueron preparados a partir de colonias individuales en medio LB o BHI y crecidos a 37 °C durante toda la noche con agitación a 250 rpm.

5.4.4 Líneas celulares y PBMCs humanos

Células HBE

Las células inmortalizadas humanas de epitelio bronquial (HBE, del inglés *Human Bronchial Epithelial Cells*) (16HBE14o-) [156] fueron utilizadas para los experimentos de citotoxicidad e inmunomodulación *in vitro*. Esta línea celular fue obtenida del Dr. Dieter Gruenert (*University of California San Francisco*, EE.UU.). Las células fueron cultivadas a 37 °C con atmósfera de CO₂ 5 %, en medio esencial mínimo (MEM, del inglés *Minimum essential medium*) suplementado con suero fetal bovino 10 % (v/v) (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) y L-glutamina (L-Gln) 2 mM. Las células HBE se pasaron a un nuevo frasco al alcanzar un 80-90 % de confluencia.

Células N/TERT

Las células de queratinocitos N/TERT utilizadas en los modelos de piel fueron proporcionadas por el Dr. Peter Nibbering (*Leiden University Medical Center*, Países Bajos). Estas fueron cultivadas en medio Keratinocyte-SFM suplementado con extracto de glándulas pituitarias bovinas 25 µg/mL, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante 0.2 ng/mL y CaCl₂ 0.3 mM. Las células se mantuvieron a 37 °C con atmósfera de CO₂ 7.3 %.

PBMCs humanas

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) fueron aisladas de la sangre de voluntarios sanos, de ambos sexos, bajo su consentimiento siguiendo los protocolos de éticas de la *University of British Columbia*, Canadá. La sangre fue recogida en tubos con heparina sódica (BD Biosciences, EE.UU.), diluída en igual vo-

lumen de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) pH 7.0 y colocada gentilmente sobre el medio Lymphoprep (STEMCELL Technologies Inc., Canadá). Los tubos se centrifugaron a $\sim 500 \times g$ durante 20 minutos en una centrífuga Allegra 6 (Beckman-Coulter, Canadá). Seguidamente, el anillo celular fue colectado y las PBMCs se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con FBS 10 % (v/v).

5.5 Ensayos de actividad antibacteriana y antibiopelícula

5.5.1 Actividad antimicrobiana de las variantes sintéticas de β -defensinas

La actividad antimicrobiana de las isoformas de crocBD fue determinada contra las cepas de *S. aureus* SAP0017 y *S. Typhimurium* mediante el método de microdilución en cultivo [157] siguiendo las recomendaciones del CLSI (del inglés *Clinical Laboratory and Standards Institute*). Adicionalmente, la variante Am23SK y la defensina humana HBD3 también fueron examinadas contra *E. cloacae* y *A. baumannii*. Los ensayos se realizaron empleando los medios TSB 5 % (v/v) en solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.4 (en adelante TSB 5 %), el cual fue suplementado con 0.1 % de glucosa (p/v) para el caso de *S. aureus*. Los antibióticos Tobramicina y Polymixina B fueron utilizados como comparación.

Las diluciones seriadas de las crocBDs/antibióticos fueron realizadas en agua destilada estéril (empezando con una concentración 10 veces la concentración final deseada), usando placas estériles de poli-propileno de 96 pocillos. Diez microlitros de cada dilución fueron entonces añadidos a los pocillos de tratamiento, mientras que los controles de esterilidad y los de crecimiento recibieron 10 μ L de agua. A continuación, 90 μ L de la suspensión bacteriana fueron añadidos a los pocillos de tratamiento y a los controles de crecimiento, mientras que los controles de esterilidad recibieron 90 μ L de medio de cultivo estéril. El inóculo final empleado en el ensayo fue de $\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL (UFC, unidades formadoras de colonias). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) fueron determinadas mediante inspección visual. La MIC para cada péptido/antibiótico se definió como la menor concentración de tratamiento donde no se apreció crecimiento bacteriano visible [157] y los valores indicados son la moda estadística de al menos tres experimentos independientes.

La densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de las placas también fue registrada a las 24 horas usando un lector de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, EE.UU.). Los datos de tres experimentos independientes se analizaron como porcentaje de crecimiento bacteriano utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ crecimiento} = \left(\frac{PT_{DO\ 600} - CE_{DO\ 600}}{CC_{DO\ 600} - CE_{DO\ 600}} \right) \times 100$$

Ecuación 1: Análisis de los datos de actividad antimicrobiana como por ciento de crecimiento bacteriano en solución (DO_{600}). PT representa la absorbancia de los pocillos tratados con péptidos, mientras que CE y CC representan la media de la absorbancia de los pocillos del control de esterilidad y del control de crecimiento de cada placa, respectivamente.

La capacidad bactericida de las crocBDs/antibióticos se determinó mediante un ensayo de gota. Luego de cuantificada la DO_{600} , gotas de 10 μ L de los sobrenadantes bacterianos fueron aplicados en forma de gotas en placas LB, las cuales fueron incubadas durante la toda la noche a 37 °C. Los valores individuales de cada péptido fueron reportados como la menor concentración a la que no se recuperaron colonias individuales a partir del sobrenadante y la moda estadística de al menos tres experimentos independientes fue reportada.

5.5.2 Actividad antibiopelícula de las variantes sintéticas de β -defensinas

La capacidad inhibitoria de las crocBDs contra las biopelículas bacterianas fue evaluada usando un ensayo de tinción con VC [158]. Luego del ensayo antimicrobiano, los sobrenadantes bacterianos fueron desechados y las placas se lavaron tres veces con agua destilada. Después que las placas fueron secadas por inversión en toallas de papel, la

biomasa bacteriana adherida fue teñida con VC 0.1 % (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron enjuagadas nuevamente con agua destilada y secadas por inversión en toallas de papel. Finalmente, el colorante adherido a la placa fue liberado con etanol 70 % y las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La DO_{595} fue entonces registrada en un lector de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, EE.UU.).

Los datos de al menos tres experimentos independientes fueron analizados como por ciento de masa de biopelícula bacteriana en relación con el CC utilizando la **Ecuación 1** descrita en la sección anterior, sustituyendo las lecturas de DO_{600} por las DO_{595} correspondientes.

5.5.3 Actividad antimicrobiana y antibiopelícula de las catelicidinas sintéticas

La actividad antimicrobiana de las crocCATHs fue evaluada según lo descrito en la Sección 5.5.1 pero utilizando el medio MHB para todas las cepas bacterianas. Los antibióticos Polimixina B y Vancomicina fueron incluidos como comparación.

Por otra parte, los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas bacterianas fueron realizados según lo descrito en Haney et al. [158]. En el caso de *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*, los ensayos fueron realizados empleando el medio mínimo BM_2 (fosfato de potasio 62 mM, sulfato de amonio 7 mM, sulfato de magnesio 0.5 mM, pH 7.0), el cual fue suplementado con glucosa 0.4 % (p/v). En cambio, la actividad antibiopelícula contra *A. baumannii* y *S. aureus* SAP0017 fue evaluada en TSB 10 % (v/v) suplementado con glucosa 0.1 % (p/v), mientras que para *P. vulgaris* se utilizó el medio THB 10 % (v/v). Los datos de al menos tres experimentos independientes fueron analizados como por ciento de masa de biopelícula bacteriana en relación con el control de crecimiento, utilizando la **Ecuación 1** descrita anteriormente (Sección 5.5.1) y sustituyendo las lecturas de DO_{600} por las DO_{595} correspondientes.

También fue calculada la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (MBIC, del inglés *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) para cada catelicidina, la cual fue

definida como la concentración de péptido capaz de inhibir la formación de una cantidad específica de biopelícula comparado con el control de crecimiento (considerado como el 100 %) [158]. En este caso, la MBIC₉₅ (concentración que inhibe la formación del 95 % de biopelícula bacteriana) fue estimada a partir de la media del por ciento de inhibición de al menos tres experimentos independientes.

5.6 Actividad citotóxica e inmunomoduladora de β -defensinas y catelicidinas

Los experimentos de citotoxicidad e inmunomodulación se realizaron como se ha descrito previamente [146], con algunas modificaciones e incluyendo al péptido inmunomodulador 1018 como control.

5.6.1 Tratamiento de células HBE y PBMC

Células HBE

Brevemente, las células epiteliales fueron sembradas en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, EE.UU.) a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, en 200 μ L de MEM suplementado con FBS 10 % y L-Gln 2 mM. A la mañana siguiente, este medio fue cambiado por nuevo MEM suplementado con FBS 1 % y L-Gln, y las placas fueron incubadas durante 1 hora. Posteriormente, las placas se trataron con agua destilada, estéril y libre de endotoxinas como control negativo, o con diferentes concentraciones de péptidos en medio de cultivo con o sin ácido poli-inosínico-poli-cidílico 100 ng/mL (poli(I:C), InvivoGen, EE.UU.). Por tanto, el tratamiento y la estimulación de las células HBE se realizaron simultáneamente, por un período de 24 horas. A continuación, las placas se centrifugaron a $\sim 400 \times g$ en una centrífuga Allegra 6 (Beckman-Coulter, Canadá), y los sobrenadantes celulares se colectaron inmediatamente para los ensayos de citotoxicidad. El resto de los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su uso en los ensayos tipo ELISA.

PBMCs humanas

Cincuenta microlitros de las PBMCs resuspendidas fueron añadidos a placas Costar de 96 pocillos de fondo plano para cultivo de tejidos (Corning Inc., EE.UU.), a una densidad final de 1×10^6 células/pocillo. Las células se dejaron reposar durante 1 hora y luego se trataron con varias concentraciones de las catelicidinas o con agua destilada, estéril y libre de endotoxinas como control negativo. El volumen final en cada pocillo fue de 100 μ L. Las células fueron después incubadas por 24 horas a 37 °C y una atmósfera de CO₂ 5 %. A continuación, las placas se centrifugaron a $\sim 400 \times g$ en una centrífuga Allegra 6 (Beckman-Coulter, Canadá) y los sobrenadantes celulares se colectaron inmediatamente para los ensayos de citotoxicidad.

5.6.2 Ensayos de liberación de LDH

La citotoxicidad inducida por los péptidos fue evaluada midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada del citosol de las células dañadas utilizando el kit de detección de citotoxicidad (MilliporeSigma, Canadá) y según las recomendaciones del fabricante. Los sobrenadantes celulares recién colectados de las HBE y PBMCs no estimuladas fueron combinados en proporción 1:1 (v/v) con la mezcla de reacción incluida en el kit. La reacción se desarrolló durante 20-30 minutos en la oscuridad y la DO₄₉₀ fue registrada en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, EE.UU.). Los sobrenadantes de las células tratadas con agua sirvieron como control negativo (0 % de toxicidad), mientras que las tratadas con el detergente Tritón X-100 (2 % (v/v) sirvieron como control positivo (100 % de toxicidad). Los resultados de al menos tres réplicas biológicas fueron analizados como porcentaje de citotoxicidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{citotoxicidad} = \left(\frac{PT_{DO490} - CN_{DO490}}{CP_{DO490} - CN_{DO490}} \right) \times 100$$

Ecuación 2: Análisis de los datos de actividad citotóxica como por ciento de citotoxicidad celular (DO₄₉₀ nm). PT representa la media de la absorbancia de los pocillos tratados con péptidos, mientras que CN y CP representan la media de la absorbancia de los pocillos del control negati-

vo (agua destilada, estéril, libre de endotoxinas) y del control positivo (Tritón X-100), respectivamente.

5.6.3 Cuantificación de la producción de citocinas

Los ensayos tipo ELISA para la cuantificación de los niveles de interleucinas en el sobrenadante de las HBE fueron realizados siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Estos ensayos se utilizaron para cuantificar los niveles de IL-6 e IL-8 de las células HBE no estimuladas y estimuladas con poli(I:C). Los ELISAs se realizaron al menos en triplicado a partir de diferentes réplicas biológicas.

5.7 Modelo de piel humana

Los modelos de piel epidérmica N/TERT fueron establecidos según lo descrito por Wu et al. [159]. Brevemente, los modelos fueron cultivados en placas de 12 pozos con insertos de cultivo celular ThinCert™ (Greiner Bio-One, Thermo Fisher Scientific, USA). Células de queratinocitos N/TERT fueron sembradas a una densidad de 3×10^5 células/inserto en medio completo DermaLife K Keratinocyte suplementado con LifeFactors (Lifeline Cell Technology, Canada). Después de que las células alcanzaron una monocapa confluyente (3-4 días), los medios de cultivo por encima y por debajo del inserto fueron cambiados a DMEM/Ham's F-12/CnT-Prime 3D Barrier Media (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Suiza), suplementado con hidrocortisona (0.1 µg/mL), isoproterenol (0.125 µg/mL), insulina bovina (0.25 µg/mL), ácido selenioso (26.5 pM), L-serina (5 mM), L-carnitina (5 µM), albúmina de suero bovino (1.6 mg/mL), ácido palmítico (25 µM), ácido linoleico (15 µM) y ácido araquidónico (7 µM). Tras una noche de cultivo, la cara apical de la piel fue expuesta al aire para permitir la estratificación de la epidermis y la concentración de ácido linoleico fue incrementada hasta 30 µM. Los modelos de piel se cultivaron en la interfaz aire-líquido durante 10 días a 37 °C con CO₂ 7.3 % antes de ser utilizados en los experimentos.

Para investigar la capacidad antibiopelícula de las crocCATHs, 5 µL de un cultivo en fase exponencial de *S. aureus* SAP0017 ($\sim 1 \times 10^6$ UFC) fueron aplicados en el centro de

la piel N/TER. Luego de 24 horas de incubación, la biopelícula cutánea fue tratada con 30 μ L de cada péptido (200 μ g, \sim 0.7 % p/v), o agua destilada, estéril, libre de endotoxinas como control. El tratamiento tuvo una duración de 24 horas (**Figura 6**). Finalmente, las muestras de piel fueron extirpadas de los insertos de cultivo, sonicadas durante 5 minutos en PBS estéril y agitadas en vórtex por 30 segundos. Los conteos bacterianos en los fragmentos de piel fueron determinados por dilución seriada. El límite de detección del ensayo fue de 10 UFC/piel.

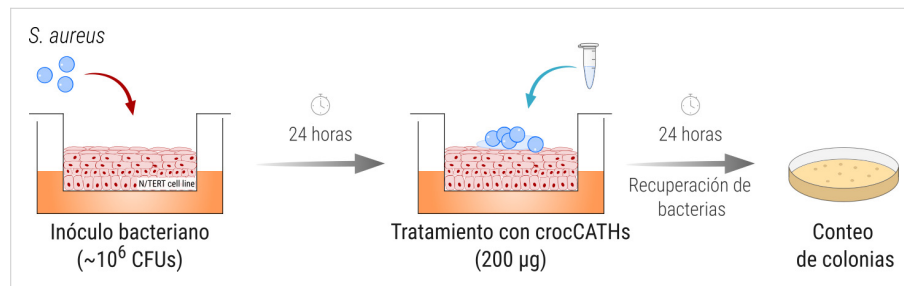


Figura 6: Esquema de la formación y tratamiento de biopelículas de *S. aureus* con péptidos catelicidina en un modelo de piel humana.

5.8 Modelo murino de infección de abscesos subcutáneos

5.8.1 Aprobación del estudio y animales

Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con las directrices del CCAC (del inglés *Canadian Council on Animal Care*) tras la aprobación del Comité para el Cuidado de los Animales de la *University of British Columbia* (A14-0253).

Los animales utilizados en este estudio fueron ratones CD-1 hembras adquiridos de Charles River Laboratories, Inc. (EE.UU.), los cuales se encontraban entre 5 y 7 semanas de nacido y presentaban un peso de 25 ± 5 g al inicio y al final del experimento. Los ratones fueron agrupados en cohortes de 4-5 compañeros de camada, los cuales se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales.

5.8.2 Formación de los abscesos bacterianos y tratamiento con péptidos

La actividad *in vivo* de As-CATH8 fue examinada en un modelo subcutáneo de infección de abscesos [160], utilizando a la catelicidina humana LL-37 como comparación. Brevemente, las cepas bacterianas *S. aureus* USA300 LAC y *A. baumannii* Ab5075 fueron sub-cultivadas en LB hasta alcanzar una $DO_{600} = 2.0$. Las células se lavaron dos veces y fueron resuspendidas en PBS estéril hasta alcanzar la DO inicial.

Cincuenta microlitros del cultivo bacteriano fueron inyectados por vía subcutánea en el dorso izquierdo de los ratones, a una densidad de inóculo de $\sim 5-15 \times 10^7$ UFC. Una hora después, la zona del absceso fue tratada con agua destilada, estéril, libre de endotoxinas o 15 mg/kg de As-CATH8 y LL-37. Los abscesos se formaron entonces durante 72 horas. Durante este tiempo los animales fueron observados y su clasificación clínica diaria fue registrada.

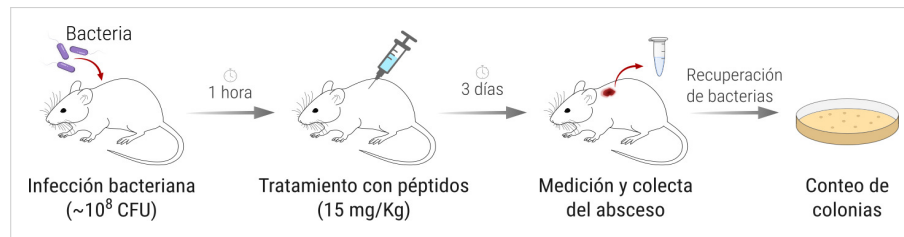


Figura 7: Esquema de la formación y tratamiento de abscesos bacterianos de *S. aureus* y *A. baumannii* con péptidos catelicidinas en un modelo murino.

En el punto final del experimento, los ratones fueron sacrificados mediante exposición a CO_2 , seguido de dislocación cervical. El área de dermonecrosis fue entonces medida utilizando un calibre y los abscesos fueron extraídos y colocados en 1 mL de PBS estéril. Los tejidos fueron homogeneizados en LB utilizando un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, EE.UU) y el conteo bacteriano determinado por dilución seriada (**Figura 7**). El límite de detección del ensayo fue de 100 UFC/absceso.

Los resultados fueron colectados a partir de al menos tres experimentos independientes con 2-4 réplicas biológicas en cada experimento para cada especie bacteriana.

5.9 Análisis estadístico

El procesamiento estadístico se realizó utilizando los paquetes DescTools versión 0.99.41 y rstatix versión 0.7.0 [161] en RStudio [129].

La normalidad de los datos fue evaluada por métodos visuales (gráficos Q-Q y de densidad) y utilizando la prueba estadística de Shapiro-Wilk. A su vez, la homogeneidad de varianza fue comprobada mediante el gráfico de residuales y usando las pruebas de Levene y Bartlett.

Para la comparación entre varios grupos se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En caso de resultar significativo, el ANOVA fue seguido de la prueba de Tukey como *post hoc*. Como método no paramétrico se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn como *post hoc*.

En el caso del análisis de los ensayos de supresión de citocinas en células HBE estimuladas con poli(I:C), donde las comparaciones se realizaron respecto al grupo control no tratado, el ANOVA significativo fue seguido de la prueba de Dunnett como *post hoc*.

En todos los casos, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6 Resultados

6.1 Identificación y caracterización funcional de β -defensinas en cocodrilianos

6.1.1 La organización genómica de los genes de β -defensinas se conserva entre las distintas especies de cocodrilianos

En este trabajo, el repertorio de genes de β -defensinas fue estudiado a partir de la información genómica disponible de cuatro especies de cocodrilianos. En general, los genes de β -defensinas de cocodrilianos parecen agruparse en una sola región del genoma, y el orden y orientación de dichos genes se conserva entre estas especies (**Figura 8**). No obstante, no fue posible reconstruir completamente esta región con todos los genes identificados, probablemente debido a la baja calidad de las actuales versiones de los genomas. Esto fue más evidente en *G. gangeticus* donde se observó la presencia de un mayor número de fragmentos genómicos (*contigs*).

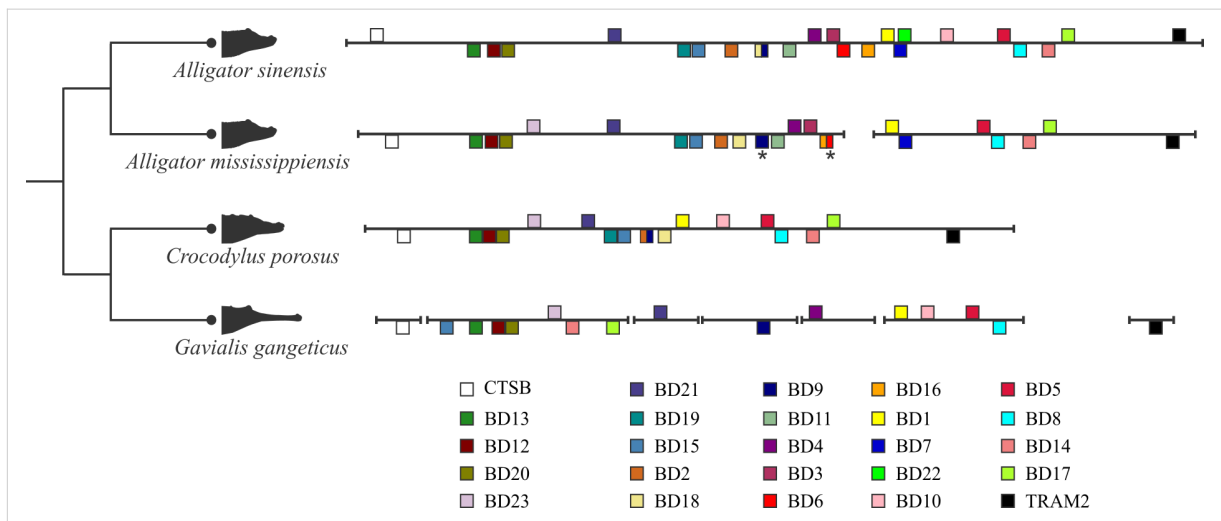


Figura 8: Estructura genómica de las β -defensinas en cocodrilianos. Los genes de crocBD se encuentran en la misma región del genoma, y el orden y la orientación de los genes ortólogos se conserva entre las distintas especies. La organización genómica se dedujo a partir de los ensamblajes genómicos ASM45574v1, ASM28112v3, CroPor_comp1 y GavGan_comp1 de *A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*, respectivamente. Los genes BD18 y BD9 (de *A. si-*

nensis), así como BD2 y BD9 (de *C. porosus*) aparecen solapados en los genomas de estas especies. Adicionalmente, los genes que codifican las BD2, BD3, BD18 y BD19 de *G. gangeticus* no están intactos en el ensamble antes mencionado y por tanto no fueron incluidos en la figura; sin embargo, estos pueden recuperarse completamente a partir de otras versiones de los genomas de ambas especies. El tamaño de los cuadrados (genes) o la distancia entre ellos son representativos y no son proporcionales a su tamaño real en el genoma. Los asteriscos (*) denotan pseudogenes. Figura tomada de Santana et al. [162].

El agrupamiento de genes de β -defensinas en cocodrilianos está flanqueado a ambos lados por los genes que codifican para las proteínas CTSB y TRAM2 (**Figura 8**), lo cual concuerda con lo descrito para otros grupos de vertebrados [49,50].

6.1.2 Las secuencias de β -defensinas identificadas en cocodrilianos mostraron las características típicas de esta familia de HDPs

Para la identificación de nuevas secuencias de β -defensinas se siguió una metodología basada en la utilización de modelos ocultos de Markov, la cual ha sido empleada con éxito para el estudio de esta familia de HDPs en otras especies. Como resultado, 18 nuevas secuencias de β -defensinas fueron identificadas en *C. porosus* y *G. gangeticus*, 21 en *A. mississippiensis* y 3 en *A. sinensis*. En este último, 19 secuencias ya habían sido descritas previamente [13], por lo que el número total de secuencias es similar para las cuatro especies.

Todas las crocBDs identificadas mostraron el motivo de 6 cisteínas característico de esta familia, así como las tres regiones descritas previamente en los precursores de β -defensinas de otras especies de vertebrados [35,52]: el péptido señal, la pro-pieza y el péptido maduro (**Figura 9**).

El patrón consenso del motivo de cisteínas de las crocBDs fue " X_n -Cys₁-X(6)-Cys₂-X(3-16)-Cys₃-X(9-10)-Cys₄-X(1-6)-Cys₅Cys₆-X_n", el cual difiere de los descritos para el lagarto *A. carolinensis* (" X_n -Cys₁-X(5-7)-Cys₂-X(3-7)-Cys₃-X(7-10)-Cys₄-X(4-6)-Cys₅Cys₆-X_n") [18] y el ave *Gallus gallus* (" X_n -Cys₁-X(4-8)-Cys₂-X(3-5)-Cys₃-X(9-13)-Cys₄-X(4-7)-Cys₅Cys₆-X_n") [48].

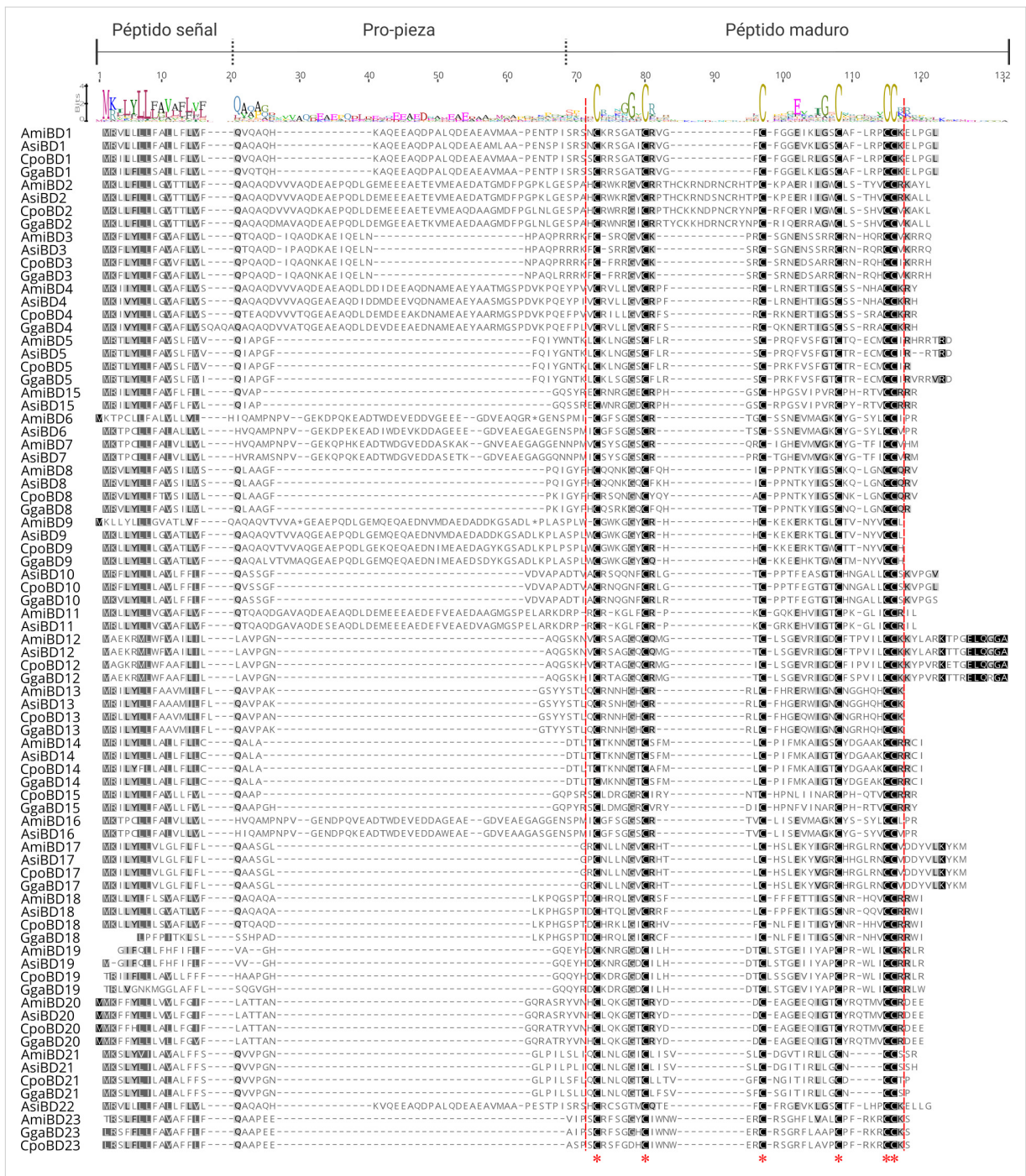


Figura 9: Alineamiento múltiple de las secuencias de β -defensinas de cocodrilianos. Las secuencias de crocBDs identificadas y las previamente descritas en *A. sinensis* fueron alineadas median-

te el algoritmo MAFFT y visualizadas en el programa Geneious Prime¹⁷. Los residuos de aminoácidos aparecen coloreadas en escala de grises, de acuerdo su por ciento de identidad en cada posición del alineamiento. Las cisteínas altamente conservadas aparecen marcadas con un asterisco y la región del núcleo en las β -defensinas (más un residuo adicional a cada lado) aparece delimitada por líneas discontinuas en color rojo. El logotipo en la parte superior del alineamiento también fue generado en el Geneious Prime. Abreviaturas: Ami: *A. mississippiensis*; Asi: *A. sinensis*; Cpo: *C. porosus*; Gga: *G. gangeticus*. Figura modificada de Santana et al. [162].

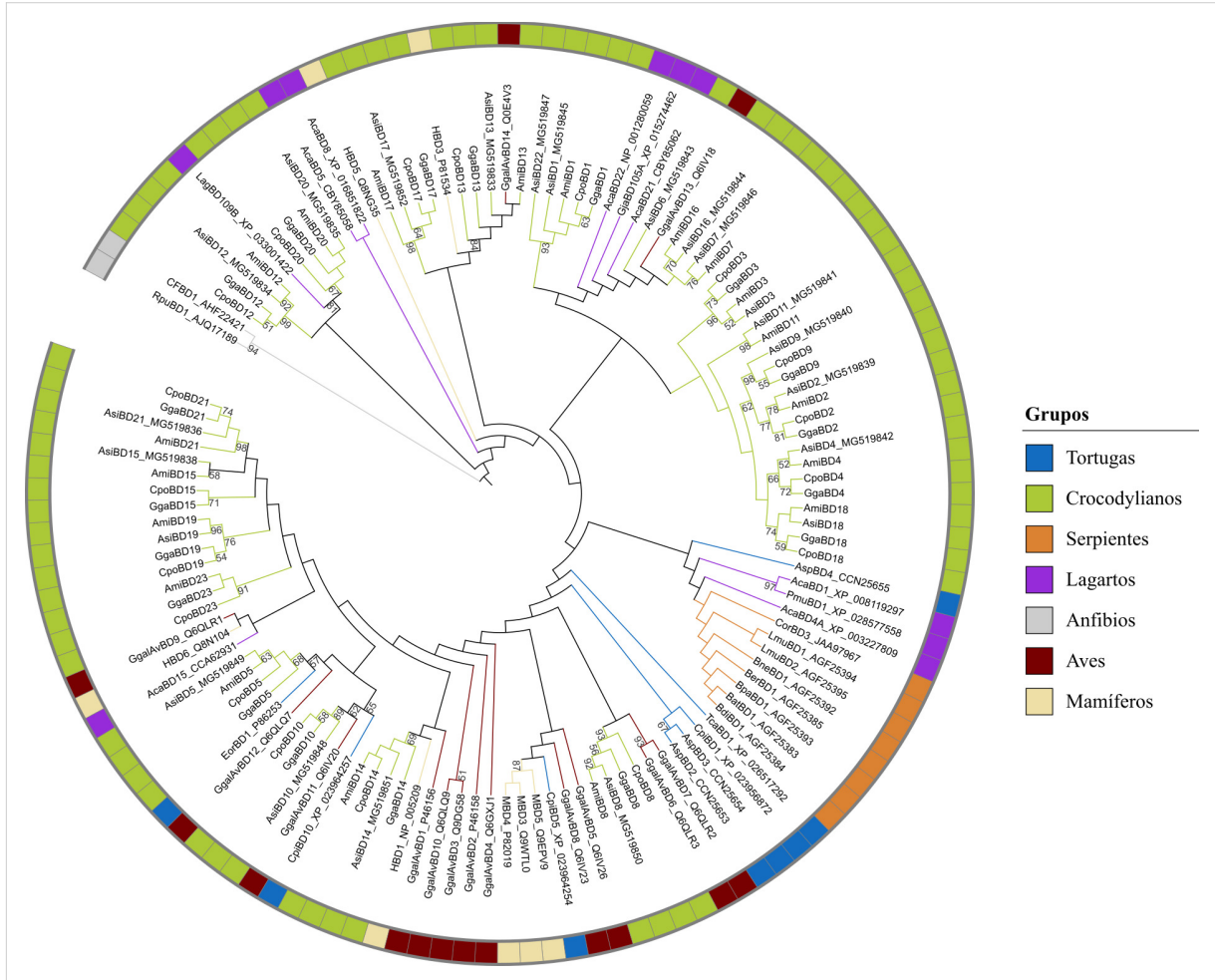


Figura 10: Análisis filogenético de las β -defensinas de reptiles. Este análisis mostró que las crocBDs se agrupan en diferentes clados con ortólogos de otros reptiles y aves. El árbol fue generado utilizando el criterio de máxima verosimilitud implementado en el programa PhyML. A modo de comparación, se incluyeron otras secuencias de β -defensinas de los principales linajes de rep-

17 <https://www.geneious.com>

tiles, así como otras de aves y mamíferos. Las defensinas de anfibios CFBD1 y RpuBD1 se utilizaron como grupo externo para enraizar el árbol. El análisis se realizó utilizando las secuencias completas de aminoácidos, incluyendo el péptido señal, la pro-pieza y el péptido maduro. Los números de las ramas indican el soporte estadístico en forma de por ciento tras 1,000 réplicas de *bootstrap* (sólo se muestran los valores iguales o superiores al 50 %). Las secuencias extraídas de GenBank se indican con sus números de acceso. Figura modificada de Santana et al. [162].

El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de las crocBDs, así como de otras defensinas de tetrápodos, mostró la presencia de varios genes ortólogos entre los diferentes clados (**Figura 10**). En este sentido, se encontraron fuertes relaciones de ortología entre las las cuatro especies de cocodrilianos analizadas. Como se esperaba, las secuencias de ambos aligátos presentaron una mayor cercanía filogenética comparadas con las defensinas de *C. porosus* y *G. gangeticus*.

Nuestros resultados soportan la presencia de relaciones de ortología entre defensinas de cocodrilianos con defensinas de aves, evidenciando su cercanía filogenética. Curiosamente, se observaron relaciones ortólogas entre los cocodrilianos con todos los lineajes de reptiles, excepto con serpientes. Varios genes paralógicos también fueron encontrados en la mayoría de los clados, proporcionando evidencia de la alta variabilidad de los genes de β -defensinas en reptiles.

6.1.3 Variantes recortadas de β -defensinas de cocodrilianos forman dos grupos de acuerdo a su carga e índice de hidrofobicidad

Para evaluar la actividad biológica de los péptidos crocBD, nuestro análisis se centró en el motivo estructural característico que contiene el marco de cisteínas y que está presente en todas las *trans*-defensinas [31,32]. Adicionalmente a dicho motivo, nuestro análisis también incluyó un residuo adicional en los N- y C-terminales de cada secuencia de β -defensina (**Figura 9**).

La mayoría de las secuencias recortadas de crocBDs tuvieron similares longitudes totales (30-34 residuos), pero otras propiedades físico-químicas como la carga y el índice de hidrofobicidad fueron más variables, oscilando entre -1.21 y 7.79, y entre -1.35 y 1.23,

según la escala de Bjellqvist y la escala de Kyte-Doolittle, respectivamente (**Tabla S2**). A menudo se supone que estas dos propiedades juegan un papel fundamental en la actividad biológica de los HDPs [22]. Por tanto, la relación entre la carga y la hidrofobicidad fue utilizada como criterio general para guiar la selección de crocBDs para su posterior síntesis química. A manera de referencia, fueron incluidas en el análisis varias secuencias de β -defensinas de otros vertebrados cuya actividad antimicrobiana ha sido previamente descrita.

Un análisis de agrupamiento basado en los valores de hidrofobicidad y carga neta sugirió que las crocBDs podían organizarse en dos grupos principales (**Figura 11**). Curiosamente, la mayoría de las secuencias de referencia fueron incluidas en el grupo con mayor carga neta y menor hidrofobicidad. Por lo tanto, cinco secuencias de crocBDs que se encontraban en dicho agrupamiento fueron seleccionadas para su síntesis química (**Tabla 1**), bajo el supuesto de que estas secuencias debían presentar propiedades físico-químicas similares a las β -defensinas de referencia, con probado efecto antimicrobiano.

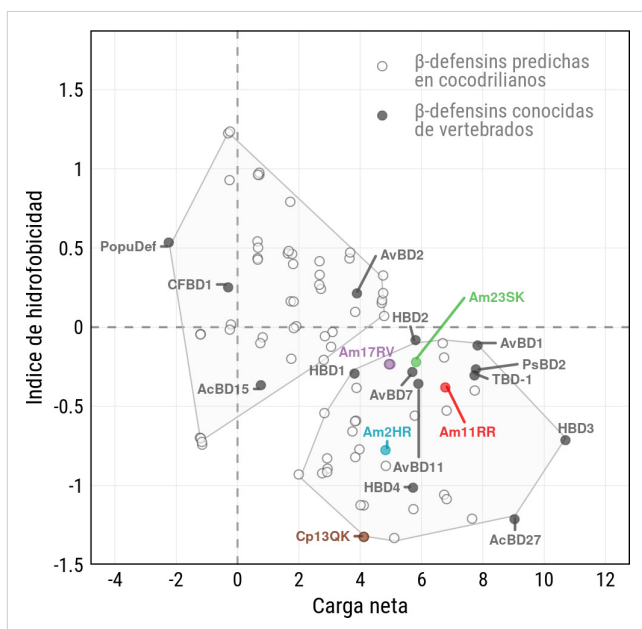


Figura 11: Relación entre la carga neta y el índice de hidrofobicidad de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y de otros vertebrados. Cada círculo corresponde a una secuencia individual de crocBDs (círculos blancos) o a una secuencia conocida de β -defensina de vertebrados (círculos negros). Las secuencias de crocBDs seleccionadas para su síntesis y caracterización se indican con nombres y círculos coloreados. Los valores de índice de hidrofobicidad y carga neta se calcularon en R utilizando la escala de Bjellqvist y de Kyte-Doolittle, respectivamente. El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el algoritmo PAM con $k = 2$. Se incluyeron también en el análisis

otras secuencias de vertebrados con actividades antimicrobianas conocidas: Anfibios: CFBD-1 de *C. fudingensis* [163] y PopuDef de *R. puerensis* [62]; Reptiles: TBD-1 de *E. orbicularis* (UniProtKB:

P86253), Ps-BD2 de *Pelodiscus sinensis* [51], AcBD15 (UniProtKB: G7ZTY2) y AcBD27 (UniProtKB: G7ZLA1) de *A. carolinensis*; Aves: AvBD1 (UniProtKB: P46157), AvBD2 (UniProtKB: P46158), AvBD7 [164] y AvBD11 [60] de *G. gallus*; Mamíferos: HBD1 (UniProtKB: P60022), HBD2 (UniProtKB: O15263), HBD3 (UniProtKB: P81534) y HBD4 (UniProtKB: Q8WTQ1) de *Homo sapiens*. Las secuencias de aminoácidos y así como las propiedades físico-químicas de las β -defensinas utilizadas se encuentran resumidas la Tabla S2 en Anexos. Figura modificada de Santana et al. [165].

Centramos nuestra atención en secuencias de *A. mississippiensis* debido a que esta especie está estrechamente relacionada con *A. sinensis*, y varias relaciones de ortología pueden observarse entre ambas especies (**Figura 10**). Adicionalmente, dado que el perfil de expresión de varios β -defensinas secuencias de la *A. sinensis* ha sido previamente investigado [13], esta información pudiera ser utilizada para inferir el posible patrón de expresión de las secuencias ortólogas identificadas en la otra especie de aligátor. Una secuencia adicional denotada como Cp13QK fue también seleccionada ya que la región madura de su secuencia parental en *C. porosus* (CpoBD13) mostró una identidad de secuencia del 100 % a nivel de aminoácidos con la secuencia ortóloga en *G. gangeticus* (GgaBD13), lo que sugiere que este motivo de secuencia pudiera tener implicaciones funcionales.

Por otra parte, modelos tridimensionales de las cinco variantes β -defensinas de cocodrilianos y la HBD3 fueron generados y los valores totales del índice de hidrofobicidad y la carga neta fueron estimados. También, estos modelos fueron coloreados en función de los valores de hidrofobicidad superficial y potencial electrostático en ambas caras de cada molécula (**Figura 12**). Este análisis reveló que todas las variantes mostraban una carga positiva global en ambas caras, con valores que oscilaban entre +2 y +6 (**Figura 12B**). Diferentes patrones de distribución de los residuos cargados positivamente fueron observados, aunque sus respectivos valores de carga neta fueron similares entre las diferentes caras de una misma molécula, diferenciándose sólo en +1 en la mayoría de los casos.

Tabla 1: Propiedades físico-químicas y alineamiento múltiple de secuencias de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y HBD3. Las cisteínas presentes en cada secuencia aparecen en negrita y numeradas. La secuencia de aminoácidos y los números de acceso al GenBank de las secuencias parentales (de longitud completa) de las crocBDs se detallan en la Tabla S1 en Anexos. La secuencia de HBD3 se obtuvo de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (id: P81534). Am: *A. mississippiensis*, Cp: *C. porosus*.

Variante	Alineamiento múltiple	Long.	M.M.	Carga	I. Hid.
Am2HR	-----HC ₁ KRNDRC ₂ --RHTPC ₃ KPAERIIGWC ₄ LSTYV-C ₅ C ₆ R---	32	3820.48	4.9	-0.78
Am11RR	-----RC ₁ R-KGLFC ₂ ---RPKC ₃ GQKEHVIIGTC ₄ PKGLI-C ₅ C ₆ R---	30	3391.17	6.8	-0.36
Am17RV	-----RC ₁ NLLNGVC ₂ --RHTLC ₃ HSLEKYIGRC ₄ HRGLRNC ₅ C ₆ V---	33	3828.55	5.0	-0.22
Am23SK	-----SC ₁ RFSGGYC ₂ IWNWERC ₃ RSQHFLVALC ₄ PFRKR-C ₅ C ₆ K---	34	4070.82	5.8	-0.21
Cp13QK	-----QC ₁ RNNHGHCC ₂ ---RRLC ₃ FHGEQWIGNC ₄ NGRHQHC ₅ C ₆ K---	32	3833.32	4.1	-1.32
HBD3	GIINTLQKYYC ₁ RVRGGRC ₂ --AVLSC ₃ LPKEEQIGKC ₄ STRGRKC ₅ C ₆ RRKK	45	5161.2	10.7	-0.4

Long.: longitud (número de aminoácidos); M.M.: masa molecular teórica reducida en Daltons; Carga: carga neta de acuerdo a la escala de Kyte-Doolittle; I. Hid.: índice de hidrofobicidad de acuerdo a la escala de Bjellqvist. Tabla modificada de Santana et al. [165].

Curiosamente, el análisis de la hidrofobicidad indicó que la mayoría de las moléculas, al ser modeladas, mostraban un cierto grado de anfipaticidad (**Figura 12C**) ya que varias de ellas tenían un lado que mostraba valores hidrofóbicos más bajos (I. Hid. más negativo) y el otro con valores más altos (I. Hid. más positivo). Esta diferencia fue menos pronunciada en Am17RV y Cp13QK, mientras que Am2HR mostró la mayor anfipaticidad entre todas las variantes.

6.1.4 La variante sintética Am23SK mostró una sola isoforma mayoritaria al ser plegada *in vitro*.

Las cinco variantes de crocBDs seleccionadas fueron comercialmente sintetizadas, purificadas a partir de los extractos crudos (**Figura 13**) y plegadas *in vitro* utilizando el par redox cisteína/cistina. Este protocolo de plegamiento ha sido utilizado con éxito ante-

riormente para plegar varias defensinas de mamíferos, resultando frecuentemente en una única isoforma principal en el cromatograma de RP-HPLC [148,166].

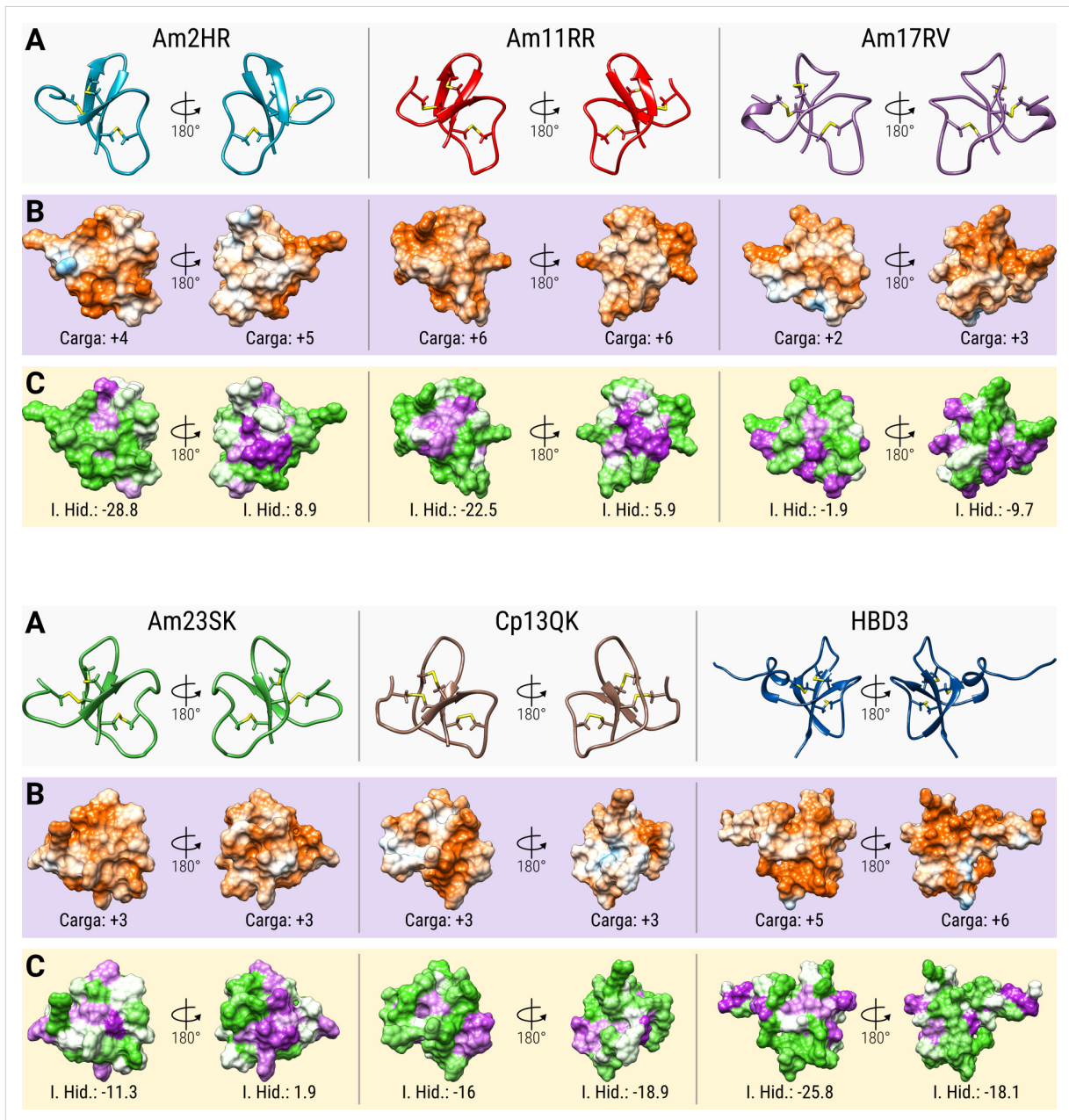


Figura 12: Modelos estructurales y análisis de la superficie accesible al solvente de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y la HBD3. Dichos modelos fueron generados utilizando el servidor I-Tasser y minimizados con GROMACS. Estos fueron luego alineados utilizando a la HBD3

(PDB: 1Kj6) como referencia en el programa Chimera (los enlaces disulfuro se muestran en amarillo) **(A)**. Regiones con potencial electrostático positivo (naranja) y negativo (azul claro), de acuerdo a la ley de Coulomb, fueron también calculadas en Chimera **(B)**. Las representaciones de la superficie hidrofóbica **(C)** fueron estimadas utilizando la escala de Kyte-Doolittle y se muestran regiones con altos (púrpura) y bajos valores altos de hidrofobicidad (verde). Los valores del índice de hidrofobicidad total (índice H) y la carga neta se estimaron para ambas caras de cada estructura. Figura modificada de Santana et al. [165].

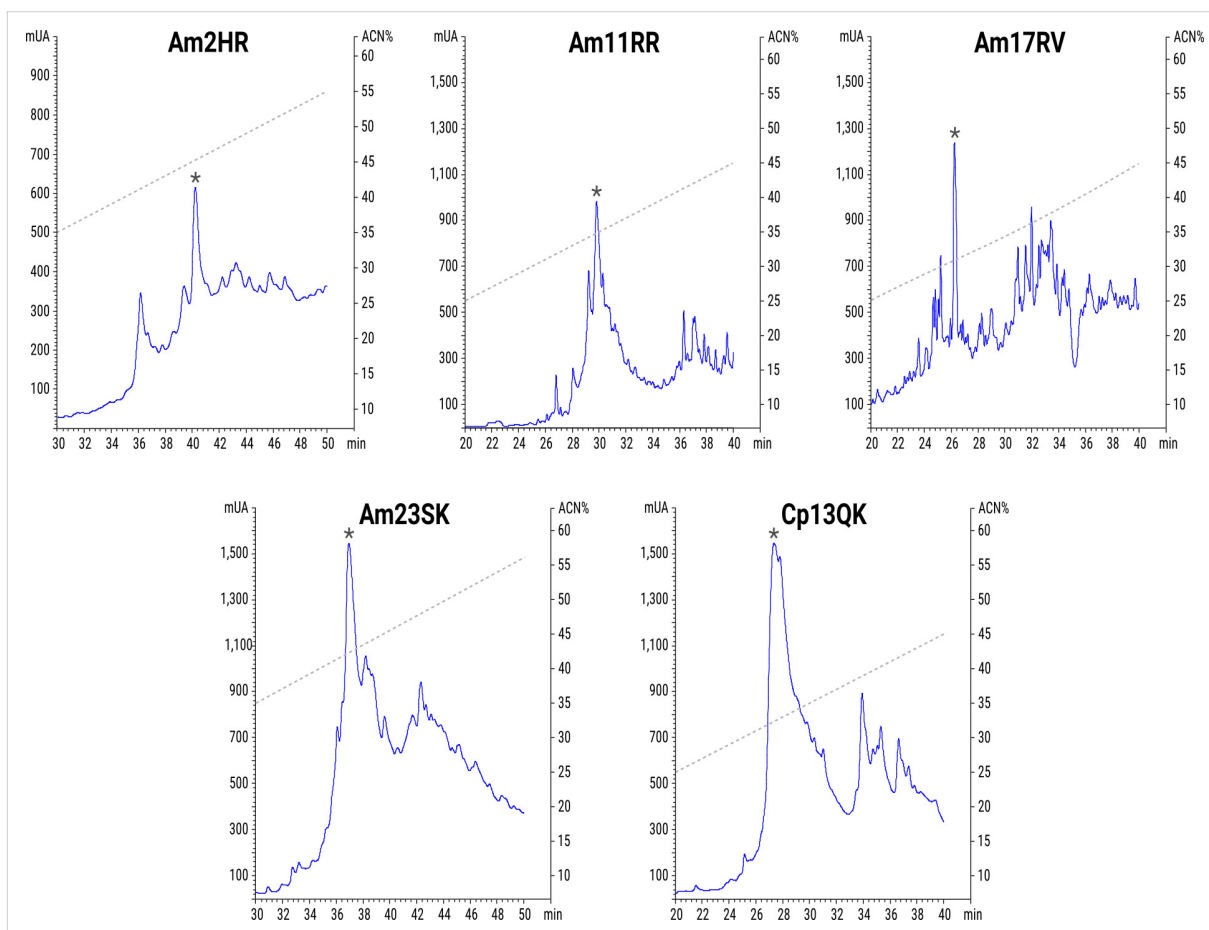


Figura 13: Cromatogramas de la purificación por RP-HPLC de las variantes reducidas de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos. Los picos principales fueron colectados y las masas peptídicas determinadas mediante ESI-MS. Aquellos que presentaron los valores de masa reducida esperada se indican con un asterisco (*). El extracto crudo de Cp13QK contenía un compuesto contaminante que co-eluyó en el pico principal y que no pudo ser separado en esta ni en nin-

guna otra condición evaluada. El gradiente de acetonitrilo empleado se indica con líneas diagonales discontinuas. Figura modificada de Santana et al. [165].

Desafortunadamente, el plegamiento de las variantes de crocBDs en estas condiciones dio lugar a varias isoformas en la mayoría de los casos (**Figura 14**), y sólo Am23SK mostró una isoforma predominante en el cromatograma de RP-HPLC. Dado que todas las isoformas de cada variante sintética presentaron aproximadamente la misma masa molecular oxidada (**Tabla S3** de Anexos), la presencia de múltiples picos probablemente se debe a diferencias en las conectividades de los puentes disulfuro. Esto sugiere que es necesario optimizar las condiciones de plegamiento para aislar una única isoforma estructural para las demás variantes de crocBDs.

Un ensayo de proteólisis con tripsina y el posterior análisis de los fragmentos trípticos de Am23SK mediante espectrometría de masas permitió confirmar la presencia del puente disulfuro Cys2-Cys4 (masa molecular observada de 2,862.3 Da), esperada para un péptido correctamente plegado (resultados no mostrados). Lamentablemente, no fue posible encontrar los restantes puentes disulfuro (Cys1-Cys5 y Cys3-Cys6), probablemente debido al pequeño tamaño de los fragmentos trípticos específicos. No obstante, nuestros resultados concuerdan con lo que se espera para esta familia de HDPs y con la estructura energéticamente más estable de Am23SK (-1,659.6 KJ/mol), como sugirió un estudio de dinámica molecular (resultados no mostrados).

Adicionalmente, es importante resaltar que varios estudios previos han demostraron que algunas β -defensinas con puentes disulfuro no nativos mostraron una actividad antimicrobiana similar o mejor que sus contrapartes con conformación nativa [167–169], sugiriendo que las conectividades de los puentes disulfuro pueden no ser esenciales para dicha actividad. Debido a las propiedades biológicas similares de las distintas isoformas de β -defensinas, todas las isoformas de crocBDs obtenidas fueron seleccionadas para su caracterización funcional, como se describe a continuación.

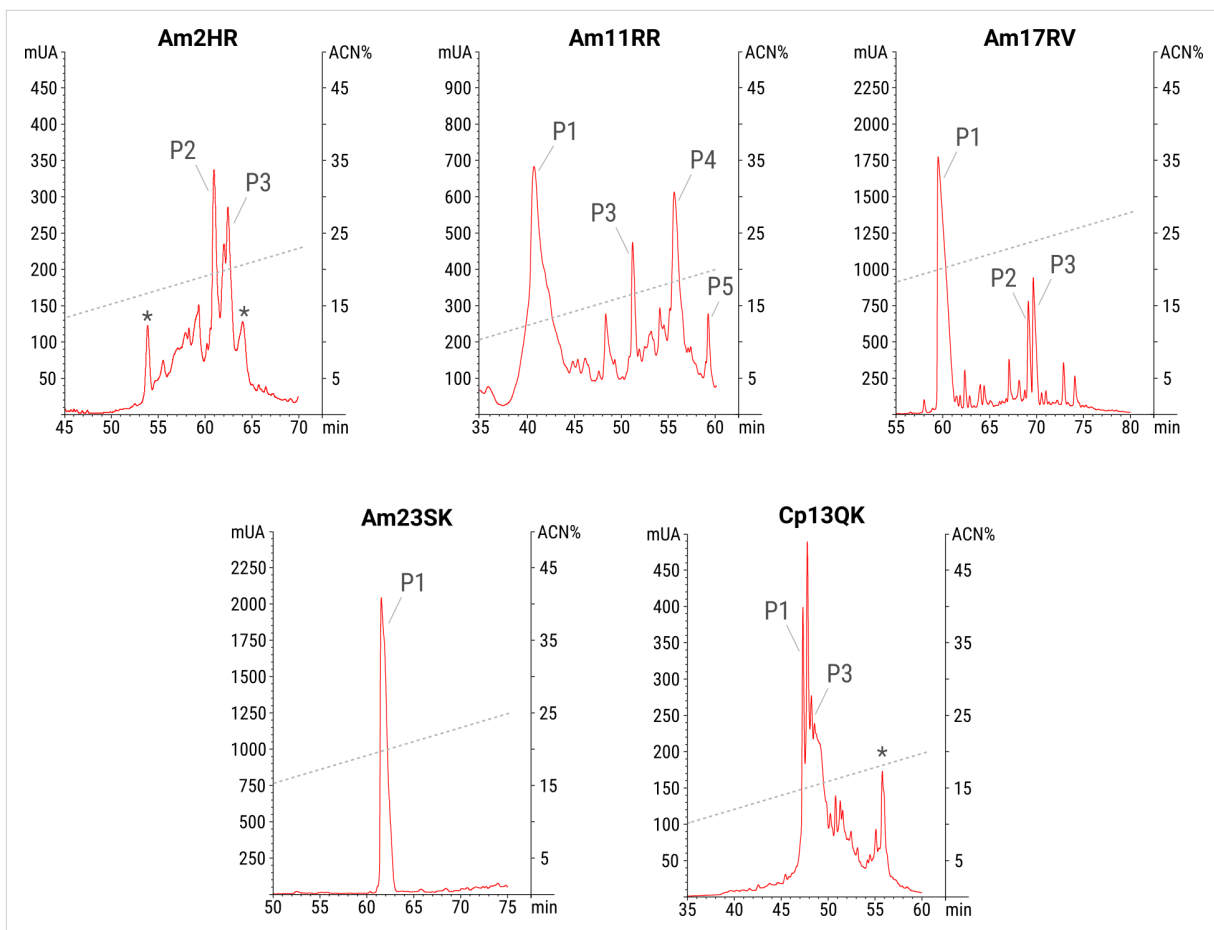


Figura 14: Cromatogramas analíticos de la purificación por RP-HPLC de las variantes oxidadas de β -defensinas de cocodrilianos. Los picos principales fueron colectados y las masas peptídicas determinadas mediante ESI-MS. Aquellos con la masa oxidada esperada se encuentran señalados. Los asteriscos (*) indican fracciones con la masa esperada pero con bajo rendimiento y, por lo tanto, no fueron caracterizadas funcionalmente. El segundo pico (no etiquetado) en el cromatograma de Cp13QK no mostró la masa esperada, ya que probablemente se trata de un compuesto contaminante procedente de la síntesis química que no pudo separarse en la etapa inicial de purificación. Figura modificada de Santana et al. [165].

6.1.5 Am23SK presentó una actividad antimicrobiana y antibiopelícula superior a la defensina humana HBD3

Varios estudios han demostrado que la actividad antimicrobiana *in vitro* de las β -defensinas se ve frecuentemente disminuida en medios de cultivo complejos [148,170]. Por

tanto, condiciones menos estrictas son usualmente empleadas para su caracterización funcional [66,171]. En este trabajo, la actividad antimicrobiana de las isoformas de crocBDs fue evaluada utilizando el medio TSB 5 %, el cual se ha empleado con anterioridad para caracterizar la actividad de varios péptidos de β -defensina sintéticos y naturales contra patógenos bacterianos [148,170,172].

La actividad antimicrobiana de las variantes de crocBDs fue ensayada contra bacterias patógenas, Gram-positivas y Gram-negativas, que pueden afectar a los seres humanos y a los cocodrilianos [173–176]. En este sentido, la variante Am23SK mostró una amplia actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *A. baumannii* y *E. cloacae*, con valores de MIC entre 2-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Tabla 2**). Además, tras 24 horas de tratamiento, Am23SK fue capaz de inhibir más del 90 % del crecimiento bacteriano planctónico (OD_{600}) a concentraciones superiores a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*, *A. baumannii* y *E. cloacae*, y a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. Typhimurium* (**Figura S1**). De hecho, este péptido mostró una actividad antimicrobiana sustancialmente mayor que la HBD3, la cual fue menos activa contra todas las bacterias utilizadas. Además, los valores de MIC de Am23SK fueron mejores que los de la Tobramicina contra *S. aureus* y Polimixina B contra *A. baumannii* (**Tabla 2**) en nuestras condiciones experimentales.

Tabla 2: Actividad antimicrobiana de Am23SK y HBD3. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra patógenos bacterianos en medio TSB 5 %. Los antibióticos Polimixina B y Tobramicina se utilizaron como control. Los valores de MIC indicados ($\mu\text{g}/\text{mL}$) son la moda estadística de al menos tres experimentos independientes.

Tratamiento	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. baumannii</i>
Am23SK	16	16	8	2
HBD3	64	64	64	16
Polimixina B	n.d.	2	1	1
Tobramicina	64	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no determinado. Tabla modificada de Santana et al. [165].

Adicionalmente, Am23SK mostró un efecto bactericida contra todas las bacterias probadas, similar a la Tobramicina contra *S. aureus*, y a la Polimixina B contra *A. baumannii* (**Figura S1**). Por el contrario, la HBD3 mostró un modesto efecto de eliminación, el cual fue más evidente a la mayor concentración de péptido evaluada.

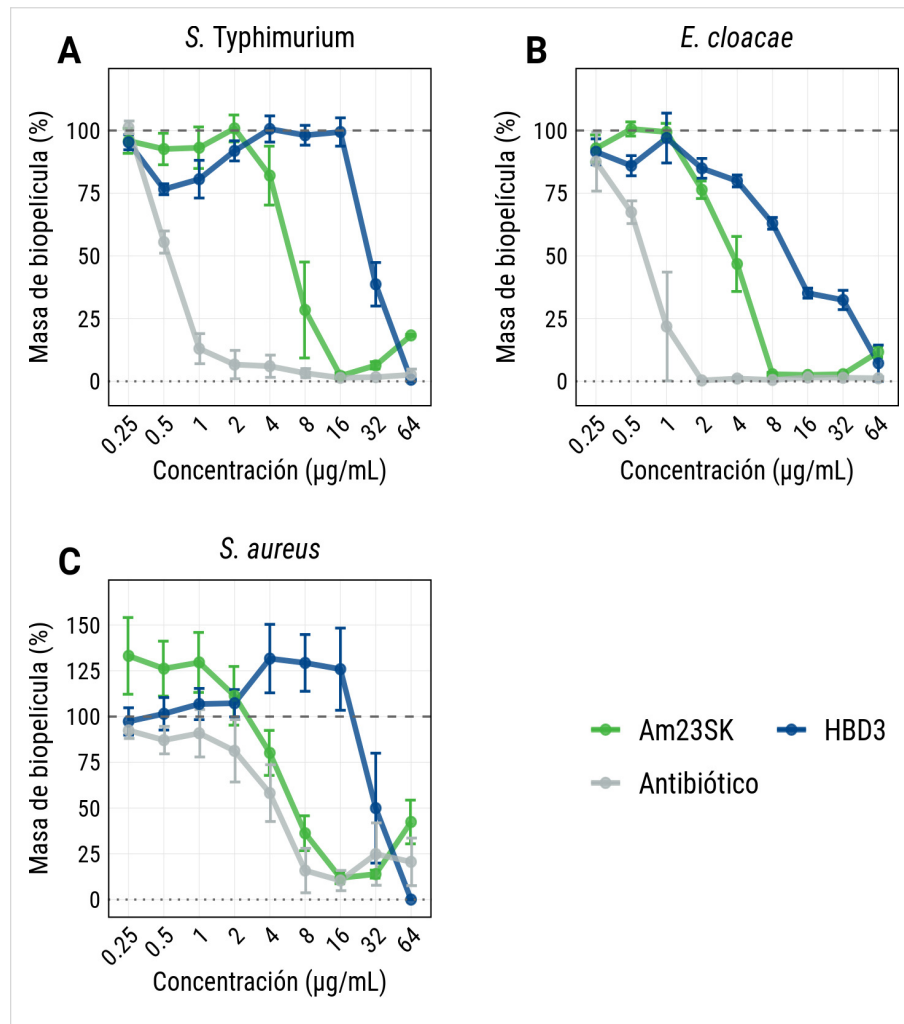


Figura 15: Actividad inhibitoria de biopelícula bacteriana de AM23SK y HBD3. La capacidad inhibitoria de las defensinas fue evaluada contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas en medio TSB 5 % mediante un ensayo de tinción con VC. El antibiótico Polimixina B se utilizó como control frente a *S. Typhimurium* (ATCC 14028) (**A**) y *E. cloacae* (218R1) (**B**), mientras que la Tobramicina se empleó frente a *S. aureus* (SAP0017) (**C**). Los valores se presentan como por ciento de masa de la biopelícula en relación al control de crecimiento (100 %). Los datos se muestran

como la media de al menos tres experimentos independientes, y las barras de error representan el error estándar de la media. Figura modificada de Santana et al. [165].

La actividad antibiopelícula de Am23SK se evaluó mediante un ensayo de inhibición basado en la tinción con VC. Lamentablemente, *A. baumannii* no formó biopelículas en las condiciones experimentales empleadas y no se pudo evaluar el efecto antibiopelícula de las β -defensinas contra esta cepa bacteriana. Este ensayo reveló tendencias similares a las observadas en los experimentos antimicrobianos. Am23SK superó a HBD3, inhibiendo la formación de más del 95 % de biopelícula contra *E. cloacae* a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y contra *S. aureus* y *S. Typhimurium* a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 15**). Curiosamente, a concentraciones de péptidos más elevadas se observó un aumento de la masa de la biopelícula bacteriana de aproximadamente un 20 % (según la tinción con VC). Es probable que esto sea producto de la agregación de los péptidos junto con restos de las células muertas y no a un aumento en sí del número de bacterias en la biopelícula, ya que a estas concentraciones de péptido no se recuperaron colonias bacterianas en los ensayos bactericidas.

6.1.6 Las isoformas de plegamiento de una misma variante de β -defensina mostraron similar actividad antimicrobiana y antibiopelícula

La capacidad antimicrobiana de las restantes variantes de crocBDs fue evaluada contra las bacterias *S. aureus* y *S. Typhimurium*. En general, las isoformas mostraron un efecto antimicrobiano más débil y fueron capaces de inhibir el crecimiento planctónico, en particular a concentraciones de péptidos más elevadas (**Tabla 3**). Por otra parte, la isoforma Cp13-P1 que fue inactiva bajo las condiciones probadas. Am17-P2 fue la isoforma más potente de todas, con valores de MIC contra *S. aureus* y *S. Typhimurium* de 64 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Sin embargo, bajo el rango de concentraciones evaluado, Am17-P2 sólo mostró actividad bactericida contra *S. Typhimurium* (**Figura S2**).

Curiosamente, sólo se observaron pocas diferencias en la actividad antimicrobiana para la mayoría de las isoformas de la misma variante (**Tabla 3** y **Figura S2**). Estos resultados sugieren que las conectividades de los puentes disulfuro tiene una influencia mo-

derada en la actividad antimicrobiana de algunas crocBDs. Este efecto parece ser específico para cada bacteria, siendo más notable contra *S. Typhimurium*.

Tabla 3: Actividad antimicrobiana de las isoformas de β -defensinas de cocodrilianos. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra los patógenos bacterianos en medio TSB 5 %. Los valores de MIC indicados ($\mu\text{g/mL}$) son la moda estadística de al menos tres experimentos independientes.

Variante sintética	Isoforma	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Am2HR	Am2-P2	> 64	64
	Am2-P3	> 64	64
Am11RR	Am11-P1	> 64	> 64
	Am11-P3	64	> 64
	Am11-P4	32	64
	Am11-P5	32	> 64
Am17RV	Am17-P1	> 64	> 64
	Am17-P2	64	16
	Am17-P3	> 64	> 64
Cp13QK	Cp13-P1	> 64	> 64
	Cp13-P3	> 64	> 64

Tabla modificada de Santana et al. [165].

La actividad antibiopelícula de las variantes de las crocBDs mostró la misma tendencia que observada en los ensayos antimicrobianos (**Figura 16**). En general, Am11-P4 y Am17-P2 fueron las isoformas más potentes contra ambas bacterias, mientras que Cp13-P1 y Cp13-P3 sólo fueron moderadamente activas contra *S. aureus*. De hecho, a mayores concentraciones de péptidos pudiera parecer que estas isoformas promueven la formación de biopelícula por parte de *S. Typhimurium*. Aunque se ha descrito previamente que la exposición bacteriana a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos puede estimular la formación de biopelículas [177], en este caso, un aumento de la tinción no implica necesariamente la proliferación bacteriana dentro de la biopelícula, ya que el VC

se une de forma no específica a las moléculas superficiales con carga negativa y a los polisacáridos [178]. Por lo tanto, un aumento en la producción de la matriz de la biopelícula, o incluso la precipitación del péptido con otros componentes en el cultivo bacteriano, podría dar lugar a una mayor tinción de CV sin afectar directamente el número de células.

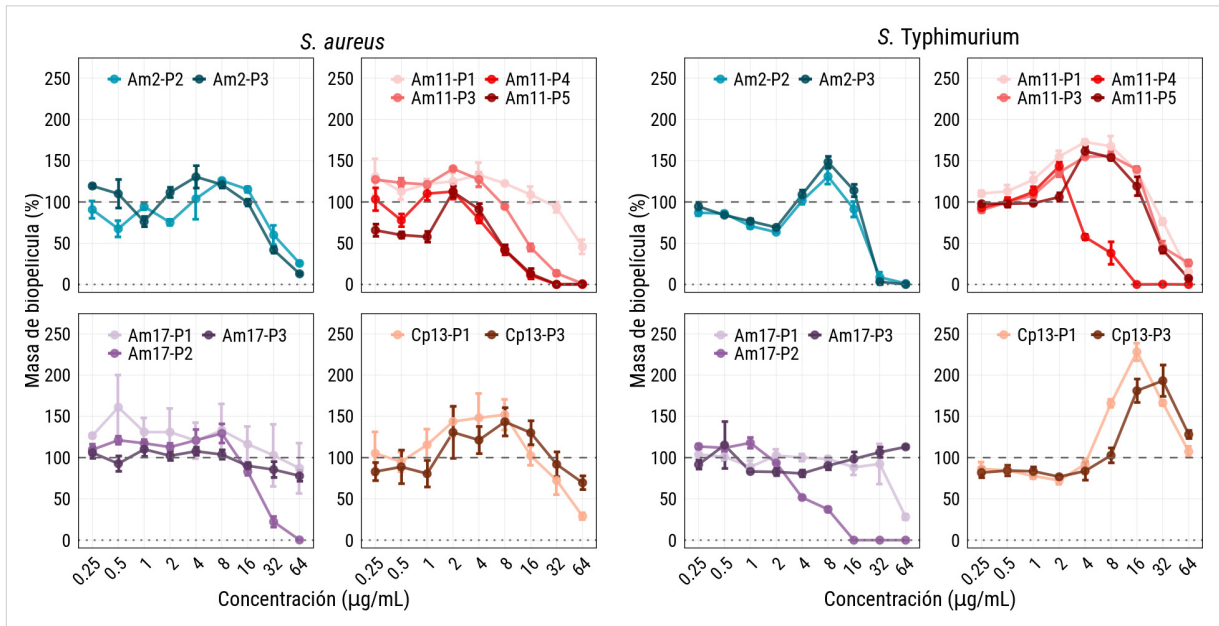


Figura 16: Actividad inhibitoria de biopelícula bacteriana de las isoformas de β -defensinas de codrilianos. La capacidad inhibitoria de biopelícula fue evaluada contra cepas de *S. aureus* (A) y *S. Typhimurium* (B) en medio TSB 5 % mediante un ensayo de tinción con VC. Los valores se presentan como porcentaje de masa de biopelícula en relación con el control de crecimiento. Los datos se muestran como la media de tres experimentos independientes, y las barras de error representan el error estándar de la media. Figura modificada de Santana et al. [165].

6.1.7 Am23SK no es citotóxica e inhibe moderadamente la expresión de mediadores pro-inflamatorios en células HBE

Para caracterizar mejor las propiedades biológicas de Am23SK, se investigó su efecto contra las células HBE. Este es un modelo de línea celular bien establecido, el cual conserva la morfología y las funciones de células epiteliales diferenciadas [179], y ha

sido utilizado anteriormente para examinar la citotoxicidad y las propiedades inmunomoduladoras de varios HDPs [146,180,181].

La citotoxicidad inducida por el péptido se determinó mediante el ensayo de liberación de LDH, utilizando Tritón X-100 como control positivo (definido como 100 % de citotoxicidad). La variante Am23SK mostró una baja actividad citotóxica contra las células HBE (**Figura 17**), con valores inferiores al 5 %, incluso a la mayor concentración de péptido evaluada (50 µg/mL). Esta baja de citotoxicidad fue similar a la observada para la HBD3, mientras que el péptido sintético control 1018 demostró una toxicidad modesta pero medible dentro del rango de concentración evaluado.

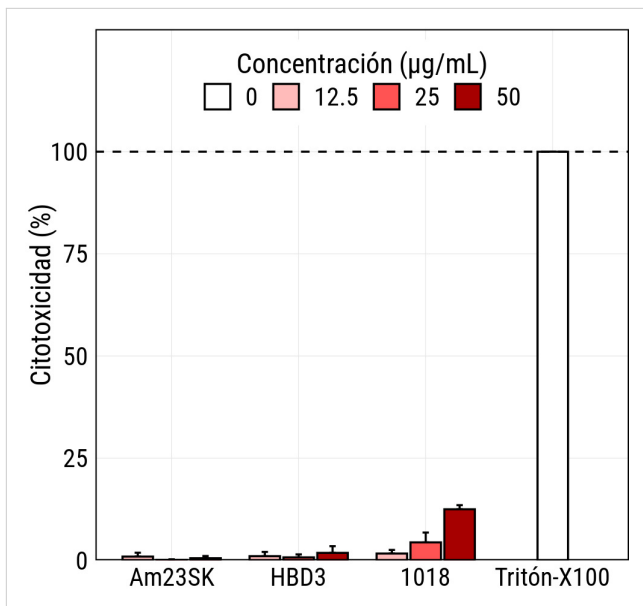


Figura 17: Actividad citotóxica de Am23SK y HBD3 contra células HBE. La citotoxicidad inducida por los péptidos se midió tras 24 horas de tratamiento mediante el ensayo de liberación de LDH. Los valores se presentan como por ciento de citotoxicidad en relación con el control positivo (células tratadas con Tritón X-100, definido como 100 % de toxicidad). Se muestra la media \pm desviación estándar de la media de tres réplicas biológicas. El péptido inmunomodulador 1018 se incluyó como control en el ensayo. Figura modificada de Santana et al. [165].

Adicionalmente, estudios de microscopía no mostraron cambios evidentes en la morfología celular de las HBE o de PBMCs humanas tratadas con AM23SK, lo que sugiere que este péptido no es citotóxico para las células de mamíferos (datos no mostrados).

El tratamiento con las crocBDs de las células HBE no estimuladas y estimuladas con poli(I:C), un agonista del receptor TLR-3 (del inglés *Toll-like receptor*), permitió evaluar su capacidad inmunomoduladora en función de la concentración. AmSK23 fue capaz de suprimir parcialmente la producción de IL-6 (**Figura 18B**) e IL-8 (**Figura 18D**) en esta línea

celular al ser estimuladas con poli(I:C). Aunque similar a la de HBD3, la actividad supresora de Am23SK fue modesta en comparación con la de 1018.

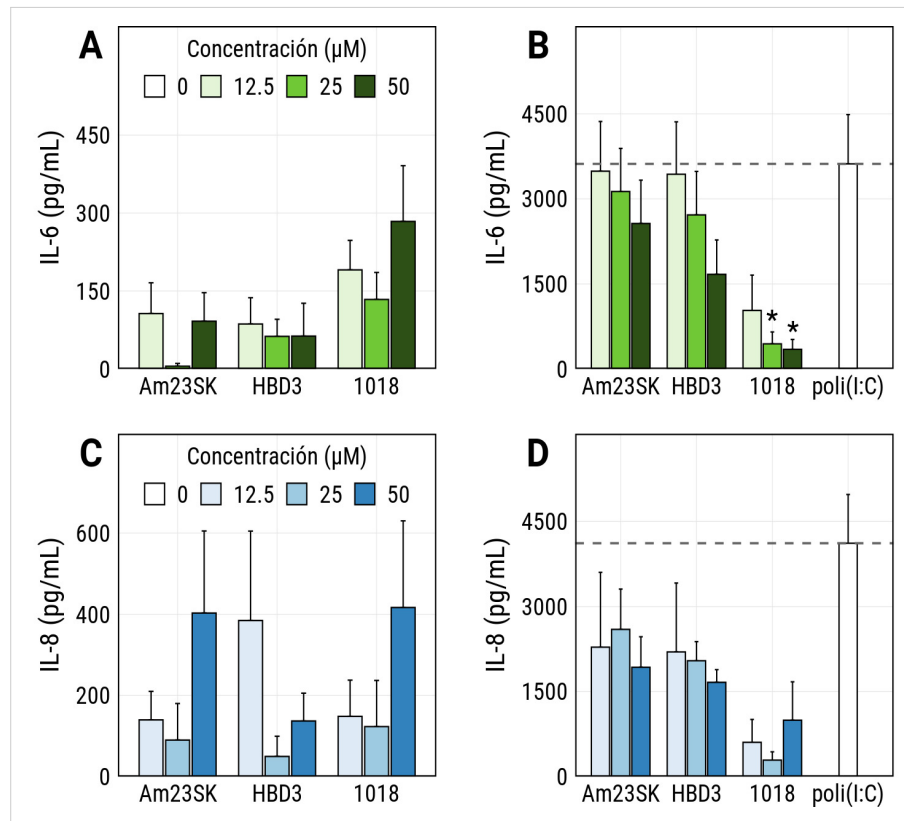


Figura 18: Actividad inmunomoduladora de Am23SK y HBD3 contra células HBE. La actividad supresora de las citocinas IL-6 e IL-8 de los péptidos contra las células HBE no estimuladas (**A** y **C**) y estimuladas con poli(I:C) (**B** y **D**) se determinó mediante ELISA tras 24 horas de tratamiento. En este caso, la estimulación con poli(I:C) y el tratamiento con varias concentraciones de péptidos se realizaron simultáneamente. Se muestra la media \pm desviación estándar de la media de tres réplicas biológicas. El fondo del control negativo (agua destilada) fue sustraído de los datos. El péptido inmunomodulador 1018 se incluyó como control. Los asteriscos denotan significancia estadística ($p < 0.05$) en comparación con poli(I:C) de acuerdo a la prueba de Dunnet. Figura modificada de Santana et al. [165].

No se observó una clara relación entre la concentración de péptidos y la producción de IL-6 o IL-8 en células HBE no estimuladas (**Figura 18A** y **18C**); aunque los niveles de IL-8 inducidos por Am23SK fueron comparables a los de 1018.

Trabajos precedentes han demostrado que los patrones de enlace disulfuro pueden tener una fuerte influencia en la actividad inmunomoduladora [182,183], por lo que el resto de las isoformas de las otras variantes de crocBDs no fueron evaluadas en estos ensayos.

6.2 Identificación y caracterización funcional de catelicidinas en cocodrilianos

6.2.1 Las secuencias de catelicidinas identificadas mostraron las características típicas de esta familia de HDPs

El análisis de los genomas de los cocodrilianos posibilitó también la identificación de novedosas secuencias de catelicidinas (**Figura 19, Table S4**). En este caso, seis secuencias fueron identificadas en *A. mississippiensis*, dos en *A. sinensis*, cuatro en *C. porosus* y seis en *G. gangeticus*. Desafortunadamente, debido a la baja calidad de los genomas, algunas secuencias sólo fueron identificadas de forma parcial (**Table S5**). La mayoría de estas secuencias carecen de un dominio N-terminal completo (en especial la región del péptido señal). No obstante, dichas secuencias sí presentaron la mayor parte del dominio catelina, incluyendo las cuatro cisteínas bien conservadas en esta región (**Figura 19**), así como otras características propias de esta familia, por lo que fueron consideradas nuevas catelicidinas. Así mismo, la identidad de las nuevas secuencias fue confirmada mediante un análisis de similitud empleando la herramienta BLAST del NCBI (resultados no mostrados).

Al compararlas con otras catelicidinas de reptiles, aves y mamíferos, un estudio filogenético mostró que las crocCATHs se agrupan fundamentalmente en siete clados principales (CATH1-7). Sorprendentemente, las CATH4 de *A. sinensis* y *G. gangeticus* aparecen agrupadas en un clado diferente junto a secuencias de serpiente y tortugas (**Figura 20**), aunque estas relaciones mostraron bajo soporte estadístico.

Nuestro análisis logró recuperar en las otras especies de cocodrilianos la mayoría de las secuencias ortólogas a las catelicidinas de *A. sinensis* previamente descritas [12].

Estas relaciones de ortología fueron utilizadas para nombrar las nuevas catelicidinas identificadas, con base a sus relaciones con las As-CATH(1-6). As-CATH1 y As-CATH2 resultaron las secuencias con menos cantidad de ortólogos identificados (**Figura 20**). También fueron identificadas algunas secuencias con relaciones de ortología lejanas (ej. Am-CATH11 y Cp-CATH10) respecto a las de *A. sinensis*.

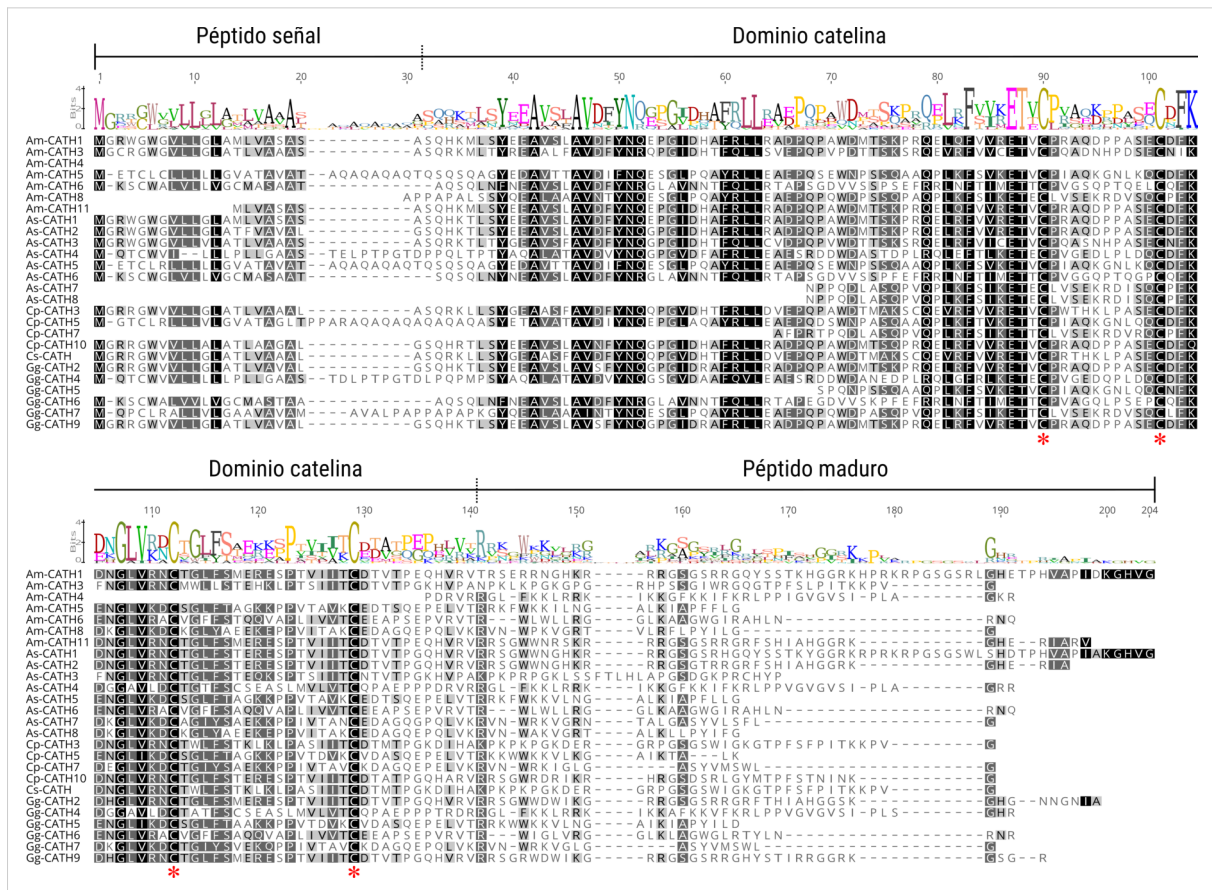


Figura 19: Alineamiento múltiple de las secuencias de catelicidinas de cocodrilianos. Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo MAFFT y visualizado en el programa Geneious Prime¹⁸. Los residuos aminoacídicos aparecen coloreados en escala de grises de acuerdo su porcentaje de identidad en cada posición del alineamiento. Las cisteínas altamente conservadas aparecen marcadas con asteriscos de color rojo. El logotipo en la parte superior del alineamiento también fue generado en el Geneious Prime. Fueron incluídas las catelicidinas de cocodrilianos previamente descritas As-CATH1-6 [12], Cs-CATH [184] y AM-36 [11] (renombrada aquí como Am-

18 <https://www.geneious.com>

CATH4). Abreviaturas: Ami: *A. mississippiensis*; Asi: *A. sinensis*; Cpo: *C. porosus*; Cs: *C. siamensis*; Gga: *G. gangeticus*.

Asimismo, este análisis permitió identificar un nuevo clado denominado CATH7, el cual está formado por secuencias de varias de las especies de cocodrilianos, indicando buen grado de robustez. Notablemente, otras dos secuencias, Am-CATH8 y As-CATH8, comparten una estrecha relación con este clado. De manera interesante, se observó que As-CATH7 y As-CATH8 se encuentran parcialmente solapadas en la misma región del genoma (**Table S5**), compartiendo un exón que codifica para parte del dominio catelina en ambas secuencias (resultados no mostrados). Sin embargo, con la información actual es imposible confirmar esta relación y discernir las implicaciones biológicas de la misma.

Como es esperado dado su cercanía evolutiva, el clado de los cocodrilianos forma parte de un súper clado que también incluye a las catelicidinas de aves, soportando los resultados obtenidos en este análisis filogenético.

6.2.2 Las catelicidinas sintéticas son moléculas cargadas positivamente, anfipáticas y adquieren una conformación de tipo α -hélice en presencia de micelas lipídicas

Para la caracterización funcional de las crocCATHs identificadas, cuatro secuencias fueron seleccionadas para su síntesis química. Varios estudios precedentes demostraron que la catelicidina As-CATH5 de *A. sinensis* posee una amplia actividad anti-infecciosa [12,94,95], por lo que la secuencia ortóloga Gg-CATH5 de *G. gangeticus* fue escogida ya que pudiera compartir dicha actividad biológica. Además de Gg-CATH5, fueron seleccionadas las secuencias As-CATH7 y Gg-CATH7 ya que ambas constituyen secuencias novedosas y están incluidas en el clado 7, el cual contiene representación de 3 de las cuatro especies de cocodrilianos. Finalmente, también fue elegida la secuencia As-CATH8 de *A. sinensis* dada su interesante relación con As-CATH7.

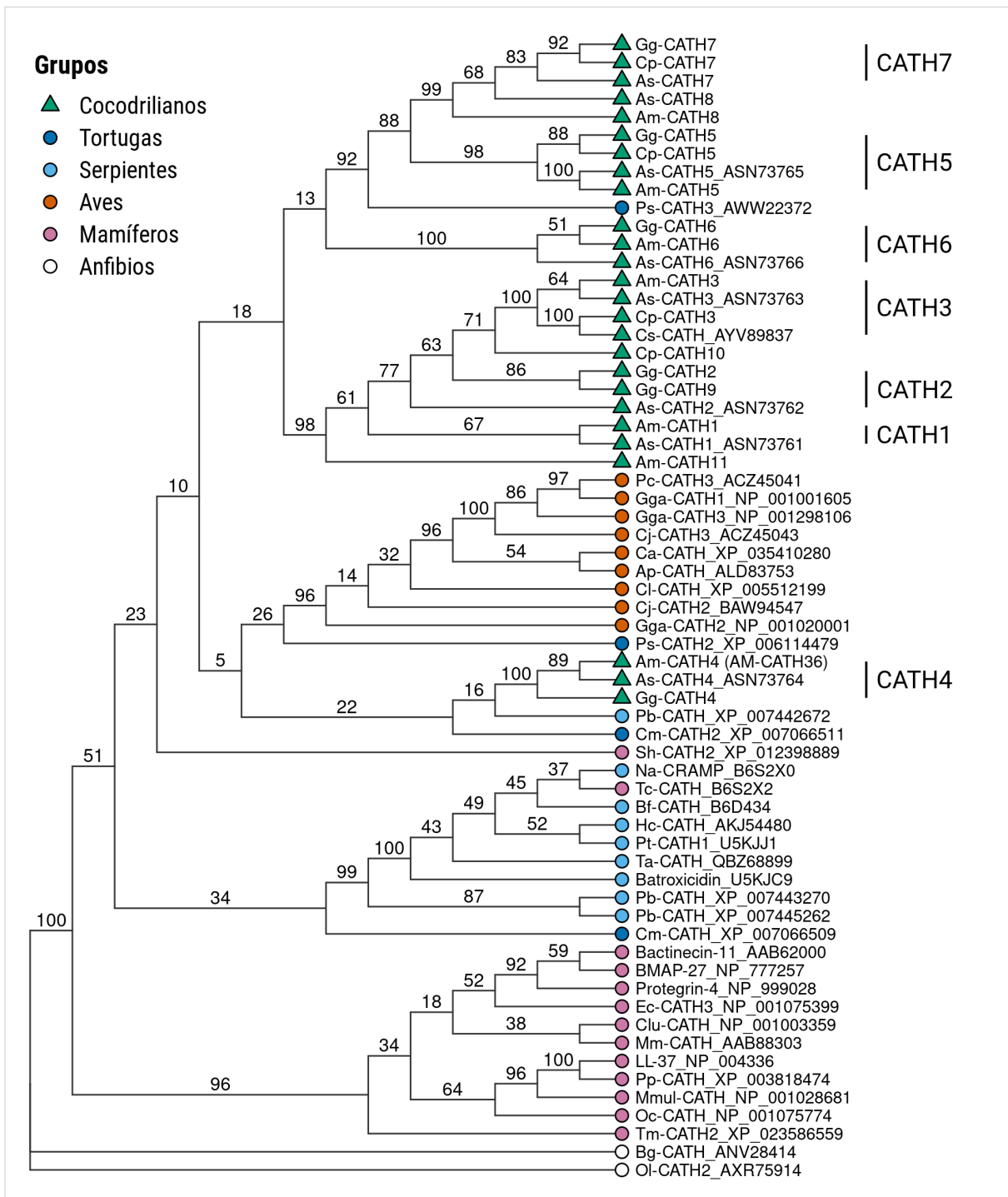


Figura 20: Análisis filogenético de las catelictidinas de reptiles. El árbol fue generado utilizando el criterio de máxima verosimilitud implementado en el programa RaxML. Fueron incluidas las secuencias de catelictidinas identificadas en los genomas de cocodrilianos, así como otras de los

principales linajes de reptiles, de aves y mamíferos. Las catelicidinas de anfibios Bg-CATH y Ol-CATH2 se utilizaron como grupo externo para enraizar el árbol. El análisis se realizó utilizando las secuencias completas de aminoácidos, incluyendo el péptido señal, el predominio y las regiones maduras. Los números de las ramas indican el soporte estadístico en forma de por ciento tras 1,000 réplicas de *bootstrap*. Los siete clados de cocodrilianos aparecen señalados en la figura y fueron nombrados (CATH1-7) tomando como referencia las catelicidinas de *A. sinensis* previamente descritas. Secuencias tomadas de GenBank se muestran con sus números de acceso.

De manera general, las crocCATHs sintéticas son péptidos cortos, con moderada carga positiva e hidrofobicidad. Gg-CATH7 resultó la secuencia con menor carga neta (+3.76) según la escala de Bjellqvist, mientras que As-CATH8 mostró el mayor valor de hidrofobicidad total (0.06), de acuerdo a la escala de Kyte-Doolittle. Curiosamente, todas las crocCATHs presentaron valores más bajos de carga e hidrofobicidad comparadas con la catelicidina humana LL-37.

Tabla 4: Propiedades físico-químicas de las catelicidinas de cocodrilianos sintéticas y LL-37. Se incluye como comparación la secuencia de la catelicidina humana LL-37. As: *A. sinensis*, Gg: *G. gangeticus*.

Nombre	Secuencia	Long.	M. M.	Carga	I. Hid	M. Hid.
As-CATH7	KRVNWRKVGRNTALGASYVLSFLG	24	2693.15	4.76	-0.15	0.25
As-CATH8	KRVNWAKVGRRTALKLLPYIFG	21	2430.97	4.76	0.06	0.29
Gg-CATH5	TRRKWWKKVLNGAIKIAPYILD	22	2670.24	4.76	-0.39	0.40
Gg-CATH7	KRVNWRKVGLGASYVMSWLG	20	2307.74	3.76	-0.11	0.23
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	37	4493.32	5.76	-0.72	0.56

Long.: longitud (número de aminoácidos); M.M.: masa molecular teórica en Daltons; Carga: carga neta de acuerdo a la escala de Kyte-Doolittle; I. Hid.: índice de hidrofobicidad de acuerdo a la escala de Bjellqvist; M Hid.: momento hidrofóbico medio (μH). Valor numérico del vector que se muestra en la representación en rueda de la Figura 21.

Adicionalmente, las crocCATHs fueron caracterizadas estructuralmente usando herramientas computacionales y DC (**Figura 21**). La catelicidina humana LL-37 ha sido extensamente caracterizada anteriormente por lo que no fue incluida en este análisis.

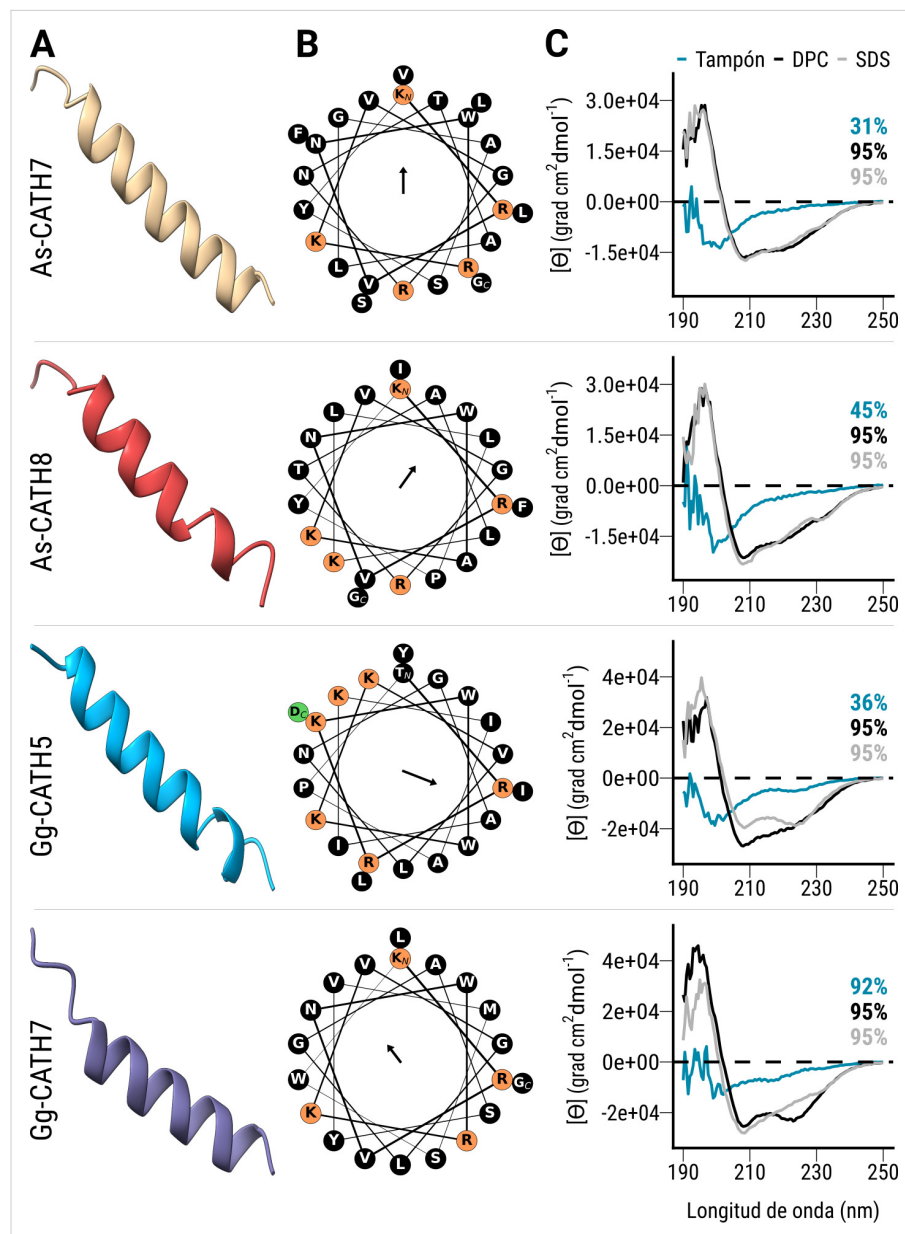


Figura 21: Análisis estructural de las catelicidinas sintéticas de cocodrillianos. Los modelos estructurales (A) fueron generados mediante el algoritmo AlphaFold y visualizados en Chimera X. Por otra parte, estructuras helicoidales en rueda (B) fueron obtenidas empleando el paquete modLAMP de Python. Los residuos con carga neta positiva y negativa aparecen resaltados en naranja y en verde, respectivamente, mientras que el resto de los aminoácidos de la secuencia se muestran en color negro. En el centro de la rueda aparece dibujado la orientación del momento hidrofóbico medio de cada secuencia. La longitud de la flecha es proporcional al valor numérico de dicho

vector (Tabla 4). Los espectros de dicroísmo circular (**C**) de las crocCATHs (100 μ M) fueron obtenidos en solución amortiguadora de fosfatos de sodio (25 mM, pH 7.4), en presencia de SDS (10 mM) y DPC (7.5 mM). Los resultados se muestran como elipticidad residual media y los por cientos de α -hélice, calculados según K2D3, aparecen coloreados según la condición experimental.

Modelos estructurales sugieren que las crocCATHs presentan una conformación tipo α -hélice (**Figura 21A**), con una distribución asimétrica de los residuos cargados y los hidrofóbicos a ambos lados de la hélice (**Figura 21B**), indicando un cierto grado de anfipaticidad en estas moléculas.

A su vez, el cálculo de los momentos hidrofóbicos medios, estimación numérica de la anfipaticidad de una estructura peptídica [141], mostró diferencias entre las crocCATHs en cuanto a magnitud y sentido de esta propiedad vectorial (**Figura 21B** y **Tabla 4**). En general, Gg-CATH5 fue la secuencia más anfipática entre todas las crocCATHs, aunque mostró valores inferiores a lo estimado para la catelicidina humana LL-37 (**Tabla 4**).

Estudios de dicroísmo sugieren que las crocCATHs sintéticas presentan una estructura secundaria mayormente desordenada en solución amortiguadora de fosfatos de sodio (**Figura 21C**), la cual se caracteriza por presentar baja elipticidad por encima de 210 nm y la presencia de bandas negativas cerca de 195 nm en el espectro de DC [185]. En este sentido, los por cientos iniciales de α -hélice, estimados con el servidor K2D3, oscilaron entre 31-45 % para tres de las cuatro catelicidinas investigadas. Sorprendentemente, este programa predijo que Gg-CATH7 presenta una conformación con un alto por ciento de α -hélice (92 %) en solución acuosa, aunque visualmente su espectro no mostró grandes diferencias respecto a las otras catelicidinas.

En contacto con micelas lipídicas (condiciones más hidrofóbicas), las crocCATHs adquieren una conformación mayormente helicoidal (~95 % de α -hélice) (**Figura 21C**), cuyo espectro se caracteriza por la presencia de bandas negativas alrededor de los 220 y 210 nm, y una banda positiva aproximadamente a los 190 nm [185]. Este comportamiento fue similar en presencia de micelas compuestas por lípidos con carga positiva (DPC) o negativa (SDS), y suporta lo observado en los modelos tridimensionales.

6.2.3 Las catelicidinas de cocodrilianos presentan amplia actividad antimicrobiana y antibiopelícula

Para caracterizar funcionalmente las crocCATHs, la actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos fue evaluada contra varios patógenos de importancia médica, incluidos aquellos del grupo ESKAPE [3]. En este sentido, los péptidos sintéticos mostraron amplia actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas (**Tabla 5**), con valores de MIC menores a 8 μM en la mayoría de los casos.

En general, As-CATH8 y Gg-CATH5 fueron los péptidos más activos entre todas las catelicidinas. Sorprendentemente, *E. faecium* resultó resistente a la acción de las catelicidinas sintéticas y solo Gg-CATH7 demostró actividad pero a la mayor concentración de péptido ensayada. Por otro lado, *A. baumannii* y *E. cloacae* resultaron las especies bacterianas más susceptibles. Los valores de MIC obtenidos para estas dos catelicidinas fueron similares a los antibióticos Polimixina B y Vancomicina en la mayoría de los casos, excepto contra *P. vulgaris* que resultó resistente a la acción de la Polimixina B.

Tabla 5: Actividad antimicrobiana de las catelicidinas cocodrilianos. Los ensayos antimicrobianos se realizaron en MHB. Los valores de MIC indicados (μM) son la moda estadística de al menos tres experimentos independientes. Los antibióticos Polimixina B y Vancomicina se muestran como comparación.

Bacteria	As-CATH7	As-CATH8	Gg-CATH5	Gg-CATH7	Polimixina B	Vancomicina
<i>E. cloacae</i>	0.5	0.5	0.5	2	0.5	n.d.
<i>S. aureus</i>	4	0.5	1	16	n.d.	0.5
<i>K. pneumoniae</i>	1	0.5	0.5	4	0.5	n.d.
<i>A. baumannii</i>	0.25	0.25	0.5	1	0.5	n.d.
<i>P. aeruginosa</i>	4	1	1	8	0.5	n.d.
<i>E. faecium</i>	> 64	> 64	> 64	64	> 64	n.d.
<i>E. coli</i>	2	1	4	4	0.5	n.d.
<i>S. Typhimurium</i>	2	1	0.5	4	1	n.d.

<i>P. vulgaris</i>	> 64	4	8	> 64	> 64	n.d.
--------------------	------	---	---	------	------	------

n.d.: no determinado.

La actividad inhibitoria de biopelículas bacterianas fue evaluada utilizando diferentes medios de cultivo (ver sección Sección 5.5.3 de Materiales y Métodos). Desafortunadamente, ninguno de los medios evaluados propició la formación de biopelículas de *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* o *E. faecium*, por lo que estas especies bacterianas no fueron evaluadas en los ensayos de inhibición. De manera general, estos experimentos mostraron tendencias similares a lo observado en los ensayos antimicrobianos en MHB. Las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5 resultaron los péptidos más activos (**Tabla 6**), mostrando valores de MBIC₉₅ en el rango de 1-4 μ M excepto contra *E. coli* y *P. aeruginosa*, las cuales resultaron las bacterias más resistentes ante la acción de las crocCATHs.

Tabla 6: Actividad inhibitoria de biopelículas de las catelicidinas cocodrilianos. Los valores concentración mínima inhibitoria de biopelícula (MBIC₉₅) de los péptidos sintéticos se determinaron mediante un ensayo de microdilución con tinción con VC. La MBIC₉₅ se definió como la concentración mínima de péptido capaz de inhibir al menos el 95 % de biopelículas bacterianas. Los valores de MBIC₉₅ indicados (μ M) fueron determinados a partir de la media del por ciento de inhibición de al menos tres experimentos independientes.

Bacteria	As-CATH7	As-CATH8	Gg-CATH5	Gg-CATH7
<i>E. cloacae</i>	32	4	4	16
<i>S. aureus</i>	4	1	1	4
<i>A. baumannii</i>	1	0.5	0.5	1
<i>P. aeruginosa</i>	>64	64	32	>64
<i>E. coli</i>	32	1	32	32
<i>S. enterica</i>	1	1	1	4

n.d.: no determinado.

6.2.4 Las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5 son moderadamente citotóxicas contra células humanas

La capacidad citotóxica de las crocCATHs y la catelicidina humana LL-37 fue investigada contra células HBE y PBMC humanas mediante el ensayo de liberación de LDH (**Figura 22**).

Bajo estas condiciones, los péptidos As-CATH8 y Gg-CATH5 mostraron una moderada citotoxicidad contra ambos tipos celulares, en especial a las mayores concentraciones evaluadas (5 y 10 μM). No obstante, este efecto fue similar a lo observado para la catelicidina humana LL-37.

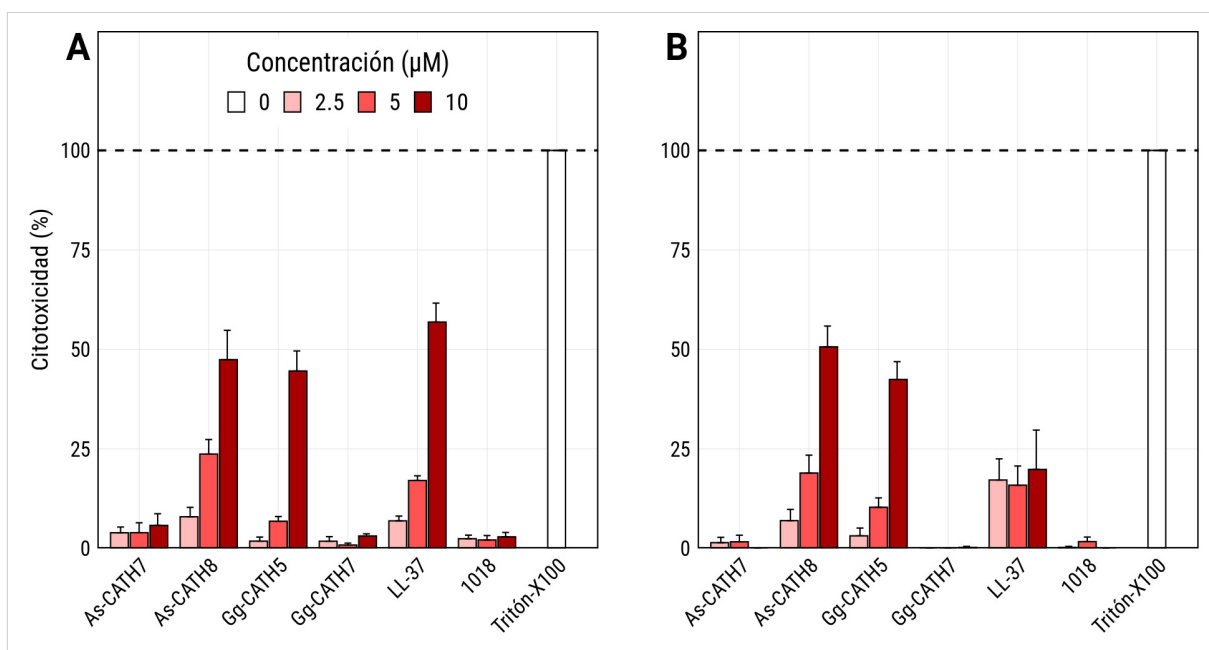


Figura 22: Actividad citotóxica de las catelicidinas de cocodrilianos contra células humanas en cultivo. La citotoxicidad inducida por los péptidos se midió mediante el ensayo de liberación de LDH contra células HBE (**A**) y PBMC humanas (**B**). Los valores se presentan como porcentaje de citotoxicidad en relación con el control positivo (células tratadas con Tritón X-100, definido como 100 % de toxicidad). La catelicidina humana LL-37 y el péptido inmunomodulador 1018 fueron incluidos en el ensayo como comparación y control, respectivamente.

Por otra parte, As-CATH7 y Gg-CATH7 mostraron bajos valores de citotoxicidad en el rango de concentraciones ensayado y estos fueron semejantes a lo obtenido con el

péptido inmunomodulador 1018 (**Figura 22**). Adicionalmente, estudios de microscopía mostraron que estas catelicidinas no afectaron la morfología celular de las HBEs o de las PBMCs humanas tratadas, lo que sugiere que no son citotóxicas para las células de mamíferos (datos no mostrados).

6.2.5 La catelicidina Gg-CATH7 suprime la producción de mediadores pro-inflamatorios en células HBE estimuladas con poli(I:C)

La capacidad inmunomoduladora de las catelicidinas As-CATH7 y Gg-CATH7 fue evaluada contra células HBE humanas no estimuladas y estimuladas con poli(I:C). Los péptidos As-CATH8, Gg-CATH5 y LL-37 no fueron incluidos ya que esto dificultaría la interpretación de los ensayos de inmunomodulación dado la variación de los niveles de citocinas pudiera estar asociada a sus actividades citotóxicas y no necesariamente inmunomoduladoras.

En general, las catelicidinas de cocodrilianos tuvieron un reducido impacto en la producción de IL-6 y IL-8 en células HBE no estimuladas (**Figura23A y C**) y este efecto fue similar en la mayoría de los casos a la observado para el péptido inmunomodulador 1018.

Por otra parte, Gg-CATH7 demostró una potente actividad inmunomoduladora y suprimió la producción de ambas citocinas en células HBE estimuladas con poli(I:C), al igual que 1018 (**Figura23B y D**). Este efecto fue significativo para la mayoría de las concentraciones de péptido ensayadas, comparado con el control (muestras no tratadas y estimuladas con poli(I:C)). Por el contrario, la catelicidina As-CATH7 tuvo un efecto leve en la producción de IL-6 y no afectó de manera visible la producción de IL-8 en las HBE estimuladas.

6.2.6 Las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5 mostraron mejor actividad antibiopelícula contra *S. aureus* que la LL-37 en un modelo de piel humana

La capacidad antibiopelícula de las crocCATHs fue investigada empleando un modelo de piel humana. Este modelo permite la caracterización de la actividad de erradica-

ción de biopelículas bacterianas pre-formadas en condiciones más similares a lo encontrado *in vivo* y ha sido utilizado para estudiar varios HDPs contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* [159]. Dado que los ensayos de inhibición sugirieron que las crocCATH presentan mayor actividad contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* no fue incluida en los ensayos de erradicación.

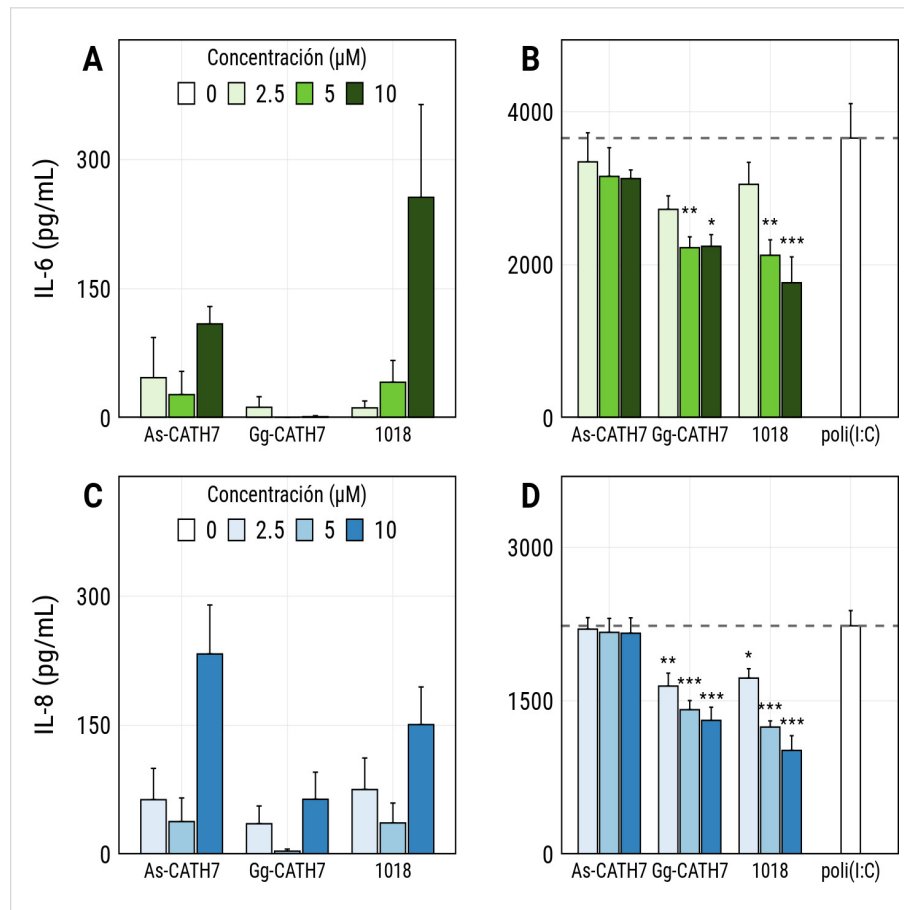


Figura 23: Actividad inmunomoduladora de la catelicidinas de cocodrilianos As-CATH7 y Gg-CATH7 células HBE humanas. La producción de las citocinas IL-6 e IL-8 por las células HBE no estimuladas (**A** y **C**) y estimuladas con poli(I:C) (**B** y **D**) se determinó mediante ELISA tras 24 horas de tratamiento con los péptidos. En este caso, la estimulación con poli(I:C) y el tratamiento con varias concentraciones de péptidos se realizaron simultáneamente. Los datos se muestran como la media de las menos tres réplicas biológicas y las barras de error denotan el error estándar de la media. El fondo del control negativo (agua destilada) fue sustraído de los datos. El péptido inmunomodulador 1018 se incluyó como control. Los asteriscos denotan significancia estadística en

comparación con el grupo control (células estimuladas con poli(I:C) pero no tratadas con péptido) de acuerdo a la prueba de Dunnet. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos utilizando el modelo de piel resaltaron la capacidad anti-biopelícula de las catelicidinas As-CATH8 y Gg-CATH5. El tratamiento con 200 μg de estos péptidos logró erradicar completamente las biopelículas de *S. aureus* después de 24 horas (**Figura 24**). Este efecto fue significativo en comparación con el control negativo (agua destilada) y fue mejor que lo observado para la catelicidina humana LL-37, la cual demostró una baja actividad antibiopelícula bajo las condiciones experimentales empleadas.

Por otra parte, As-CATH7 y Gg-CATH7 fueron ligeramente mejor que LL-37, aunque tampoco lograron eliminar las biopelículas bacterianas en todas las réplicas (**Figura 24**). Estos resultados suportan a As-CATH8 y Gg-CATH 5 como los péptidos con mayor actividad antibacteriana directa de todas las crocCATHs identificadas.

Es importante destacar que no se observaron efectos citotóxicos contra las células epiteliales por parte de ninguna de las catelicidinas evaluadas, según ensayos de liberación de LDH y el análisis de cortes histológicos obtenidos (resultados no mostrados).

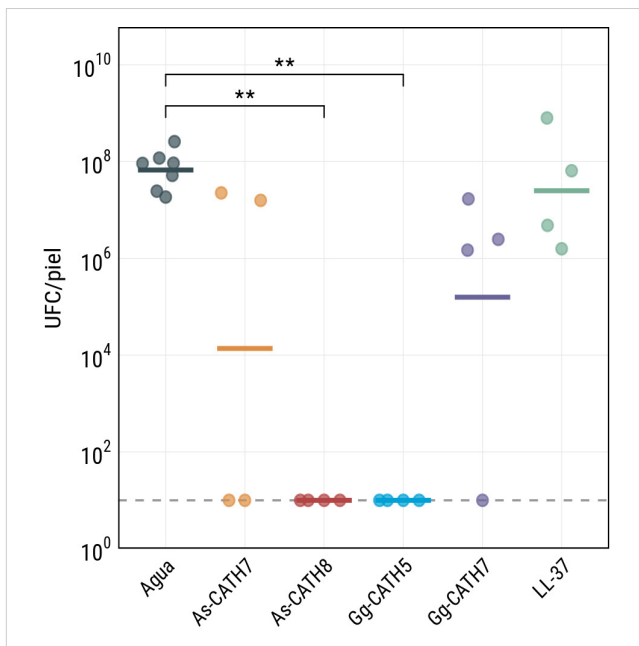


Figura 24: Actividad de erradicación de biopelículas bacterianas de las crocCATH en un modelo de piel humana. Las biopelículas de *S. aureus* previamente formadas en la piel fueron tratadas con 200 μg de péptido o con agua destilada como control negativo. Se muestran los valores de unidades formadoras de colonias (UFC) por fragmento de piel después de 24 horas de tratamiento. El límite de detección del ensayo fue de 10 UFC (indicado con líneas discontinuas). ** = $p < 0.01$ según la prueba de Dunn con la corrección de Benjamini-Hochberg.

6.2.7 As-CATH8 mostró un fuerte efecto anti-infeccioso contra *S. aureus* y *A. baumannii* en un modelo murino de absceso cutáneo

La capacidad antibacteriana de As-CATH8 y Gg-CATH5 se evaluó en un modelo de absceso en ratón contra dos patógenos frecuente asociados a infecciones en piel y tejidos blandos: *S. aureus* y *A. baumannii* [186,187].

Ratones tratados localmente con 15 mg/kg de las catelicinas de cocodrilianos o LL-37 no presentaron daño tisular o precipitación de los péptidos en el sitio de inoculación (resultados no mostrados), por lo que los péptidos fueron considerados como seguros a la dosis y condiciones empleadas.

Utilizando este modelo de alta densidad bacteriana, Gg-CATH5 solo mostró débil actividad contra *S. aureus* a una dosis superior a la utilizada (25 mg/kg) (resultados no mostrados), por lo que no se incluyó en el resto de los experimentos.

Por otra parte, As-CATH8 mostró un fuerte efecto antibiótico y fue capaz de disminuir el área de dermonecrosis (**Figura 25A y C**) y la carga bacteriana (**Figura 25B y D**) en abscesos formados por ambos patógenos. El efecto en la reducción del tamaño del absceso fue significativo contra *S. aureus* (**Figura 25A**) al compararse tanto con el control negativo (agua destilada) como con LL-37, según la prueba de Dunn. Igualmente, se apreció una reducción del número de colonias de *S. aureus* recuperadas de los abscesos tratados con As-CATH8, según la prueba de Tukey (**Figura 25B**).

Resultados similares fueron observados contra *A. baumannii*. La catelicidina del ali-gátor chino redujo significativamente el área dermonecrótica observada (prueba de Dunn) y la carga bacteriana (prueba de Tukey) comparada con el control negativo (**Figura 25C**). En este caso, el tratamiento con LL-37 también disminuyó el tamaño del absceso formado por esta bacteria.

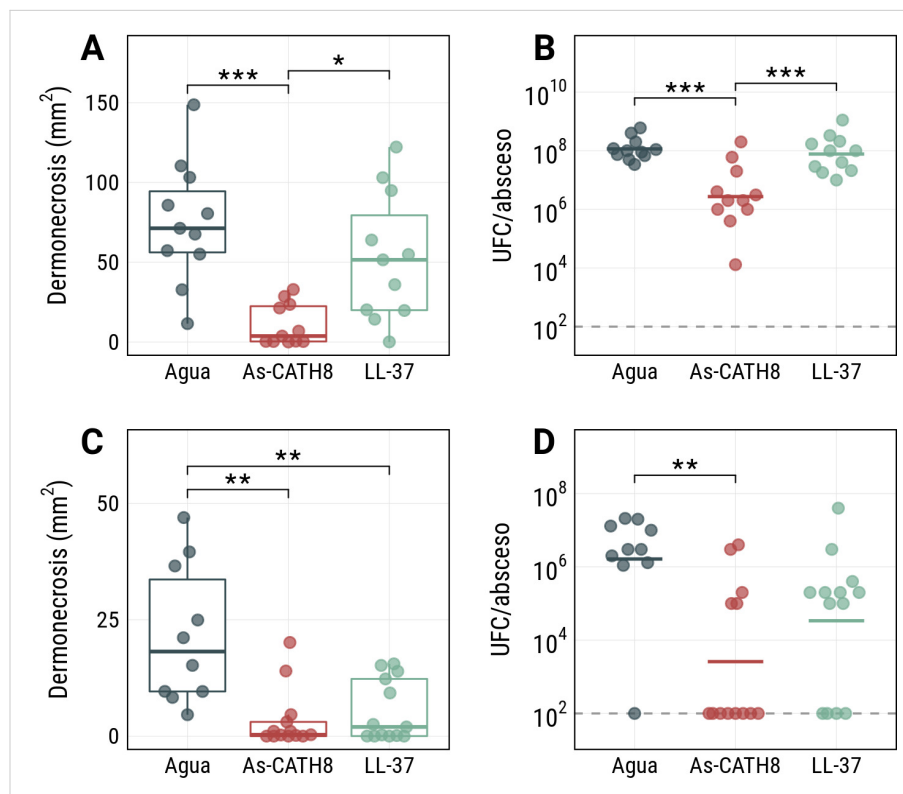


Figura 25: Capacidad anti-infecciosa de As-CATH8 en un modelo murino de absceso bacteriano. Los ratones fueron infectados con cada *S. aureus* (**A** y **B**) o con *A. baumannii* (**C** y **D**), y tratados una hora más tarde con 15 mg/kg de las catelicidinas As-CATH8 o LL-37. Como control negativo se utilizó agua destilada. El área de dermonecrosis (**A** y **C**) y la carga bacteriana fueron evaluadas después de transcurridos tres días. Los puntos individuales representan diferentes réplicas biológicas. Los resultados de los ensayos de cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) se muestran como la media geométrica de cada tratamiento, indicada con barras horizontales. El límite de detección de este ensayo fue 100 UFC/absceso (representado con líneas discontinuas). En el caso del área de dermonecrosis, el diagrama de cajas y bigotes muestra la mediana y los rangos intercuartílicos (RIQ). El bigote superior e inferior se extienden hasta el último valor de la muestra que no sobrepasa $1.5 \times \text{RIQ}$ a partir del tercer o el primer cuartil, respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$) de acuerdo a las pruebas de Dunn (**A** y **C**) y Tukey (**B** y **D**). En el caso de la prueba de Dunn se empleó la corrección de Benjamini-Hochberg.

7 Discusión

Varios estudios han demostrado que los cocodrilianos presentan un robusto sistema inmune [10,188], el cual les permite convivir con numerosos microorganismos, muchos de ellos patógenos para los humanos y que forman parte de su microbiota natural [189,190]. Dentro de este grupo se encuentran varias bacterias del grupo ESKAPE, de alta prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos por su alta capacidad de desarrollar resistencia a los mismos [3,175]. Así, que los cocodrilianos constituyen candidatos muy interesantes para explorar el repertorio de HDPs.

Aunque algo se ha avanzado en este sentido y se han identificados varios HDPs de las familias de las β -defensinas [13] y catelicidinas [12,184], la mayoría de estos estudios fueron realizados en el aligátor chino (*A. sinensis*), por lo que la gran mayoría de las especies de cocodrilianos permanecen poco estudiadas. Adicionalmente, en el caso de las β -defensinas, ninguna de las secuencias identificadas fueron funcionalmente caracterizadas. La secuenciación de los genomas de *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus* [14,15] abrió una nueva posibilidad para el estudio de HDP en cocodrilianos mediante el empleo de estrategias bioinformáticas. En este sentido, el uso de modelos ocultos de Markov ha sido exitosamente empleado para el estudio de estas moléculas en varias especies de vertebrados [49,191,192].

Utilizando esta estrategia, fueron identificadas 60 nuevas secuencias de β -defensinas y 18 catelicidinas en estas cuatro especies de cocodrilianos. Dichas secuencias mostraron las principales características de ambas familias (**Figura 9 y 19**) y clara relaciones de homología con secuencias de *A. sinensis* y de otros cocodrilianos previamente descritas (**Figura 10 y 20**). No obstante, en muchos casos no se lograron recuperar todos los ortólogos en las especies estudiadas, probablemente debido a la baja calidad de esas regiones en las actuales versiones de los genomas. Futuros experimentos de biología molecular y secuenciación de las regiones genómicas específicas, diseñados teniendo en cuenta los resultados aquí descritos, pudieran brindar mayor información al respecto.

Adicionalmente, nuestro trabajo permitió confirmar la identidad de varias secuencias con estatus de “predichas” en las bases de datos de nucleótidos y proteínas del NCBI (resultados no mostrados), con las cuales se obtuvo un 100 % de identidad en un análisis empleando la herramienta BLAST. Esta estrategia también permitió encontrar otras secuencias sin directa homología con anteriores secuencias de cocodrilianos, demostrando la buena sensibilidad de la metodología empleada.

Aunque en este trabajo no se evaluó la expresión *in vivo* de las secuencias identificadas, el patrón de expresión de varias β -defensinas y catelicidinas de *A. sinensis* ha sido estudiado con anterioridad [12,13]. Por lo tanto, es interesante especular que las secuencias identificadas podrían mostrar patrones de expresión similares a sus ortólogos más directos en el aligátor chino, como se ha sugerido para especies estrechamente relacionadas en otros grupos como las aves [193]. No obstante, para secuencias sin claras relaciones de ortología, como Am23SK, As-CATH7 o As-CATH8, futuros experimentos de biología molecular con muestras de tejidos de cocodrilianos con alta expresión de β -defensinas y catelicidinas podrían ayudar a confirmar las secuencias y los perfiles de expresión *in vivo* de las secuencias identificadas.

7.1 Plegamiento de las variantes de β -defensinas sintéticas

Para la caracterización funcional de las β -defensinas identificadas se optó por un enfoque minimalista, en el cual las secuencias de los péptidos sintéticos fueron restringidos al marco de cisteínas, incluyendo un residuo extra en el N- y C-terminal. Esta estrategia se ha aplicado con éxito anteriormente para diseñar péptidos de β -defensinas activos que contenían dos [194] y tres [172] residuos adicionales al marco de cisteína, lo que indica que esta región alberga las propiedades biológicas fundamentales exhibidas por las β -defensinas.

Las secuencias crocBD sintetizadas fueron plegadas *in vitro* y nuestros resultados revelaron marcadas diferencias en la eficiencia de plegado entre las variantes de crocBDs (**Figura 14**), con la mayoría de ellas, mostrando varias isoformas en el cromatograma RP-

HPLC. Una mayor eficiencia (menos isoformas) no estuvo asociada con valores de carga o índice de hidrofobicidad. Por ejemplo, Am11RR es la variante más corta y con mayor carga neta (**Tabla 1**), mientras que Cp13QK es la más hidrofílica; sin embargo, en ambos casos se observaron varias isoformas en el cromatograma de RP-HPLC. Curiosamente, Am17RV y Am23SK presentan valores muy similares de hidrofobicidad (-0.22 y -0.21, respectivamente) y menos de una unidad de diferencia en la carga neta, pero sus eficiencias de plegado fueron bastante diferentes. Esto sugiere que, más allá de las propiedades físico-químicas, la secuencia específica de aminoácidos influye en el resultado final del plegamiento de las β -defensinas.

De todas las variantes de crocBDs, sólo Am23SK fue capaz de plegarse en una sola isoforma (**Figura 14**) y sus conectividades disulfuro fueron parcialmente confirmadas por un análisis de proteólisis acoplado a espectrometría de masas. Esto concuerda con estudios anteriores en los que este protocolo fue utilizado para plegar varias β -defensinas naturales [148,167] y artificiales [148,172], dando como resultado una única isoforma predominante. Sin embargo, el plegado oxidativo ha demostrado ser un reto para algunos miembros de la familia β -defensina, obteniéndose una compleja mezcla de isómeros disulfuro en algunos casos [195].

7.2 Actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los HDPs de cocodrilianos

A pesar de la amplia caracterización de su actividad antimicrobiana, sólo unos pocos estudios han explorado las propiedades antibiopelícula de las defensinas [196,197]. Como se ha descrito previamente para β -defensinas de mamíferos [167,168,198] y de aves [169,183], las conectividades disulfuro intramoleculares tuvieron un impacto leve en las actividades antibacterianas de la mayoría de las variantes de crocBDs contra células planctónicas (**Tabla 3** y **Figura S2**), mostrando una tendencia bien conservada entre los grupos de vertebrados.

Nuestros resultados indican que lo mismo podría ser cierto también para la actividad antibiopelícula de las variantes (**Figura 16**). Curiosamente, Am11RR y Am17RV parecen ser más sensibles a las diferencias estructurales, ya que algunas isoformas mostraron una marcada diferencia en actividad, especialmente contra *S. Typhimurium*, lo que sugiere que la influencia de los enlaces disulfuro en las actividades biológicas de las estas defensinas podría ser específica para cada péptido y bacteria.

En general, Am23SK resultó ser la crocBD más activa y fue capaz de afectar el crecimiento planctónico (**Tabla 2**) y la formación de biopelículas de varios patógenos bacterianos (**Figura 15**) a concentraciones inferiores a las de HBD3, la más activa de las defensinas humanas y que presenta una actividad antimicrobiana de amplio espectro [145]. De hecho, Am23SK mostró efectos similares o incluso mayores que el antibiótico Tobramicina contra las células planctónicas y las biopelículas de *S. aureus*, y mostró valores de MIC similares a los de la Polimixina B contra *A. baumannii*. También reveló una amplia capacidad bactericida dentro del rango de concentración evaluado (**Figura S1**).

Las catelicidinas de cocodrilianos identificadas mostraron una amplia actividad antimicrobiana, en concordancia con los resultados obtenidos en un otros trabajos [12,94]. En este sentido, As-CATH8 y Gg-CATH5 resultaron los péptidos más activos y mostraron un potente efecto antimicrobiano contra células planctónicas (**Tabla 5**) y capacidad inhibitoria de biopelículas de patógenos Gram-positivos y Gram-negativos (**Tabla 6**), la mayoría de ellos aislados clínicos y resistentes a antibióticos. De manera interesante, contrario a lo observado para su ortólogo en *A. sinensis* (As-CATH5), Gg-CATH5 mostró poca actividad contra *E. faecium*, aunque el uso de diferentes cepas bacterianas en ambos estudios puede influir en esta discrepancia.

El potente efecto antibiopelícula de As-CATH8 y Gg-CATH5 fue corroborado en un modelo de piel humana. Estos péptidos lograron erradicar completamente las biopelículas de un aislado clínico resistente a la Meticilina de *S. aureus*, superando a la catelicidina LL-37 (**Figura 24**). Adicionalmente, el tratamiento con de las crocCATHs 0.7 % produjo una mayor reducción de la carga bacteriana comparado con del antibiótico Mupiroci-

na 1 % [159], usado frecuentemente contra infecciones de piel [199]. Por otra parte, en este modelo que emula condiciones más similares a lo encontrado *in vivo*, la actividad de As-CATH7 y Gg-CATH7 contra biopelículas de *S. aureus* fue mucho más débil y cercana a lo observado para el control negativo (agua destilada).

Finalmente, la actividad biológica de los HDPs de los cocodrilianos evaluados en este trabajo no correlacionó claramente con sus propiedades físico-químicas como la carga neta o el índice de hidrofobicidad. Por otra parte, análisis estructurales mostraron que estos HDPs presentaban algún grado de anfipaticidad (**Figura 12 y 21**), aunque esta propiedad por sí misma no explica la diferencia de actividades observada entre los distintos péptidos. Así, nuestros resultados concuerdan con la idea de que es poco probable que propiedades físico-químicas individuales, como la carga o la hidrofobicidad, expliquen *per se* la complejidad de las actividades biológicas de los HDPs [96].

7.3 Citotoxicidad e inmunomodulación de los HDPs de cocodrilianos

Las actividades citotóxicas de las crocBDs y crocCATHs fueron evaluadas en este trabajo contra las células HBE y PBMC humanas. En este sentido, la variante Am23SK mostró una citotoxicidad escasa o nula, similar a la observada para la β -defensina humana HBD3 (**Figura 17**). Estos resultados son comparables a los descritos para otras β -defensinas de reptiles [51,164] y apoyan la idea de la baja de citotoxicidad de estos péptidos.

Aparte de en mamíferos [200], las propiedades inmunomoduladoras de las β -defensinas han sido descritas en peces [201,202] y aves [183,203]; con particular énfasis en su capacidad quimiotáctica hacia varios tipos celulares endógenos. Curiosamente, otros trabajos también han descrito los efectos inmunomoduladores de las β -defensinas de aves sobre varias células de mamíferos, como las células dendríticas murinas y las PBMCs humanas [183,204], lo que sugiere que existe cierto grado de solapamiento con las vías y mecanismos inmunitarios en vertebrados. Aunque todavía no se ha confirmado la actividad inmunomoduladora de las β -defensinas en los reptiles, evidencias apuntan a

que la inmunomodulación es una propiedad bien conservada de las β -defensinas de los vertebrados.

En este trabajo hemos utilizado células HBE no estimuladas y estimuladas con poli(I:C) para caracterizar las propiedades inmunomoduladoras de los HDPs de cocodrilianos. La molécula de poli(I:C) es un análogo estructural de ARN viral de doble cadena y actúa como agonista del TLR-3 [205]. Aunque la estimulación del TLR-3 con poli(I:C) podría simular en parte lo ocurrido en una infección viral, este receptor también participa en la interacción con ARNs bacterianos y en la detección de daño celular [206,207]. En este caso, la inducción general de mediadores proinflamatorios es similar a lo observado en una infección bacteriana [181].

Dado que no hay referencias que describan los niveles de β -defensinas en los tejidos de los reptiles y que el modelo celular empleado es humano (fisiológicamente diferente), en este trabajo se utilizó un rango de concentración similar al usado anteriormente para examinar la citotoxicidad y la actividad inmunomoduladora de varios HDPs en este sistema [146,180,208]. No obstante, cabe mencionar que la concentración máxima utilizada aquí es inferior a la que se ha sugerido para las β -defensinas en un escenario terapéutico [209].

Nuestros resultados mostraron que Am23SK puede suprimir la producción de las citoquinas IL-6 (**Figura 18B**) e IL-8 (**Figura 18D**) en células HBE estimuladas con poli(I:C). Aunque este efecto no fue tan pronunciado como con 1018 fue similar al de HBD3, sugiere una actividad anti-inflamatoria moderada de Am23SK en este escenario. Por otro lado, la producción de citocinas en células HBE no estimuladas (**Figura 18A y C**) fue independiente de la concentración de Am23SK o HBD3 utilizada.

El tratamiento con los péptidos de β -defensinas de las células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas y no estimuladas con LPS tampoco afectó de forma evidente a la producción de la citocina proinflamatoria TNF- α ni de la quimiocina MCP-1 (resultados no mostrados). Otros experimentos diseñados para explorar la actividad qui-

miotáctica de AM23SK pudieran ser de ayuda para caracterizar mejor las propiedades inmunomoduladoras de este péptido hacia las células de mamíferos y reptiles.

Estudios recientes han sugerido que el fragmento altamente catiónico de HBD3 podría ser importante para su actividad inmunomoduladora [210,211]. Junto con parte del marco de cisteína, la región C-terminal de las defensinas ha sido identificada mediante análisis *in silico* como parte de un motivo, denominado “núcleo- γ ”, que está presente en los péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas [212]. Las actividades biológicas del núcleo- γ han sido verificadas experimentalmente en HBD3 [213] y en otras defensinas [214], sugiriendo un papel relevante del C-terminal para las actividades biológicas de estas moléculas. Así, la inclusión de residuos en el C-terminal de las crocBDs podría aumentar su actividad biológica en cierta medida. Sin embargo, es probable que este no sea el caso de Am23SK, ya que sólo falta un residuo de Ser en el C-terminal en comparación con la versión parental AmiBD23.

En el caso de las catelicidinas, los estudios de citotoxicidad mostraron que As-CATH8 y Gg-CATH5 fueron moderadamente tóxicas hacia HBE y PBMCs, similar a lo observado para la LL-37; mientras que As-CATH7 y Gg-CATH7 mostraron valores bajos o no detectables (**Figura 22**). Aunque el rango de concentraciones evaluado (2.5, 5 y 10 μM) está por encima de las concentraciones fisiológicas estimadas para LL-37/hCAP-18 en individuos sanos ($\sim 0.3\text{-}1.1 \mu\text{M}$) [215,216], este rango es representativo del rango medio de los valores de MIC y MBIC₉₅ obtenidos para la mayoría de las catelicidinas y es similar a los niveles de LL-37 encontrados en individuos con fibrosis quística ($\sim 7 \mu\text{M}$) [82].

La citotoxicidad observada contrasta con lo descrito para otras catelicidinas de cocodrilianos [12] y de otros reptiles en general [90,217], las cuales presentaron baja o moderada citotoxicidad *in vitro* a concentraciones muy superiores a las de este trabajo. Sin embargo, diferencias en los modelos celulares, duración de los tratamientos y los métodos empleados para cuantificar la citotoxicidad celular dificultan la comparación entre los distintos trabajos. No obstante, es importante mencionar que en modelos más complejos como el modelo de piel o el modelo murino de absceso, no se apreció citotoxicidad aso-

ciada al tratamiento con As-CATH8 y Gg-CATH5 (resultados no mostrados). Estos resultados apoyan un potencial uso tópico de estos péptidos en un escenario terapéutico.

Curiosamente, Gg-CATH7 mostró un potente efecto anti-inflamatorio contra células HBE estimuladas con poli(I:C). El efecto observado fue similar al péptido inmunomodulador 1018 (**Figura 23**), el cual ha demostrado buena actividad inmunomoduladora y anti-infecciosa en diferentes modelos animales [218]. En este sentido, sería interesante explorar la capacidad anti-inflamatoria de Gg-CATH7 en el contexto de una infección bacteriana *in vivo*.

7.4 Actividad *in vivo* de As-CATH8

Las infecciones asociadas a con altas densidades bacterianas (ej. aquellas encontradas en biopelículas y abscesos bacterianos) requieren, por lo general, mayores cantidades de antibióticos para su tratamiento [219], y estos frecuentemente no logran eliminar completamente la carga bacteriana [160]. Adicionalmente, las infecciones con bacterias multiresistentes a antibióticos, como las del grupo ESKAPE [3], incrementan la dificultad de controlar exitosamente la infección. En este contexto, HDPs han mostrado potencial en el tratamiento de este tipo de infecciones [220], constituyen una alternativa a los antibióticos convencionales e incluso pueden ser utilizados en combinación con estos últimos [221].

En este trabajo la capacidad anti-infectiva de As-CATH8 fue evaluada en un modelo murino de absceso bacteriano. En este modelo, la croCATH As-CATH8 fue capaz de disminuir el área de dermonecrosis y la carga bacteriana (**Figura 25**) en abscesos formados por *S. aureus* y *A. baumannii*, y en general mostró mejor potencial que la catelicidina humana LL-37.

Estos resultados se alinean con otros trabajos que han demostrado el potencial de las catelicidinas de reptiles para el tratamiento de infecciones bacterianas. Por ejemplo, las catelicidinas As-CATH2, As-CATH3 y As-CATH5 de *A. sinensis* demostraron potentes propiedades anti-bacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* en un modelo murino de infección

peritoneal [12]. De manera interesante, la capacidad protectora de las catelicidinas de este aligátor contra infecciones bacterianas fue también comprobada con éxito en un modelo invertebrado [94], resaltando las potencialidades terapéuticas de estos péptidos.

Otros trabajos con catelicidinas de reptiles sugieren que la actividad inmunomoduladora de estas moléculas juega un rol importante en su actividad *in vivo* [12,81,91]. Por tanto, la evaluación de As-CATH8 en otros modelo animales donde sea posible la caracterización de un posible efecto inmunomodulador a concentraciones no citotóxicas pudiera brindar más información acerca de su posible mecanismo de acción.

Las catelicidinas de vertebrados son péptidos multifuncionales con un gran potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. De hecho, actualmente existen varios de estos péptidos o derivados de ellos en estudios clínicos, incluyendo a la LL-37 [24]. En este trabajo fueron identificadas y caracterizadas funcionalmente varias catelicidinas de cocodrilianos. En particular, As-CATH8 mostró potente actividad antimicrobiana *in vitro* y fue mejor que la LL-37 contra biopelículas de un asilado clínico resistente a la Metilicidina de *S. aureus* en un modelo epitelial. Este péptido también demostró un potente efecto antibacteriano en un modelo murino de infección bacteriana de alta densidad, reduciendo tanto la carga bacteriana como el tamaño de los abscesos contra dos patógenos del grupo ESKAPE. En general, estos resultados contribuyen a resaltar el potencial terapéutico de las catelicidinas de cocodrilianos para el tratamiento de infecciones bacterianas epiteliales.

8 Conclusiones

Utilizando métodos bioinformáticos, en el presente trabajo se identificaron novedosas secuencias de β -defensinas y catelicidinas de cuatro especies de cocodrilianos (*A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*). Las secuencias identificadas mostraron las características distintivas de cada una de estas familias de HDPs y permitieron estudiar las relaciones evolutivas con otras secuencias de reptiles y vertebrados previamente descritas.

Las secuencias de HDPs fueron analizadas en cuanto a sus propiedades físico-químicas como carga neta, índice de hidrofobicidad y anfipaticidad, y varias secuencias fueron seleccionadas para su síntesis química. En el caso de las β -defensinas, el plegamiento *in vitro* de los péptidos sintéticos resultó en diferencias en cuanto al número de isoformas obtenidas, sugiriendo que la secuencia primaria tiene gran influencia en este proceso y resaltando la necesidad de estudiar más a fondo este fenómeno para obtener mejores resultados en la eficiencia de plegamiento.

Aquí hemos demostrado que las catelicidinas y las variantes de β -defensinas de cocodrilianos son capaces de inhibir tanto el crecimiento planctónico como la formación de biopelículas bacterianas. Además, hemos identificado péptidos novedosos, Am23SK y As-CATH8, con una mayor capacidad anti-infecciosa y una citotoxicidad similar a sus contrapartes en humanos. En general, estos estudios resaltan la capacidad terapéutica de estos péptidos y arrojan nueva luz sobre el papel biológico de β -defensinas y catelicidinas en la inmunidad de los cocodrilianos.

9 Bibliografía

- [1] J. O'Neill, Review on antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014.
- [2] A.R. Mahoney, M.M. Safaee, W.M. Wuest, A.L. Furst, The silent pandemic: emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2, *IScience*. 24 (2021) 102304. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102304>.
- [3] D.M.P. De Oliveira, B.M. Forde, T.J. Kidd, P.N.A. Harris, M.A. Schembri, S.A. Beatson, D.L. Paterson, M.J. Walker, Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens, *Clin Microbiol Rev*. 33 (2020) e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.
- [4] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outterson, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, WHO Pathogens Priority List Working Group, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *Lancet Infect Dis*. 18 (2018) 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- [5] M. Dostert, M.J. Trimble, R.E.W. Hancock, Antibiofilm peptides: overcoming biofilm-related treatment failure, *RSC Adv*. 11 (2021) 2718–2728. <https://doi.org/10.1039/D0RA09739J>.
- [6] H. Wolfmeier, D. Pletzer, S.C. Mansour, R.E.W. Hancock, New perspectives in biofilm eradication, *ACS Infect Dis*. 4 (2018) 93–106. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00170>.
- [7] M.A. Alford, B. Baquir, F.L. Santana, E.F. Haney, R.E.W. Hancock, Cathelicidin host defense peptides and inflammatory signaling: striking a balance, *Front Microbiol*. 11 (2020) 1902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01902>.
- [8] B.P. Lazzaro, M. Zasloff, J. Rolff, Antimicrobial peptides: application informed by evolution, *Science*. 368 (2020) eaau5480. <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>.
- [9] G. Grigg, D. Kirshner, *Biology and evolution of crocodylians*, CSIRO Publishing, 2015. <https://www.publish.csiro.au/book/7185> (accessed May 26, 2020).
- [10] G.J.W. Webb, H. Messel, Abnormalities and injuries in the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*, *Wildl. Res*. 4 (1977) 311–319. <https://doi.org/10.1071/WR9770311>.

- [11] S.M. Barksdale, E.J. Hrifko, M.L. van Hoek, Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, *Dev. Comp. Immunol.* 70 (2017) 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.011>.
- [12] Y. Chen, S. Cai, X. Qiao, M. Wu, Z. Guo, R. Wang, Y.-Q. Kuang, H. Yu, Y. Wang, As-CATH1-6, novel cathelicidins with potent antimicrobial and immunomodulatory properties from *Alligator sinensis*, play pivotal roles in host antimicrobial immune responses, *Biochem. J.* 474 (2017) 2861–2885. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170334>.
- [13] K.-Y. Tang, X. Wang, Q.-H. Wan, S.-G. Fang, A crucial role of paralogous β -defensin genes in the Chinese alligator innate immune system revealed by the first determination of a Crocodilia defensin cluster, *Dev. Comp. Immunol.* 81 (2017) 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.018>.
- [14] J.A. St John, E.L. Braun, S.R. Isberg, L.G. Miles, A.Y. Chong, J. Gongora, P. Dalzell, C. Moran, B. Bed'hom, A. Abzhanov, S.C. Burgess, A.M. Cooksey, T.A. Castoe, N.G. Crawford, L.D. Densmore, J.C. Drew, S.V. Edwards, B.C. Faircloth, M.K. Fujita, M.J. Greenwold, F.G. Hoffmann, J.M. Howard, T. Iguchi, D.E. Janes, S.Y. Khan, S. Kohno, A.J. de Koning, S.L. Lance, F.M. McCarthy, J.E. McCormack, M.E. Merchant, D.G. Peterson, D.D. Pollock, N. Pourmand, B.J. Raney, K.A. Roessler, J.R. Sanford, R.H. Sawyer, C.J. Schmidt, E.W. Triplett, T.D. Tuberville, M. Venegas-Anaya, J.T. Howard, E.D. Jarvis, L.J. Guillette, T.C. Glenn, R.E. Green, D.A. Ray, Sequencing three crocodylian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes, *Genome Biol.* 13 (2012) 415. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-1-415>.
- [15] Q.-H. Wan, S.-K. Pan, L. Hu, Y. Zhu, P.-W. Xu, J.-Q. Xia, H. Chen, G.-Y. He, J. He, X.-W. Ni, H.-L. Hou, S.-G. Liao, H.-Q. Yang, Y. Chen, S.-K. Gao, Y.-F. Ge, C.-C. Cao, P.-F. Li, L.-M. Fang, L. Liao, S. Zhang, M.-Z. Wang, W. Dong, S.-G. Fang, Genome analysis and signature discovery for diving and sensory properties of the endangered Chinese alligator, *Cell Res.* 23 (2013) 1091–1105. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.104>.
- [16] D.J. Lynn, R. Higgs, S. Gaines, J. Tierney, T. James, A.T. Lloyd, M. a Fares, G. Mulcahy, C. O'Farrelly, Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken, *Immunogenetics.* 56 (2004) 170–7. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0675-0>.

- [17] G.M. Morrison, C.A.M. Semple, F.M. Kilanowski, R.E. Hill, J.R. Dorin, Signal sequence conservation and mature peptide divergence within subgroups of the murine β -defensin gene family, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 460–470. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg060>.
- [18] L. Dalla Valle, F. Benato, S. Maistro, S. Quinzani, L. Alibardi, Bioinformatic and molecular characterization of β -defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*, *Dev. Comp. Immunol.* 36 (2012) 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.004>.
- [19] G. Maróti, A. Kereszt, E. Kondorosi, P. Mergaert, Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals, *Res. Microbiol.* 162 (2011) 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.005>.
- [20] K.M. Yatim, F.G. Lakkis, A brief journey through the immune system, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (2015) 1274–81. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>.
- [21] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, Cellular and molecular immunology E-book, Elsevier Health Sciences, 2014.
- [22] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev.* 55 (2003) 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- [23] R.E.W. Hancock, M.A. Alford, E.F. Haney, Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities, *Nat Rev Microbiol.* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00585-w>.
- [24] N. Mookherjee, M.A. Anderson, H.P. Haagsman, D.J. Davidson, Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential, *Nat. Rev. Drug Discov.* 19 (2020) 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>.
- [25] R.E.W. Hancock, M.G. Scott, The role of antimicrobial peptides in animal defenses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856>.
- [26] R.E.W. Hancock, E.F. Haney, E.E. Gill, The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 321–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>.
- [27] M. Dostert, C.R. Belanger, R.E.W. Hancock, Design and assessment of anti-biofilm peptides: steps toward clinical application, *J. Innate Immun.* 11 (2019) 193–204. <https://doi.org/10.1159/000491497>.
- [28] A.L. Tornesello, A. Borrelli, L. Buonaguro, F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello, Antimicrobial peptides as anticancer agents: functional properties and biological

- activities, *Molecules*. 25 (2020) E2850.
<https://doi.org/10.3390/molecules25122850>.
- [29] R.D.O. Dias, O.L. Franco, Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: from a common fold to antibacterial activity, *Peptides*. 72 (2015) 64–72.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.017>.
- [30] D.J. Schibli, H.N. Hunter, V. Aseyev, T.D. Starner, J.M. Wiencek, P.B. McCray, B.F. Tack, H.J. Vogel, The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8279–89.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M108830200>.
- [31] T.M.A. Shafee, F.T. Lay, M.D. Hulett, M.A. Anderson, The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 2345–2356. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>.
- [32] T.M.A. Shafee, F.T. Lay, T.K. Phan, M.A. Anderson, M.D. Hulett, Convergent evolution of defensin sequence, structure and function, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>.
- [33] M.L. Mitchell, T. Shafee, A.T. Papenfuss, R.S. Norton, Evolution of cnidarian *trans*-defensins: sequence, structure and exploration of chemical space, *Proteins*. 87 (2019) 551–560. <https://doi.org/10.1002/prot.25679>.
- [34] W. Zhou, B. Gao, S. Zhu, Did *cis*- and *trans*-defensins derive from a common ancestor?, *Immunogenetics*. 71 (2019) 61–69. <https://doi.org/10.1007/s00251-018-1086-y>.
- [35] T. Ganz, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 710–20. <https://doi.org/10.1038/nri1180>.
- [36] L. Liu, C. Zhao, H.H.Q. Heng, T. Ganz, The human β -defensin-1 and α -defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry, *Genomics*. 43 (1997) 316–320.
<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4801>.
- [37] M.J. Benton, P.C.J. Donoghue, Paleontological evidence to date the tree of life, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 26–53. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl150>.
- [38] R.I. Lehrer, W. Lu, α -defensins in human innate immunity, *Immunol. Rev.* 245 (2012) 84–112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x>.
- [39] R.I. Lehrer, Primate defensins, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 727–738.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro976>.

- [40] T.X. Nguyen, A.M. Cole, R.I. Lehrer, Evolution of primate θ -defensins: a serpentine path to a sweet tooth, *Peptides*. 24 (2003) 1647–1654.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.07.023>.
- [41] S. Zhu, B. Gao, Evolutionary origin of β -defensins, *Dev. Comp. Immunol.* 39 (2013) 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.011>.
- [42] J. Tu, D. Li, Q. Li, L. Zhang, Q. Zhu, U. Gaur, X. Fan, H. Xu, Y. Yao, X. Zhao, M. Yang, Molecular evolutionary analysis of β -defensin peptides in vertebrates, *Evol. Bioinform. Online*. 11 (2015) 105–114. <https://doi.org/10.4137/EBO.S25580>.
- [43] A. Tassanakajon, K. Somboonwiwat, P. Amparyup, Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates, *Dev. Comp. Immunol.* 48 (2015) 324–41. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.020>.
- [44] B.C. Schutte, J.P. Mitros, J.A. Bartlett, J.D. Walters, H.P. Jia, M.J. Welsh, T.L. Casavant, P.B. McCray, Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 2129–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.042692699>.
- [45] M.-K. Choi, M.T. Le, D.T. Nguyen, H. Choi, W. Kim, J.-H. Kim, J. Chun, J. Hyeon, K. Seo, C. Park, Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -defensin genes, *BMC Genet.* 13 (2012) 98. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-98>.
- [46] A.A. Patil, Y. Cai, Y. Sang, F. Blecha, G. Zhang, Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract, *Physiol. Genomics*. 23 (2005) 5–17. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00104.2005>.
- [47] Z.-Y. Zhang, H.-M. Zhang, D.-S. Li, T.-Y. Xiong, S.-G. Fang, Characterization of the β -defensin genes in giant panda, *Sci. Rep.* 8 (2018) 12308. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29898-2>.
- [48] Y. Xiao, A.L. Hughes, J. Ando, Y. Matsuda, J.-F. Cheng, D. Skinner-Noble, G. Zhang, A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins, *BMC Genom.* 5 (2004) 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-56>.
- [49] Y. Cheng, M.D. Prickett, W. Gutowska, R. Kuo, K. Belov, D.W. Burt, Evolution of the avian β -defensin and cathelicidin genes, *BMC Evol. Biol.* 15 (2015) 188. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0465-3>.

- [50] M.L. van Hoek, M.D. Prickett, R.E. Settlage, L. Kang, P. Michalak, K.A. Vliet, B.M. Bishop, The Komodo dragon (*Varanus komodoensis*) genome and identification of innate immunity genes and clusters, *BMC Genom.* 20 (2019) 684. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6029-y>.
- [51] H. Yu, H. Wang, X. Liu, L. Feng, X. Qiao, S. Cai, N. Shi, Y. Wang, Identification, eukaryotic expression and structure and function characterizations of β -defensin like homologues from *Pelodiscus sinensis*, *Dev. Comp. Immunol.* 68 (2017) 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.11.020>.
- [52] M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 551–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132427>.
- [53] D. Michaelson, J. Rayner, M. Couto, T. Ganz, Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity?, *J. Leukoc. Biol.* 51 (1992) 634–9.
- [54] L. Liu, T. Ganz, The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting, *Blood.* 85 (1995) 1095–1103.
- [55] Z. Wu, A. Prah, R. Powell, B. Ericksen, J. Lubkowski, W. Lu, From pro defensins to defensins: synthesis and characterization of human neutrophil pro α -defensin-1 and its mature domain, *J. Pept. Res.* 62 (2003) 53–62. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2003.00068.x>.
- [56] P.G. Correa, N. Oguiura, Phylogenetic analysis of β -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes, *Toxicon.* 69 (2013) 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.013>.
- [57] Y.S. de Oliveira, P.G. Corrêa, N. Oguiura, β -defensin genes of the Colubridae snakes *Phalotris mertensi*, *Thamnodynastes hypoconia*, and *T. strigatus*, *Toxicon.* 146 (2018) 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.048>.
- [58] R.I. Lehrer, T. Ganz, Defensins of vertebrate animals, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 96–102. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X).
- [59] C. Thouzeau, Y. Le Maho, G. Froget, L. Sabatier, C. Le Bohec, J.A. Hoffmann, P. Bulet, Spheniscins, avian β -defensins in preserved stomach contents of the King penguin, *Aptenodytes patagonicus*, *J Biol Chem.* 278 (2003) 51053–51058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306839200>.
- [60] N. Guyot, H. Meudal, S. Trapp, S. Lochmann, A. Silvestre, G. Jousset, V. Labas, P. Reverdiau, K. Loth, V. Hervé, V. Aucagne, A.F. Delmas, S. Rehault-Godbert, C.

- Landon, Structure, function, and evolution of Gga-AvBD11, the archetype of the structural avian-double- β -defensin family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (2020) 337–345. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912941117>.
- [61] V. Hervé-Grépinet, S. Réhault-Godbert, V. Labas, T. Magallon, C. Derache, M. Lavergne, J. Gautron, A.-C. Lalmanach, Y. Nys, Purification and characterization of avian β -defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 4401–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00204-10>.
- [62] L. Wei, H. Che, Y. Han, J. Lv, L. Mu, L. Lv, J. Wu, H. Yang, The first anionic defensin from amphibians, *Amino Acids.* 47 (2015) 1301–8. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1963-8>.
- [63] K.G. Meade, C. O’Farrelly, β -defensins: farming the microbiome for homeostasis and health, *Front. Immunol.* 9 (2018) 3072. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072>.
- [64] M. Suarez-Carmona, P. Hubert, P. Delvenne, M. Herfs, Defensins: “simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules?, *Cytokine Growth Factor Rev.* 26 (2015) 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.12.005>.
- [65] T. Ganz, M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, R.I. Lehrer, Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J. Clin. Investig.* 76 (1985) 1427–35. <https://doi.org/10.1172/JCI112120>.
- [66] C. Stegemann, A. Kolobov, Y.F. Leonova, D. Knappe, O. Shamova, T.V. Ovchinnikova, V.N. Kokryakov, R. Hoffmann, Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first β -defensin from leukocytes of reptiles, *Proteomics.* 9 (2009) 1364–73. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800569>.
- [67] L. Alibardi, Immunocytochemical detection of β -defensins and cathelicidins in the secretory granules of the tongue in the lizard *Anolis carolinensis*, *Acta Histochem.* 117 (2015) 223–7. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.004>.
- [68] L. Alibardi, Granulocytes of reptilian sauropsids contain β -defensin-like peptides: a comparative ultrastructural survey, *J. Morphol.* 274 (2013) 877–86. <https://doi.org/10.1002/jmor.20143>.
- [69] A. Lorenzo, Immunolocalization of a β -defensin (Tu-BD-1) in the skin and subdermal granulocytes of turtles indicate the presence of an antimicrobial skin barrier, *Ann. Anat.* 195 (2013) 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.07.001>.
- [70] L. Alibardi, Ultrastructural immunolocalization of β -defensin-27 in granulocytes of the dermis and wound epidermis of lizard suggests they contribute to the anti-

- microbial skin barrier, *Anat. Cell Biol.* 46 (2013) 246–53.
<https://doi.org/10.5115/acb.2013.46.4.246>.
- [71] L. Alibardi, Histochemical, biochemical and cell biological aspects of tail regeneration in lizard, an amniote model for studies on tissue regeneration, *Prog Histochem Cytochem.* 48 (2014) 143–244.
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2013.12.001>.
- [72] L. Alibardi, A. Celeghin, L. Dalla Valle, Wounding in lizards results in the release of β -defensins at the wound site and formation of an antimicrobial barrier, *Dev. Comp. Immunol.* 36 (2012) 557–65. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.09.012>.
- [73] L. Alibardi, Review: Biological and molecular differences between tail regeneration and limb scarring in lizard: an inspiring model addressing limb regeneration in amniotes, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 328 (2017) 493–514.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22754>.
- [74] J.R. Hasenstein, G. Zhang, S.J. Lamont, Analyses of five gallinacin genes and the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis response in poultry, *Infect. Immun.* 74 (2006) 3375–3380. <https://doi.org/10.1128/IAI.00027-06>.
- [75] M. Zanetti, Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 39–48. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403147>.
- [76] M. Zanetti, The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals, *Curr Issues Mol Biol.* 7 (2005) 179–196.
- [77] B. Ramanathan, E.G. Davis, C.R. Ross, F. Blecha, Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity, *Microb Infect.* 4 (2002) 361–72. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01549-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01549-6).
- [78] J.A. Masso-Silva, G. Diamond, Antimicrobial peptides from fish, *Pharmaceuticals.* 7 (2014) 265–310. <https://doi.org/10.3390/ph7030265>.
- [79] R.-H. Qi, Y. Chen, Z.-L. Guo, F. Zhang, Z. Fang, K. Huang, H.-N. Yu, Y.-P. Wang, Identification and characterization of two novel cathelicidins from the frog *Odorrana livida*, *Zool. Res.* 40 (2019) 94–101.
<https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.062>.
- [80] L. Dalla Valle, F. Benato, M.C. Paccanaro, L. Alibardi, Bioinformatic and molecular characterization of cathelicidin-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis* (Reptilia: Lepidosauria: Iguanidae), *Ital. J. Zool.* 80 (2013) 177–186.
<https://doi.org/10.1080/11250003.2013.783632>.

- [81] N. Shi, S. Cai, J. Gao, X. Qiao, H. Yang, Y. Wang, H. Yu, Roles of polymorphic cathelicidins in innate immunity of soft-shell turtle, *Pelodiscus sinensis*, *Dev. Comp. Immunol.* 92 (2019) 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.010>.
- [82] R.M. van Harten, E. van Woudenberg, A. van Dijk, H.P. Haagsman, Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials, *Vaccines.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3390/vaccines6030063>.
- [83] E. de Barros, R.M. Gonçalves, M.H. Cardoso, N.C. Santos, O.L. Franco, E.S. Cândido, Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 1415. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01415>.
- [84] A. van Dijk, E.M. Molhoek, F.J. Bikker, P.-L. Yu, E.J.A. Veldhuizen, H.P. Haagsman, Avian cathelicidins: paradigms for the development of anti-infectives, *Vet. Microbiol.* 153 (2011) 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.028>.
- [85] Y. Xiao, Y. Cai, Y.R. Bommineni, S.C. Fernando, O. Prakash, S.E. Gilliland, G. Zhang, Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2858–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507180200>.
- [86] X.J. Lu, J. Chen, Z.A. Huang, Y.H. Shi, J.N. Lv, Identification and characterization of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis*, *Fish Shellfish Immunol.* 31 (2011) 52–7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.005>.
- [87] H. Zhao, T.-X. Gan, X.-D. Liu, Y. Jin, W.-H. Lee, J.-H. Shen, Y. Zhang, Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes, *Peptides.* 29 (2008) 1685–91. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.008>.
- [88] X. Hao, H. Yang, L. Wei, S. Yang, W. Zhu, D. Ma, H. Yu, R. Lai, Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate, *Amino Acids.* 43 (2012) 677–85. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1116-7>.
- [89] L. Mu, L. Zhou, J. Yang, L. Zhuang, J. Tang, T. Liu, J. Wu, H. Yang, The first identified cathelicidin from tree frogs possesses anti-inflammatory and partial LPS neutralization activities, *Amino Acids.* 49 (2017) 1571–1585. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2449-7>.
- [90] X. Qiao, H. Yang, J. Gao, F. Zhang, P. Chu, Y. Yang, M. Zhang, Y. Wang, H. Yu, Diversity, immunoregulatory action and structure-activity relationship of green sea turtle cathelicidins, *Dev. Comp. Immunol.* 98 (2019) 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.05.005>.

- [91] S. Cai, X. Qiao, L. Feng, N. Shi, H. Wang, H. Yang, Z. Guo, M. Wang, Y. Chen, Y. Wang, H. Yu, Python cathelicidin CATHPb1 protects against multidrug-resistant staphylococcal infections by antimicrobial-immunomodulatory duality, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 2075–2086. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00036>.
- [92] S. Chen, Z. Lu, F. Wang, Y. Wang, Cathelicidin-WA polarizes *E. coli* K88-induced M1 macrophage to M2-like macrophage in RAW264.7 cells, *Int. Immunopharmacol.* 54 (2018) 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.013>.
- [93] H. Yi, L. Zhang, Z. Gan, H. Xiong, C. Yu, H. Du, Y. Wang, High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25679. <https://doi.org/10.1038/srep25679>.
- [94] Z. Guo, X. Qiao, R. Cheng, N. Shi, A. Wang, T. Feng, Y. Chen, F. Zhang, H. Yu, Y. Wang, As-CATH4 and 5, two vertebrate-derived natural host defense peptides, enhance the immuno-resistance efficiency against bacterial infections in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, *Fish Shellfish Immunol.* 71 (2017) 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.015>.
- [95] Q. Xie, Y. Liu, F. Luo, Q. Yi, Y. Wang, L. Deng, J. Dai, T. Feng, Antiviral activity of cathelicidin 5, a peptide from *Alligator sinensis*, against WSSV in caridean shrimp *Exopalaemon modestus*, *Fish Shellfish Immunol.* 93 (2019) 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.043>.
- [96] E.F. Haney, S.K. Straus, R.E.W. Hancock, Reassessing the host defense peptide landscape, *Front. Chem.* 7 (2019) 43. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00043>.
- [97] J. Lee, S.W. Jung, A.E. Cho, Molecular insights into the adsorption mechanism of human β -defensin-3 on bacterial membranes, *Langmuir.* 32 (2016) 1782–1790. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04113>.
- [98] F. Morgera, N. Antcheva, S. Pacor, L. Quaroni, F. Berti, L. Vaccari, A. Tossi, Structuring and interactions of human β -defensins 2 and 3 with model membranes, *J Pept Sci.* 14 (2008) 518–523. <https://doi.org/10.1002/psc.981>.
- [99] V. Sass, T. Schneider, M. Wilmes, C. Körner, A. Tossi, N. Novikova, O. Shamova, H.-G. Sahl, Human β -defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci, *Infect Immun.* 78 (2010) 2793–2800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09>.
- [100] E. de Leeuw, C. Li, P. Zeng, C. Li, M. Diepeveen-de Buin, W.-Y. Lu, E. Breukink, W. Lu, Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor

- lipid II, FEBS Lett. 584 (2010) 1543–1548.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>.
- [101] B.L. Kagan, M.E. Selsted, T. Ganz, R.I. Lehrer, Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes, Proc Natl Acad Sci U S A. 87 (1990) 210–214.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.210>.
- [102] T. Schneider, T. Kruse, R. Wimmer, I. Wiedemann, V. Sass, U. Pag, A. Jansen, A.K. Nielsen, P.H. Mygind, D.S. Raventós, S. Neve, B. Ravn, A.M.J.J. Bonvin, L. De Maria, A.S. Andersen, L.K. Gammelgaard, H.-G. Sahl, H.-H. Kristensen, Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II, Science. 328 (2010) 1168–1172. <https://doi.org/10.1126/science.1185723>.
- [103] C. Liu, B. Shan, J. Qi, Y. Ma, Systemic responses of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* following exposure to the antimicrobial peptide cathelicidin-BF imply multiple intracellular targets, Front. Cell. Infect. Microbiol. (2017). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00466>.
- [104] D. Xhindoli, S. Pacor, M. Benincasa, M. Scocchi, R. Gennaro, A. Tossi, The human cathelicidin LL-37—A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator, Biochim Biophys Acta. 1858 (2016) 546–566.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.003>.
- [105] UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, Nucleic Acids Res. 49 (2021) D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- [106] E.W. Sayers, M. Cavanaugh, K. Clark, J. Ostell, K.D. Pruitt, I. Karsch-Mizrachi, GenBank, Nucleic Acids Res. 48 (2020) D84–D86.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz956>.
- [107] S. Gull, F.U.A.A. Minhas, AMPO: species-specific prediction of anti-microbial peptides using zero and few shot learning, IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform. PP (2020). <https://doi.org/10.1109/TCBB.2020.2999399>.
- [108] M. Burdukiewicz, K. Sidorczuk, D. Rafacz, F. Pietluch, J. Chilimoniuk, S. Rödiger, P. Gagat, Proteomic screening for prediction and design of antimicrobial peptides with AmpGram, Int J Mol Sci. 21 (2020) E4310.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124310>.
- [109] M.N. Gabere, W.S. Noble, Empirical comparison of web-based antimicrobial peptide prediction tools, Bioinformatics. 33 (2017) 1921–1929.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx081>.

- [110] L.C.H.W. Fingerhut, D.J. Miller, J.M. Strugnell, N.L. Daly, I.R. Cooke, ampir: an R package for fast genome-wide prediction of antimicrobial peptides, *Bioinformatics*. 36 (2021) 5262–5263. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa653>.
- [111] W.F. Porto, A.S. Pires, O.L. Franco, Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.02.001>.
- [112] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- [113] J. Mistry, R.D. Finn, S.R. Eddy, A. Bateman, M. Punta, Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) e121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt263>.
- [114] S.R. Eddy, What is a hidden Markov model?, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1315–6. <https://doi.org/10.1038/nbt1004-1315>.
- [115] S.J. Hitt, B.M. Bishop, M.L. van Hoek, Komodo-dragon cathelicidin-inspired peptides are antibacterial against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *J Med Microbiol.* 69 (2020) 1262–1272. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001260>.
- [116] D. Kim, N. Soundrarajan, J. Lee, H.-S. Cho, M. Choi, S.-Y. Cha, B. Ahn, H. Jeon, M.T. Le, H. Song, J.-H. Kim, C. Park, Genomewide analysis of the antimicrobial peptides in *Python bivittatus* and characterization of cathelicidins with potent antimicrobial activity and low cytotoxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.00530-17>.
- [117] F. Benato, L. Dalla Valle, T. Skobo, L. Alibardi, Biomolecular identification of β -defensin-like peptides from the skin of the soft-shelled turtle *Apalone spinifera*, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 320 (2013) 210–7. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22495>.
- [118] J. Köster, S. Rahmann, Snakemake - a scalable bioinformatics workflow engine, *Bioinformatics*. 28 (2012) 2520–2522. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts480>.
- [119] K. Katoh, D.M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

- [120] A. Larsson, AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, *Bioinformatics*. 30 (2014) 3276–3278.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.
- [121] G.S.C. Slater, E. Birney, Automated generation of heuristics for biological sequence comparison, *BMC Bioinformatics*. 6 (2005) 31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-31>.
- [122] O. Keller, F. Odronitz, M. Stanke, M. Kollmar, S. Waack, Scipio: Using protein sequences to determine the precise exon/intron structures of genes and their orthologs in closely related species, *BMC Bioinform.* (2008).
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-278>.
- [123] J.J. Almagro Armenteros, K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nat. Biotechnol.* (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- [124] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (2010) 307–321.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- [125] D. Darriba, G.L. Taboada, R. Doallo, D. Posada, ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution, *Bioinformatics*. 27 (2011) 1164–1165.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>.
- [126] I. Letunic, P. Bork, Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) W256–W259.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- [127] D. Osorio, P. Rondon-Villarreal, R. Torres, Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides, *R J.* 7 (2015) 4–14. <https://doi.org/10.32614/RJ-2015-001>.
- [128] R Core Team, R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. <https://www.R-project.org/>.
- [129] RStudio Team, Rstudio: integrated development environment for R, Boston, MA, 2021. <http://www.rstudio.com/>.
- [130] B. Bjellqvist, G.J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.C. Sanchez, S. Frutiger, D. Hochstrasser, The focusing positions of polypeptides in immobilized

- pH gradients can be predicted from their amino acid sequences, *Electrophoresis*. 14 (1993) 1023–1031. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401163>.
- [131] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
- [132] A. Kassambara, *Practical guide to cluster analysis in R: unsupervised machine learning*, STHDA, 2017.
- [133] J. Yang, Y. Zhang, I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W174-181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
- [134] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, *Bioinformatics*. 29 (2013) 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>.
- [135] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [136] A. Stamatakis, RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies, *Bioinformatics*. 30 (2014) 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- [137] D. Darriba, D. Posada, A.M. Kozlov, A. Stamatakis, B. Morel, T. Flouri, ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of dna and protein evolutionary models, *Mol Biol Evol.* 37 (2020) 291–294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>.
- [138] L.-G. Wang, T.T.-Y. Lam, S. Xu, Z. Dai, L. Zhou, T. Feng, P. Guo, C.W. Dunn, B.R. Jones, T. Bradley, H. Zhu, Y. Guan, Y. Jiang, G. Yu, Treeio: an R package for phylogenetic tree input and output with richly annotated and associated data, *Mol Biol Evol.* 37 (2020) 599–603. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz240>.
- [139] G. Yu, Using ggtree to visualize data on tree-like structures, *Curr Protoc Bioinformatics*. 69 (2020) e96. <https://doi.org/10.1002/cpbi.96>.

- [140] A.T. Müller, G. Gabernet, J.A. Hiss, G. Schneider, modAMP: Python for antimicrobial peptides, *Bioinformatics*. 33 (2017) 2753–2755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx285>.
- [141] D.A. Phoenix, F. Harris, The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures (review), *Mol Membr Biol*. 19 (2002) 1–10. <https://doi.org/10.1080/09687680110103631>.
- [142] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*. (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [143] M. Mirdita, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, ColabFold - Making protein folding accessible to all, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.15.456425>.
- [144] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, E.C. Meng, G.S. Couch, T.I. Croll, J.H. Morris, T.E. Ferrin, UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers, *Protein Sci*. 30 (2021) 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
- [145] L. Corrales-Garcia, E. Ortiz, J. Castañeda-Delgado, B. Rivas-Santiago, G. Corzo, Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*, *Protein Expr. Purif*. 89 (2013) 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>.
- [146] E.F. Haney, B.C. Wu, K. Lee, A.L. Hilchie, R.E.W. Hancock, Aggregation and its influence on the immunomodulatory activity of synthetic innate defense regulator peptides, *Cell Chem. Biol*. 24 (2017) 969-980.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.07.010>.
- [147] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods Mol Biol*. 112 (1999) 531–552. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>.
- [148] M. Boniotto, N. Antcheva, I. Zelezetsky, A. Tossi, V. Palumbo, M.V. Verga Falzacappa, S. Sgubin, L. Braida, A. Amoroso, S. Crovella, A study of host defence

- peptide β -defensin 3 in primates, *Biochem. J.* 374 (2003) 707–714.
<https://doi.org/10.1042/BJ20030528>.
- [149] N. Raheem, P. Kumar, E. Lee, J.T.J. Cheng, R.E.W. Hancock, S.K. Straus, Insights into the mechanism of action of two analogues of aurein 2.2, *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1862 (2020) 183262.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183262>.
- [150] C. Louis-Jeune, M.A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra, *Proteins.* 80 (2012) 374–381. <https://doi.org/10.1002/prot.23188>.
- [151] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections—los angeles county, california, 2002-2003, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 52 (2003) 88.
- [152] L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, R.E. Hancock, Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother.* 44 (2000) 3317–3321.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.12.3317-3321.2000>.
- [153] A.C. Jacobs, M.G. Thompson, C.C. Black, J.L. Kessler, L.P. Clark, C.N. McQueary, H.Y. Gancz, B.W. Corey, J.K. Moon, Y. Si, M.T. Owen, J.D. Hallock, Y.I. Kwak, A. Summers, C.Z. Li, D.A. Rasko, W.F. Penwell, C.L. Honnold, M.C. Wise, P.E. Waterman, E.P. Lesho, R.L. Stewart, L.A. Actis, T.J. Palys, D.W. Craft, D.V. Zurawski, Ab5075, a highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments, *MBio.* 5 (2014) e01076-01014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01076-14>.
- [154] B. Marchou, F. Bellido, R. Charnas, C. Lucaín, J.C. Pechère, Contribution of β -lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae*, *Antimicrob Agents Chemother.* 31 (1987) 1589–1595.
<https://doi.org/10.1128/aac.31.10.1589>.
- [155] S. Behroozian, S.L. Svensson, J. Davies, Kisameet clay exhibits potent antibacterial activity against the ESKAPE pathogens, *MBio.* 7 (2016) e01842-01815.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01842-15>.
- [156] D.C. Gruenert, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe, Culture and transformation of human airway epithelial cells, *Am J Physiol.* 268 (1995) L347-360.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.3.L347>.

- [157] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat Protoc.* 3 (2008) 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- [158] E.F. Haney, M.J. Trimble, R.E.W. Hancock, Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria, *Nat Protoc.* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00515-3>.
- [159] B.C. Wu, E.F. Haney, N. Akhoundsadegh, D. Pletzer, M.J. Trimble, A.E. Adriaans, P.H. Nibbering, R.E.W. Hancock, Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents, *NPJ Biofilms Microbiomes.* 7 (2021) 8. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00182-4>.
- [160] D. Pletzer, S.C. Mansour, K. Wuerth, N. Rahanjam, R.E.W. Hancock, New mouse model for chronic infections by gram-negative bacteria enabling the study of anti-infective efficacy and host-microbe interactions, *MBio.* 8 (2017) e00140-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00140-17>.
- [161] A. Kassambara, *Practical statistics in R for comparing groups: numerical variables*, Independently Published, 2019.
- [162] F.L. Santana, K. Estrada, E. Ortiz, G. Corzo, Reptilian β -defensins: expanding the repertoire of known crocodylian peptides, *Peptides.* 136 (2021) 170473. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170473>.
- [163] P. Meng, S. Yang, C. Shen, K. Jiang, M. Rong, R. Lai, The first salamander defensin antimicrobial peptide, *PLoS One.* 8 (2013) 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083044>.
- [164] C. Derache, V. Labas, V. Aucagne, H. Meudal, C. Landon, A.F. Delmas, T. Magallon, A.-C. Lalmanach, Primary structure and antibacterial activity of chicken bone marrow-derived β -defensins, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 4647–4655. <https://doi.org/10.1128/AAC.00301-09>.
- [165] F.L. Santana, I. Arenas, E.F. Haney, K. Estrada, R.E.W. Hancock, G. Corzo, Identification of a crocodylian β -defensin variant from *Alligator mississippiensis* with antimicrobial and antibiofilm activity, *Peptides.* 141 (2021) 170549. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170549>.
- [166] E. Klüver, A. Schulz, W.-G. Forssmann, K. Adermann, Chemical synthesis of β -defensins and LEAP-1/hepcidin, *J. Pept. Sci.* 59 (2002) 241–248. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2002.00980.x>.

- [167] Z. Wu, D.M. Hoover, D. Yang, C. Boulègue, F. Santamaria, J.J. Oppenheim, J. Lubkowski, W. Lu, Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 8880–8885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533186100>.
- [168] H. Sharma, R. Nagaraj, Human β -defensin 4 with non-native disulfide bridges exhibit antimicrobial activity, *PLoS One*. 10 (2015) e0119525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119525>.
- [169] N. Dong, Q.-Q. Ma, A.-S. Shan, L. Wang, W.-Y. Sun, Y.-Z. Li, Influence of truncation of avian β -defensin-4 on biological activity and peptide-membrane interaction, *Protein Pept Lett.* 19 (2012) 430–438. <https://doi.org/10.2174/092986612799789323>.
- [170] H.-G. Sahl, U. Pag, S. Bonness, S. Wagner, N. Antcheva, A. Tossi, Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity, *J Leukoc Biol.* 77 (2005) 466–475. <https://doi.org/10.1189/jlb.0804452>.
- [171] S. Crovella, N. Antcheva, I. Zelezetsky, M. Boniotto, S. Pacor, M.V. Verga Falzacappa, A. Tossi, Primate β -defensins—structure, function and evolution, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005) 7–21.
- [172] N. Antcheva, F. Morgera, L. Creatti, L. Vaccari, U. Pag, S. Pacor, Y. Shai, H.-G. Sahl, A. Tossi, Artificial β -defensin based on a minimal defensin template, *Biochem J.* 421 (2009) 435–447. <https://doi.org/10.1042/BJ20082242>.
- [173] H.K. de Jong, C.M. Parry, T. van der Poll, W.J. Wiersinga, Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>.
- [174] A.S. Lee, H. de Lencastre, J. Garau, J. Kluytmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, S. Harbarth, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat Rev Dis Primers.* 4 (2018) 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.
- [175] L.B. Rice, Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE, *J Infect Dis.* 197 (2008) 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>.
- [176] J. Nevarez, Crocodilian differential diagnosis, *Reptile Medicine and Surgery.* (2006) 705. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50045-6>.
- [177] M.R. Ranieri, C.B. Whitchurch, L.L. Burrows, Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials, *Curr Opin Microbiol.* 45 (2018) 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>.

- [178] E. Peeters, H.J. Nelis, T. Coenye, Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates, *J Microbiol Methods*. 72 (2008) 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>.
- [179] A.L. Cozens, M.J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe, D.C. Gruenert, CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol*. 10 (1994) 38–47. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.1.7507342>.
- [180] D.M.E. Bowdish, D.J. Davidson, M.G. Scott, R.E.W. Hancock, Immunomodulatory activities of small host defense peptides, *Antimicrob Agents Chemother*. 49 (2005) 1727–1732. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1727-1732.2005>.
- [181] K.C. Wuerth, R. Falsafi, R.E.W. Hancock, Synthetic host defense peptide IDR-1002 reduces inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *PLoS One*. 12 (2017) e0187565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187565>.
- [182] D.M. Hoover, Z. Wu, K. Tucker, W. Lu, J. Lubkowski, Antimicrobial characterization of human β -defensin 3 derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother*. 47 (2003) 2804–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2804>.
- [183] M. Yang, C. Zhang, X. Zhang, M.Z. Zhang, G.E. Rottinghaus, S. Zhang, Structure-function analysis of avian β -defensin-6 and β -defensin-12: role of charge and disulfide bridges, *BMC Microbiol*. 16 (2016) 210. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0828-y>.
- [184] A. Tankrathok, A. Punpad, M. Kongchaiyapoom, S. Sosiangdi, N. Jangpromma, S. Daduang, S. Klaynongsruang, Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity, *Biotechnol. Appl. Biochem*. 66 (2019) 142–152. <https://doi.org/10.1002/bab.1709>.
- [185] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc*. 1 (2006) 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
- [186] S.D. Kobayashi, N. Malachowa, F.R. DeLeo, Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses, *Am J Pathol*. 185 (2015) 1518–1527. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>.
- [187] D.M. Guerrero, F. Perez, N.G. Conger, J.S. Solomkin, M.D. Adams, P.N. Rather, R.A. Bonomo, *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections:

- recognizing a broadening spectrum of disease, *Surg Infect (Larchmt)*. 11 (2010) 49–57. <https://doi.org/10.1089/sur.2009.022>.
- [188] M.E. Merchant, K. Mills, N. Leger, E. Jerkins, K.A. Vliet, N. McDaniel, Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species, *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 143 (2006) 133–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.10.005>.
- [189] P. Charruau, J. Pérez-Flores, J.G. Pérez-Juárez, J.R. Cedeño-Vázquez, R. Rosas-Carmona, Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean, *Dis. Aquat. Org.* 98 (2012) 27–39. <https://doi.org/10.3354/dao02418>.
- [190] J.S.A. Silva, R.A. Mota, J.W. Pinheiro Júnior, M.C.S. Almeida, D.R. Silva, D.R.A. Ferreira, J.C.N. Azevedo, Aerobic bacterial microflora of Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) oral cavity and cloaca, originating from parque Zoológico Arruda Câmara, Paraíba, Brazil, *Braz. J. Microbiol.* 40 (2009) 194–198. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090001000034>.
- [191] C.J. Whelehan, A. Barry-Reidy, K.G. Meade, P.D. Eckersall, A. Chapwanya, F. Narciandi, A.T. Lloyd, C. O’Farrelly, Characterisation and expression profile of the bovine cathelicidin gene repertoire in mammary tissue, *BMC Genomics*. 15 (2014) 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-128>.
- [192] A.I. Maxwell, G.M. Morrison, J.R. Dorin, Rapid sequence divergence in mammalian β -defensins by adaptive evolution, *Mol. Immunol.* 40 (2003) 413–421. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00160-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00160-3).
- [193] G. Zhang, L.T. Sunkara, Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications, *Pharmaceuticals (Basel)*. 7 (2014) 220–247. <https://doi.org/10.3390/ph7030220>.
- [194] A. Rodriguez, M.Ø. Pedersen, E. Villegas, B. Rivas-Santiago, J. Villegas-Moreno, C. Amero, R.S. Norton, G. Corzo, Antimicrobial activity and structure of a consensus human β -defensin and its comparison to a novel putative hBD10, *Proteins*. 88 (2020) 175–186. <https://doi.org/10.1002/prot.25785>.
- [195] E. Klüver, K. Adermann, A. Schulz, Synthesis and structure-activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system, *J. Pept. Sci.* 12 (2006) 243–257. <https://doi.org/10.1002/psc.749>.
- [196] K.R. Parducho, B. Beadell, T.K. Ybarra, M. Bush, E. Escalera, A.T. Trejos, A. Chieng, M. Mendez, C. Anderson, H. Park, Y. Wang, W. Lu, E. Porter, The

- antimicrobial peptide human β -defensin 2 inhibits biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* without compromising metabolic activity, *Front. Immunol.* 11 (2020) 805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00805>.
- [197] M. Di Luca, G. Maccari, R. Nifosì, Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools, *Pathog Dis.* 70 (2014) 257–270. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12151>.
- [198] E. Klüver, S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W.-G. Forssmann, K. Adermann, Structure-activity relation of human β -defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity, *Biochemistry.* 44 (2005) 9804–9816. <https://doi.org/10.1021/bi050272k>.
- [199] C.M. Thomas, J. Hothersall, C.L. Willis, T.J. Simpson, Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin, *Nat Rev Microbiol.* 8 (2010) 281–289. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2278>.
- [200] J.R. Shelley, D.J. Davidson, J.R. Dorin, The dichotomous responses driven by β -defensins, *Front. Immunol.* 11 (2020) 1176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01176>.
- [201] A. Cuesta, J. Meseguer, M.Á. Esteban, Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity, *Mol Immunol.* 48 (2011) 1432–1438. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.03.022>.
- [202] J. Ruangsri, Y. Kitani, V. Kiron, J. Lokesh, M.F. Brinchmann, B.O. Karlsen, J.M.O. Fernandes, A novel β -defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity, *PLoS One.* 8 (2013) e62302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062302>.
- [203] T. Cuperus, M. Coorens, A. van Dijk, H.P. Haagsman, Avian host defense peptides, *Dev. Comp. Immunol.* 41 (2013) 352–369. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.019>.
- [204] Y. Yang, Y. Jiang, Q. Yin, H. Liang, R. She, Chicken intestine defensins activated murine peripheral blood mononuclear cells through the TLR4-NF-KB pathway, *Vet Immunol Immunopathol.* 133 (2010) 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.07.008>.
- [205] T. Melkamu, H. Kita, S.M. O’Grady, TLR3 activation evokes IL-6 secretion, autocrine regulation of STAT3 signaling and TLR2 expression in human bronchial epithelial

- cells, *J Cell Commun Signal*. 7 (2013) 109–118. <https://doi.org/10.1007/s12079-012-0185-z>.
- [206] P.C. Campos, M.T.R. Gomes, E.S. Guimarães, G. Guimarães, S.C. Oliveira, TLR7 and TLR3 sense *Brucella abortus* RNA to induce proinflammatory cytokine production but they are dispensable for host control of infection, *Front. Immunol*. 8 (2017) 28. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00028>.
- [207] Y. Lai, A. Di Nardo, T. Nakatsuji, A. Leichtle, Y. Yang, A.L. Cogen, Z.-R. Wu, L.V. Hooper, R.R. Schmidt, S. von Aulock, K.A. Radek, C.-M. Huang, A.F. Ryan, R.L. Gallo, Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury, *Nat Med*. 15 (2009) 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>.
- [208] I. Arenas, M.A. Ibarra, F.L. Santana, E. Villegas, R.E.W. Hancock, G. Corzo, *in vitro* and *in vivo* antibiotic capacity of two host defense peptides, *Antimicrob Agents Chemother*. 64 (2020). <https://doi.org/10.1128/AAC.00145-20>.
- [209] L. Koeninger, N.S. Armbruster, K.S. Brinch, S. Kjaerulf, B. Andersen, C. Langnau, S.E. Autenrieth, D. Schneidawind, E.F. Stange, N.P. Malek, P. Nordkild, B.A.H. Jensen, J. Wehkamp, Human β -defensin 2 mediated immune modulation as treatment for experimental colitis, *Front Immunol*. 11 (2020) 93. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00093>.
- [210] Y. Sakagami-Yasui, Y. Shirafuji, O. Yamasaki, S. Morizane, T. Hamada, H. Umemura, K. Iwatsuki, Two arginine residues in the COOH-terminal of human β -defensin-3 constitute an essential motif for antimicrobial activity and IL-6 production, *Exp Dermatol*. 26 (2017) 1026–1032. <https://doi.org/10.1111/exd.13361>.
- [211] J.Y. Lee, J.S. Suh, J.M. Kim, J.H. Kim, H.J. Park, Y.J. Park, C.P. Chung, Identification of a cell-penetrating peptide domain from human β -defensin 3 and characterization of its anti-inflammatory activity, *Int J Nanomedicine*. 10 (2015) 5423–5434. <https://doi.org/10.2147/IJN.S90014>.
- [212] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny, *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1758 (2006) 1373–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.027>.
- [213] E. Nigro, I. Colavita, D. Sarnataro, O. Scudiero, G. Zambrano, V. Granata, A. Daniele, A. Carotenuto, S. Galdiero, V. Folliero, M. Galdiero, R.A. Urbanowicz, J.K. Ball, F. Salvatore, A. Pessi, An ancestral host defence peptide within human β -

- defensin 3 recapitulates the antibacterial and antiviral activity of the full-length molecule, *Sci Rep.* 5 (2015) 18450. <https://doi.org/10.1038/srep18450>.
- [214] U.S. Sagaram, R. Pandurangi, J. Kaur, T.J. Smith, D.M. Shah, Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*, *PLoS One.* 6 (2011) e18550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018550>.
- [215] D.M.E. Bowdish, D.J. Davidson, Y.E. Lau, K. Lee, M.G. Scott, R.E.W. Hancock, Impact of LL-37 on anti-infective immunity, *J Leukoc Biol.* 77 (2005) 451–459. <https://doi.org/10.1189/jlb.0704380>.
- [216] Y. Kai-Larsen, B. Agerberth, The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense, *Front Biosci.* 13 (2008) 3760–3767. <https://doi.org/10.2741/2964>.
- [217] L. Wei, J. Gao, S. Zhang, S. Wu, Z. Xie, G. Ling, Y.-Q. Kuang, Y. Yang, H. Yu, Y. Wang, Identification and characterization of the first cathelicidin from sea snakes with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity and special mechanism, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 16633–16652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642645>.
- [218] S.C. Mansour, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock, Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections, *J Pept Sci.* 21 (2015) 323–329. <https://doi.org/10.1002/psc.2708>.
- [219] K.I. Udekwu, N. Parrish, P. Ankomah, F. Baquero, B.R. Levin, Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics, *J Antimicrob Chemother.* 63 (2009) 745–757. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn554>.
- [220] S.C. Mansour, D. Pletzer, C. de la Fuente-Núñez, P. Kim, G.Y.C. Cheung, H.-S. Joo, M. Otto, R.E.W. Hancock, Bacterial abscess formation is controlled by the stringent stress response and can be targeted therapeutically, *EBioMedicine.* 12 (2016) 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.015>.
- [221] D. Pletzer, S.C. Mansour, R.E.W. Hancock, Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens, *PLoS Pathog.* 14 (2018) e1007084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007084>.

10 Anexos

Tabla S1: Secuencias de β -defensinas identificadas en *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*. Las secuencias traducidas se muestran con sus números de acceso del GenBank. AmiBD6 y AmiBD9 contienen codones de parada en el centro de las secuencias (señalados con asteriscos *) y no fueron incluidas en los análisis bioinformáticos.

Name	Sequence	Species	GenBank
AmiBD1	MRVLLLLFALLFLVFQVQAQHKAEQEEAQDPALQDEAEAVMAAPEN TPISRSNCKRSGATCRVGFCEGGEIKLGSCAFLRPCCKELPGL	<i>Alligator mississippiensis</i>	MT452582
AmiBD2	MKLLFLLLVTTLVFQAQAQDVVVAQDEAEPQDLGEMEEEAETEV MEAEATGMDFPKLGESPAHCRWKRGVCRRTHCNRNDRNCRH TPCKPAERIIGWCLSTYVCCRKAYL		MT452583
AmiBD3	MKFLYLLFGVAFVLVLTQAQDIQAQDKAEIQELNHPAQPRRRKFCSR QGVCKPRCSGNENSSRRRCRNHQRCCKVRRQ		MT452584
AmiBD4	MKIYLLLVGVAFLVSQAQAQDVVVAQDEAEAQDLDDIDEAQDNA MEAEYAATMGSPDVKPEYVVCVLLGVCRPFCLRNERTIGSCS SNHACCKRY		MT452585
AmiBD5	MRTLYLLFAVSLFMVQIAPGFFQIYWNTKCKLNGGSCFLRSCPRQF VSFGTCTQECMCCRHRRTD		MT452586
AmiBD6	MKTPCLLFALVLLVLIQAMPNPVGEKDPQKEADTWDEVEDDVG EEGDVEAQR*GENSPMICGFSGGSCRTGCSSNEVMAGKCYGS YLCCIPR		-
AmiBD7	MKTPCLLFALVLLVHVQAMPNPVGEKQPHKEADTWGVEDDASK AKGNVEAEGAGGENNPMVCSYSGGSCRQRCIGHEVMVGKCYG TFICCVHM		MT452587
AmiBD8	MRVLYLLFAVSILMSQLAAGFPQIGYFHCQQNKGCQCFQHICPPNTK YIGSCKQLGNCCQRV		MT452588
AmiBD9	MKLLYLLLVGVAFLVFQAQAQVTVVA*GAEQDLGEMQEQAEDN VMDAEDADDKGSADL*PLASPLWCGWGGYCRHHCKEKERTGL CTVNYVCCL		-

AmiBD11	MKLLYLLVGVAFVLFQTQAQDGAQAQDEAEAQDLDEMEEEAEDEF VEAEDAAGMGSPELARKDRPCRKGLFCRPKCGQKEHVIGTCPKGL ICCRIL	MT452589
AmiBD12	MAEKRMWVFAVAILLAVPGNAQGSKNVCRSAGGGQCMGTCLS GEVRIGDCFTPVLCCCKYLARKTPGELQGGGA	MT452590
AmiBD13	MRILYLLFAAVMILFLQAVPAKGSYYSTLQCRNNHGHCRRLCFHRER WIGNCNGGHQHCKK	MT452591
AmiBD14	MRILYLLALLFLCQALADTLTCTKNNGTCSFMLCPFMKAIGSCYDG AAKCCRRCI	MT452592
AmiBD15	MRILYLLFAVFLFLQVAPGQSYRECRNRGGECRPHGSPHGSVIPV RCPHRTVCCRRR	MT452593
AmiBD16	MKTPCLLFAVLLVHVQAMPNPVGENDPQVEADTWDEVEDDAG EAEGDVEAEGAGGENSPMICGFSGGSCRTVCLISEVMAGKCYSSY LCCLPR	MT452594
AmiBD17	MKILYLLVGLFLFLQAASGLGRCNLLNGVCRHTLCHSLEKIYGRCHR GLRNCCVDDYVLKYKM	MT452595
AmiBD18	MKLLYFLSVAFLVFQAQAQALKPQGSPTDCHRQLGVCRSFLCFFFE TTIGSCNRHQVCCRRI	MT452596
AmiBD19	GIFQLLHFHIFLVAGHGQEYHDCKNRGGDCILHDTCLSTGEIYAPC PRWLICCKRLR	MT452597
AmiBD20	MMKFFYLLLVFLGIFLATTANGQRASRYVNHCLQKGGTCRYDDCE AGEEQIGTCYRQTMVCCRDEE	MT452598
AmiBD21	MKSLYVILAVAFFSQVVPGNLPILSLIQCLNLGGICLISVSLCDGVT IRLLGCNCCSSR	MT452599
AmiBD23	TRSLFLLFAVAFFLQAAPEEVIPSCRFSGGYCIWNWERCRCRSGHFLV ALCPFRKRCCCKS	MT452600

AsiBD1 (AsBD107 α)	MRVLLLLFALLFLVFQAQAQHKAGQEEAQDPALQDEAEAMLAAPEN SPISRSNCKRSGAICRVGFCFGGEVKLGSCAFLRPCCKELPGL	<i>Alligator sinensis</i>	MG519845, &
AsiBD2 (AsBD105 α)	MKLLFLLLVGVTTLVFQAQAQDVVVAQDEAEPQDLDEMEEEAETE VEAEDATGMDFPKLGESPAHCRWKRGVCRPTHCKRNDNSNCRH TPCKPEERIIGWCLSTHVCCRKALL		MG519839, &
AsiBD3	MKFLYLLFAVAFVLVLTQAQDIPAQDKAEIQELNHPAQPRRRKFC RGVCKSRCSGNENSSRRRCRNQRCCVKRRQ		MT452601
AsiBD4 (AsBD105 θ)	MKIVYLLLVGVAFLVLSQAQAQDVVVAQGEAEAQDIDDMDEEVQDN AMEAEYAASMGSPDVKPQEYPIVCRVLLGVCRPFRCRLRNEHTIGSC SSNHACCKRH		MG519842, &
AsiBD5	MRTLYLLFAVSLFMVQIAPGFFQIYGNTKLCNLGGSCFLRSCPRQF VSFGTCTRECMCCIRTRD		MG519849, &
AsiBD6 (AsBD106 α)	MKTPCLLFAVLLVHVQAMPNPVGEKDPKEADIWDEVKDDAGEE EGDVEAEGAEGENSPMICGFSGGSCRTSSSNEVMAGKCYG CCVPR		MG519843, &
AsiBD7 (AsBD106 γ)	MKTPCLLFAVLLVHVQAMPNPVGEKDPKEADIWDEVKDDAGEE TKGDVEAEGAGGQNNPMICSYSGGSCRPRCTGHEVMVKG CYGT FICCVRM		MG519846, &
AsiBD8	MRVLYLLFAVSLMSQLAAGFPQIGYFHCQQNKGGQCFKHICPPNTK YIGSCKQLGNCCQRV		MG519850, &
AsiBD9 (AsBD105 β)	MKLLYLLLVGVAFLVVFQAQAQVTVVAQGEAEPQDLGEMQEQAEDN VMDAEDADDKGSADLKPLASPLWCGWKGGYCRHHCKEKERTGL CTVNYVCCL		MG519840, &
AsiBD10	MRFLYLLAVLFFLFQASSGFVDVAPADTVACRSQQNFRLGTCPP FEASGTCHNGALLCCSKVPGV		MG519848, &
AsiBD11 (AsBD105 γ)	MRLLYLLLVGVAFLVVFQQAQDGAQAQDESEAQDLDEMEEEAEDEF VEAEDVAGMGSPELARKDRPCRKGLFCRPKCRKEHVIGTCPKGLI CCRIL		MG519841, &

AsiBD12	MAEKRMLWFVAILILLAVPGNAQGSKNVCRSAGGGQCMGTCLS GEVRIGDCFTPVLCCCKYLARKTTGELQGGA		MG519834, &
AsiBD13	MRILYLLFAAAMILFLQAVPAKGSYYSTLQCRSNHGHCRRLCFHGER WIGNCNGGHQHCK		MG519833, &
AsiBD14	MRILYLLALLFLLCQALADTLTCTKNNGTCSFMLCPIFMKAIGTCYDG AAKCCRCI		MG519851, &
AsiBD15 (AsBD104)	MRILYLLFAVFLVLIAPGQSSRECWNRRGGDCRPHGSCRPGSVIP VRCPYRTVCCRRR		MG519838, &
AsiBD16 (AsBD106 β)	MKTPCLLFALVLLVLIQAMPNPVGENDPQKEADTWDEVEDDAWE AEGDVEAAGASGENSPMICGFSGGSCRTVCLISEVMAGKCYGSY VCCVPR		MG519844, &
AsiBD17 (AsBD108)	MKILYLLVGLFLFLQAASGLGPCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCH HGLRNCCVDDYVLKYKM		MG519852, &
AsiBD18	MKLLYLLGVATLVFQAQAQALKPHGSPTDCHTQLGVCRRFLCFPFE KTIGSCNRQQVCCRRWI		MT452602
AsiBD19	MGIFQLLFHFIFLVVGHGQEYHDCKNRGGDCILHDTCLSTGEIYAP CPRWLICRRLR		MT452603
AsiBD20 (AsBD101)	MMKFFYLLLVFLGFILATTANGQRASRYVNHCLQKGGTCRYDDCE AGEEQIGTCYRQTMVCCRDEE		MG519835, &
AsiBD21 (AsBD102)	MKSLYLILAVAFFSQVPGNGLPILPLIQCLNLGGICLISVSLCDGITIR LLGCNCCSSH		MG519836, &
AsiBD22 (AsBD107 β)	MRVLLLLFALLFLVLAQAQAQHKVQEEAQDPALQDEAEAVMAAPEST PISRSHCRCSGTMCTEFCFRGEVKLGSCTFLHPCKKELLG		MG519847, &
CpoBD1	MRILLLSALLFLVLQVQAQHAQEEAQDPALQDEAEAVMAAPENT PISRSSCRRSGATCRVGF CFGGELRLGSCAFLRPCCKELPGL	<i>Crocodylus porosus</i>	MT452604

CpoBD2	MKLLFLLGVTTLVFQAQAQDVVVAQDKAEPQDLDEMEEEAETE MEAQDAAGMDFPGLNLGESPACRWRRGICRPTHCKNDPNCRY NPCRFQERIVGWCLSSHVCCVKAKL	MT452605
CpoBD3	MKFLYLLFGVVFLVLPQAQDIQAQNKAEIQELNNPAQPRRRKFCF RRGVCKSRCSRNEDSARRCRNRQHCCIKRRH	MT452606
CpoBD4	MKIVYLLLVGVAFLVSQTEAQDVVVTQGEAEQDLDEMDEEAKDNA MEAEYAARMGSPDVKQEFVVCRIILGVCRFSRCRKNERTIGSCSS SRACCKRR	MT452607
CpoBD5	MRTLYLLFAVSLFMVQIAPGFFQIYGNTKLCCLNGGSCFLRSCPRKFV SFGTCTRECMCCIR	MT452608
CpoBD8	MRVLYLLFTVSILMLQLAAGFPKIGYFHCRSQNGNCYQYACPPNTKY IGSCNKLGNCCQRV	MT452609
CpoBD9	MKLLYLLGVATLVFQAQAQVTVVAQGEAEPQDLGEKQEQAEDNI MEAEADAGYKGSADLKPLPSPLWCGWKGGYCRHHCKKEERTGW CTTNYVCCH	MT452610
CpoBD10	MRFLYLLAVLFFLFQVSSGFVDVAPADTVACRNQGNFCRLGTCP TFEGTGTCNNGALLCCSKVPGL	MT452611
CpoBD12	MAGKRMLWFAAFLLAVPGNAQGSKHVCRTAGGQCRMGICLSG EVRIGDCFIPVILCCKYPVRKETGELQGGGA	MT452612
CpoBD13	MRLLYLLFAAVMLLFLQAVPANGSYSTLQCRNNHGHCRRLCFHG EQWIGNCNGRHQHCK	MT452613
CpoBD14	MRILYLLALLFLLCQALADTLTCTKNNGTCAFMLCPIFMKAIGTCYD GAAKCCRCI	MT452614
CpoBD15	MRILYLLFAVLLFVLAAPGQPSRSLDRGGRCIRYNTCHPNLIINAR CPHQTVCCRRR	MT452615
CpoBD17	MKILYLLVLGLFLQAASGLGRCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCH RGLRNCCVDDYVLKYKM	MT452616

CpoBD18	MKLLYLLLSVAFLVFGTQAQDLKPHGSPTDCHRKLGICRHFVFCNLFEI TIGYCNRRHHVCCRRI		MT452617
CpoBD19	TRIFLLAVLLFFHAAAPGHGQQYHDCKDRGGDCILHDTCLSSGEVI YAPCPRWLICCRRLR		MT452618
CpoBD20	MMKFFHLLALLFGIFLATTANGQRATRYVNHCLQKGGTCRYDDCE AGEEQIGTCYRQTMVCCRDEE		MT452619
CpoBD21	MKSLYLILALFFSQVVPNGNLPILSFLQCLNLQGTCLLTVGFCNGI TIRLLGDCCTP		MT452620
CpoBD23	LRSLLFFAVAFFLQAAPEEASPCRSRFGDHCWVNERCRSGRFLA VPCFRKRCKKS		MT452621
GgaBD1	MKILFLLSALLFLVLQVQTQHKAEQEAQDPALQDEAEAVMAAPENT PIRSSCRRRGATCRVGFQGGELKLGSCAFLRPPCKELPGL	<i>Gavialis gangeticus</i>	MT452622
GgaBD2	MKLLFLLGVTTLVFQAQAQDMAVAQDEAEPQDLDEMGEAEATKV MEAEADAAGMDFPGLNLGESPACRWNRGICRRTYCKKHDRNCRY NPCRIQERRAGWCLSSHVCCVKALL		MT452623
GgaBD3	MKFLYLLFGVAFVLVLPQAQDIQAQNKAEIQELNPAQLRRRKFCF RRGVCKSRCSRNEDESARRCRNRQHCCVKRRH		MT452624
GgaBD4	MKIVYLLFGVAFVLSQAQAQAQADVVATQGEAEAQDLDEVDEE AEDNAMEAEYAARMGSPDKPQEFPLVCRVLLGVCRFSRCQKNER TIGSCSSRRACCKRH		MT452625
GgaBD5	MRTL YLLFAVSLFMIQIAPGFFQIYGNTKCLKSGGSCFLRSCPRKFVS FGTCTRECMCCIRVRRVRD		MT452626
GgaBD8	MRVLYLLFAVSILMLQLAAGFPKIGYFHCQSRKGQCFQHTCPPNTKY IGSCNQLGNCCQR		MT452627
GgaBD9	MKLLYLLLVGVALVLFQAQALVTVMAQGEAEPQDLGEMQEQAEDNI MEAEEDSYKGSADLKPLASPLWCGWKGGYQHHCKKEEHTGW CTMNYVCCH		MT452628

GgaBD10	MKVLYLLAVLFFLFGASSGFVDVAPADTIACRNQGNFCRLRTPPTF EGTGTCHNGALLCCSKVPGS	MT452629
GgaBD12	MAEKRMWFAAFLLAVPGNAQGSKHICRTAGGQCRMGTCLSGE VRIGDCFSPVILCCKYPVRKTTRELQGA	MT452630
GgaBD13	MRILYLLFAAVMILFLQAVPAKGTYYSTLQCRNNHGHCRRLCFHGE QWIGNCNGRHQHCK	MT452631
GgaBD14	MRILYLLALLFLCQALADTLTCMKNNGTCSFMLCPFMKAIGTCYD GEAKCCRRCI	MT452632
GgaBD15	MRILYLLFAVLLFVLAAPGHGQPYRSCLDMGGRCVRYDICHPNFVI NARCPHRTVCCRRY	MT452633
GgaBD17	MKILYLLVGLFLFLQAASGLGRCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCH RGLRNCCVDDYVLKYKM	MT452634
GgaBD18	LPPITKLSLSSHPADLKPHGSPDCHRQLGICRCFCINLFEITIGSCNR NHVCCRRI	MT452635
GgaBD19	TRLVGNKMGGLAFFLSQGVGHGQYRDCKDRGGDCILHDTCLST GEVIYAPCPRWLICCRRLLW	MT452636
GgaBD20	MMKFFYLLVLLFGVFLATTANGQRATRYVNHCLQKGGTCRYDDCE AGEEQIGTCYRQTMVCCRDEE	MT452637
GgaBD21	MKSLYLILALFFSQVVPNGLPILSLLQCLNLQGTCLFSVFCSGITI RLGNCNCCSP	MT452638
GgaBD23	LRSFFLLFAVAFFLQAAPEEAIPSCRFSGGHCINWNERCSRGRFLA APCPFRKRCKKS	MT452639

&: secuencias previamente descritas [13].

Tabla S2: Propiedades físico-químicas de las variantes de β -defensinas de cocodrilianos y de otros vertebrados. MM: masa molecular teórica reducida en Daltons; Carga: carga neta predicha utilizando la escala de Bjellqvist; Índice H: índice de hidrofobicidad predicho utilizando la escala de Kyte-Doolittle. Cada variante comprende un residuo extra en los extremos N- y C-terminal del marco de cisteínas (Cys1 a Cys6).

Variante	Secuencia	Especies	Long.	M.M.	Carga	I. Hid.
Am1NK	NCKRSGATCRVGFCEGGEIKLGSCAFLRPCCCK	<i>Alligator mississippiensis</i>	32	3413.1	4.7	0.16
Am2HR	HCKRNDRNCRHTPCKPAERIIGWCLSTYVCCR		32	3820.5	4.88	-0.78
Am3FV	FCSRQGVCKPRCSGNENSSRRCRNHQRCCV		30	3472.0	5.79	-1.15
Am4VK	VCRVLLGVCRPFRCRLRNERTIGSCSSNHACCK		32	3582.3	4.79	0.08
Am5LI	LCKLNGGSCFLRSCPRQFVSFGTCTQECMCCI		32	3536.2	1.69	0.45
Am6II	ICGFSGGSCRTGCSSNEVMAGKCYGSYLCCI		31	3157.7	0.7	0.43
Am7VV	VCSYSGGSCRQRQIGHEVMVGKCYGTFICCV		31	3347.0	1.79	0.47
Am8HQ	HCQQNKGGCFQHCIPNTKYIGSCKQLGNCCQ		32	3610.2	2.87	-0.82
Am9WL	WCGWKGGYCRHHCKEKERKTGLCTVNYVCCCL		31	3662.3	3.87	-0.58
Am11RR	RCRKGLFCRPKCGQKEHVIGTCKPGLICCR		30	3391.2	6.79	-0.36
Am12VK	VCRSAGGQCQMGTCLSGEVRIGDCFTPVILCCCK		33	3436.1	0.7	0.52
Am13QK	QCRNNHGHCRRLCFHRERWIGNCNGGHQHCCCK		32	3861.4	5.14	-1.35
Am14TR	TCTKNNGTCSFMLCPFMKAIGSCYDGAACKCR		33	3539.2	2.7	0.25
Am15ER	ECRNRRGGECRPHGSCHPGSPVIVRCPHRTVCCR		33	3660.2	3.97	-0.77
Am16IL	ICGFSGGSCRTVCLISEVMAGKCYSSYLCCCL		31	3254.9	0.7	0.95
Am17RV	RCNLLNGVCRHTLCHSLEKYIGRCHRGLRNCCV		33	3828.6	4.96	-0.22
Am18DR	DCHRQLGVCRSFLCFFETTIGSCNRHQVCCR		32	3767.4	1.88	0.03
Am19DK	DCKNRGGDCILHDTCLSTGEIYAPCPRWLICCK		34	3798.5	-0.21	0
Am20HR	HCLQKGGTCRYDDCEAGEEQIGTCYRQTMVCCR		33	3758.2	-1.2	-0.72
Am21QS	QCLNLGGICLISVSLCDGVTIRLLGCNCCS		30	3071.7	-0.3	1.22
Am23SK	SCRFSGGYCIWNWERCRSGHFLVALCPFRKRCCCK		34	4070.8	5.79	-0.21
As1NK	NCKRSGAICRVGFCEGGEVKLGSCAFLRPCCCK	<i>Alligator sinensis</i>	32	3411.1	4.7	0.32
As2HR	HCKRNDSNCRHTPCKPEERIIGWCLSTHVCCR		32	3783.4	2.97	-0.89

As3FV	FCSRRGVCKSRCSGNENSSRRRCRNQRCCV	30	3509.0	7.7	-1.2	
As4VK	VCRVLLGVCRPFRCRLRNEHTIGSCSSNHACCK	32	3563.2	3.88	0.12	
As5LI	LCKLNGGSCFLRSCPRQFVSFGTCTRECMCCI	32	3564.3	2.69	0.42	
As6IV	ICGFSGGSCRTSCSSNEVMAGKCYGSYLCCV	31	3173.7	0.7	0.41	
As7IV	ICSYSGGSCRPRCTGHEVMVGKCYGTFCV	31	3317.9	1.79	0.38	
As8HQ	HCQQNKGGQCFKHICPPNTKYIGSCKQLGNCCQ	32	3610.2	3.87	-0.83	
As9WL	WCGWKGGYCRHHCKEKERKTGLCTVNYVCCL	31	3662.3	3.87	-0.58	
As10AS	ACRSQQNFCRLGTCPPTFEASGTCHNGALLCCS	33	3477.0	0.79	-0.04	
As11RR	RCRKGLFCRPKCGRKEHVIGTCPKGLICCR	30	3419.2	7.79	-0.39	
As12VK	VCRSAGGQCQMGTCLSGEVRIGDCFTPVLCCK	33	3436.1	0.7	0.52	
As13QK	QCRSNHGHCRRLCFHGERWIGNCNGGHQHCCCK	32	3735.2	4.14	-1.14	
As14TR	TCTKNNGTCSFMLCPFMKAIGTCYDGAACKCR	33	3553.3	2.7	0.25	
As15ER	ECWNRGGDCRPHGSCRPGSVIPVRCPYRTVCCR	33	3721.3	3.79	-0.64	
As16IV	ICGFSGGSCRTVCLISEVMAGKCYGSYVCCV	31	3196.8	0.7	0.99	
As17PV	PCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCHHGLRNCCV	33	3736.4	3.05	-0.1	
As18DR	DCHTQLGVCRFLCFPFKGTIGSCNRQQVCCR	32	3749.4	2.79	-0.21	
As19DR	DCKNRGGDCILHDTCLSTGEIYAPCRWLICCR	34	3826.5	-0.21	-0.02	
As20HR	HCLQKGGTCRYDDCEAGEEQIGTCYRQTMVCCR	33	3758.2	-1.2	-0.72	
As21QS	QCLNLGGICLISVSLCDGITIRLLGCNCCS	30	3085.7	-0.3	1.23	
As22HK	HCRCSGTMCQTEFCFRGEVKGSCFTLHPCCK	32	3613.3	1.87	-0.02	
Cp1SK	SCRRSGATCRVGFVCFGGELRLGSCAFLRPCCK	<i>Crocodylus porosus</i>	32	3442.1	4.7	0.19
Cp2HV	HCKKNDPNCRYNPCRQFQERIVGWCLSSHVCCV	32	3796.4	2.88	-0.54	
Cp3FI	FCFRRGVCKSRCRNEDSARRRCRNQRHCCI	30	3648.2	6.79	-1.08	
Cp4VK	VCRILLGVCRFSRRCRNERTIGSCSSSRACCK	32	3593.3	6.7	-0.08	
Cp5LI	LCKLNGGSCFLRSCPRKFVSFGTCTRECMCCI	32	3564.3	3.69	0.41	
Cp8HQ	HCRSQNGNICYQYACPPNTKYIGSCNKLGNCCQ	32	3569.0	2.78	-0.91	
Cp9WH	WCGWKGGYCRHHCKEERKTGWCTTNYVCCCH	31	3761.3	3.96	-1.11	
Cp10AS	ACRNQGNFCRLGTCPPTFEGTGTCTNNGALLCCS	33	3409.9	0.7	-0.1	
Cp12VK	VCRTAGGQCRMIGICLSGEVRIGDCFIPVLCCK	33	3502.3	1.7	0.81	
Cp13QK	QCRNHNHGHCRRLCFHGEQWIGNCNGRHQHCCCK	32	3833.3	4.14	-1.32	
Cp14TR	TCTKNNGTCAFMLCPFMKAIGTCYDGAACKCR	33	3537.3	2.7	0.33	

Cp15SR	SCLDRGGRCIRYNTCHPNLIINARCPHQTVCCR		33	3774.4	3.88	-0.36
Cp17RV	RCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCHRGLRNCCV		33	3814.5	4.96	-0.22
Cp18DR	DCHRKLGICRHVFCNLFEITIGYCNRRHHVCCR		32	3847.6	3.05	-0.04
Cp19DR	DCKDRGGDCILHDTCLSSGEVIYAPCPRWLICCR		34	3799.4	-1.21	-0.03
Cp20HR	HCLQKGGTCRYDDCEAGEEQIGTCYRQTMVCCR		33	3758.2	-1.2	-0.72
Cp21QT	QCLNLQGTCLLTVGFCNGITIRLLGCDCCCT		30	3176.8	-0.3	0.91
Cp23SK	SCRSGGDHCIWNWERCRCRGRFLAVPCPFRKRCCCK		34	4105.8	5.79	-0.56
Gg1SK	SCRSSGATCRVGFVCGGELKLGSCAFLRPCCCK	<i>Gavia gangeticus</i>	32	3414.1	4.7	0.21
Gg2YV	YCKKHDRNCRYNPCRIGERRAGWCLSSHVCCV		32	3885.5	4.87	-0.87
Gg3FV	FCFRRGVCKSRCSRNEDSARRCRNRQHCCV		30	3634.2	6.79	-1.09
Gg4VK	VCRVLLGVCRFSRCQKNERTIGSCSSRRACCK		32	3620.3	6.7	-0.18
Gg5LI	LCKLGGGSCFLRSCPRKFVSGTCTRECMCCI		32	3537.3	3.69	0.49
Gg8HQ	HCQSRKGGQCFQHTCPNTKYIGSCNQLGNCCQ		32	3585.1	2.87	-0.92
Gg9WH	WCGWKGGYQCQHHCKKEEHTGWCTMNYVCCH		31	3744.3	2.05	-0.95
Gg10AS	ACRNQGNFCRLRTPPTFEGTGTCHNGALLCCS		33	3532.0	1.79	-0.21
Gg12IK	ICRTAGGQCRMGTCLSGEVRIGDCFSVILCCCK		33	3478.2	1.7	0.5
Gg13QK	QCRNHNHGHCRRLCFHGEQWIGNCNGRHQHCCCK		32	3833.3	4.14	-1.32
Gg14TR	TCMKNNGTCSFMLCPIFMKAIGTCYDGEAKCCR		33	3641.4	1.7	0.17
Gg15SR	SCLDMGGRCVRYDICHPNFVINARCPHRTVCCR		33	3796.5	2.88	-0.08
Gg17RV	RCNLLNGVCRHTLCHSLEKYVGRCHRGLRNCCV		33	3814.5	4.96	-0.22
Gg18DR	DCHRQLGICRCFCNLFEITIGSCNRNHHVCCR		32	3728.4	1.87	0.16
Gg19DR	DCKDRGGDCILHDTCLSTGEVIYAPCPRWLICCR		34	3813.4	-1.21	-0.03
Gg20HR	HCLQKGGTCRYDDCEAGEEQIGTCYRQTMVCCR		33	3758.2	-1.2	-0.72
Gg21QS	QCLNLQGTCLFSVFCSGITIRLLGCNCCS		30	3184.8	0.7	0.95
Gg23SK	SCRSGGHCIWNWERCRCRGRFLAAPCPRKRCCCK		34	4019.7	6.79	-0.54
CFBD1	FAVWGCADYRGYCRACFAFEYSLGPKGCTEGYVC CVPNTF	<i>Cynops fudingensis</i>	41	4527.2	-0.3	0.27
PopuDef	GASPALWGCDSFLGYCRIACFAHEASVGQKDCAE MICCLPNVF	<i>Rhacophorus puerensis</i>	44	4642.4	-2.21	0.51
TBD-1	YDSLKNCRLRGGICYIGKCPRRFFRSGSCSRGNVCC LRF	<i>Emys orbicularis</i>	40	4550.4	7.7	-0.29
PsBD2	KSIIICRLKGGWCYPQQCPYFRRIARCCSRHVCCCK	<i>Pelodiscus sinensis</i>	36	4305.2	7.77	-0.27

AcBD15	QGPHTDTIACGRGGGSCQPVPCRGLSVEAGTCQG GTMKCK	<i>Anolis carolinensis</i>	41	4066.6	0.79	-0.39
AcBD27	KRPTSDLECQKAKGLCLHQRCRRPWRSVGTENNLIQ HHCCQRGTHLPPMIPTANQEYRRK		59	6940.0	9.05	-1.19
AvBD1	GRKSDCFRKNGFCAFLKCPYLTLISGKCSRFHLCKRI WG	<i>Gallus gallus</i>	40	4644.6	7.78	-0.1
AvBD2	LFCKGGSCHFGGCPSHLIKVGSCFGFRSCCKWPW NA		36	3921.6	3.87	0.21
AvBD7	QPFIPRPIDTCRLRNGICFPGICRRPYWIGTCNNGIGS CCARGWRS		47	5376.3	5.7	-0.29
AvBD11	LPRDTSRCVGYHGYCIRSKVCPKPFAAFGTCSWRQKT CCVDTTSDFHTCQDKGGHCVSPKIRCLEEQGLCPLK RWTCKEI		82	9288.8	5.91	-0.38
HBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCK	<i>Homo sapiens</i>	36	3934.6	3.78	-0.27
HBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKC CKKP		41	4334.2	5.78	-0.1
HBD3	GIINTLQKYYCRVRGGCAVLSCLPKEEQIGKCTRGR KCCRKK		45	5161.2	10.7	-0.7
HBD4	EFELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLR KWDESLNRTKP		50	5988.9	5.71	-1.01

Long.: longitud (número de aminoácidos); M.M.: masa molecular teórica reducida en Daltons;
Carga: escala de Kyte-Doolittle; I. Hid.: índice de hidrofobicidad (escala de Bjellqvist).

Tabla S3: Masas moleculares y tiempos de retención de las isoformas oxidadas de las variantes de β -defensinas purificadas. RT: tiempo de retención en los cromatogramas RP-HPLC. La masa oxidada y reducida de cada isoforma en Daltons fue determinada por ESI-MS.

Variante sintética	Nombre de la isoforma	Tiempo de retención (min)	Masa oxidada (Da)	Masa reducida (Da)
Am2HR	Am2-P2	60.9	3814.16	3820.77
	Am2-P3	62.4	3815.02	3820.77
Am11RR	Am11-P1	40.9	3384.32	3390.93
	Am11-P3	51.3	3385.11	3390.93
	Am11-P4	55.7	3384.59	3390.93
	Am11-P5	59.3	3384.92	3390.93
Am17RV	Am17-P1	59.5	3821.23	3828.07
	Am17-P2	69.1	3821.28	3828.07
	Am17-P3	69.6	3821.88	3828.07
Am23SK	Am23-P1	61.5	4063.55	4070.12
Cp13QK	Cp13-P1	47.4	3826.27	3833.05
	Cp13-P3	48.3	3827.31	3833.05

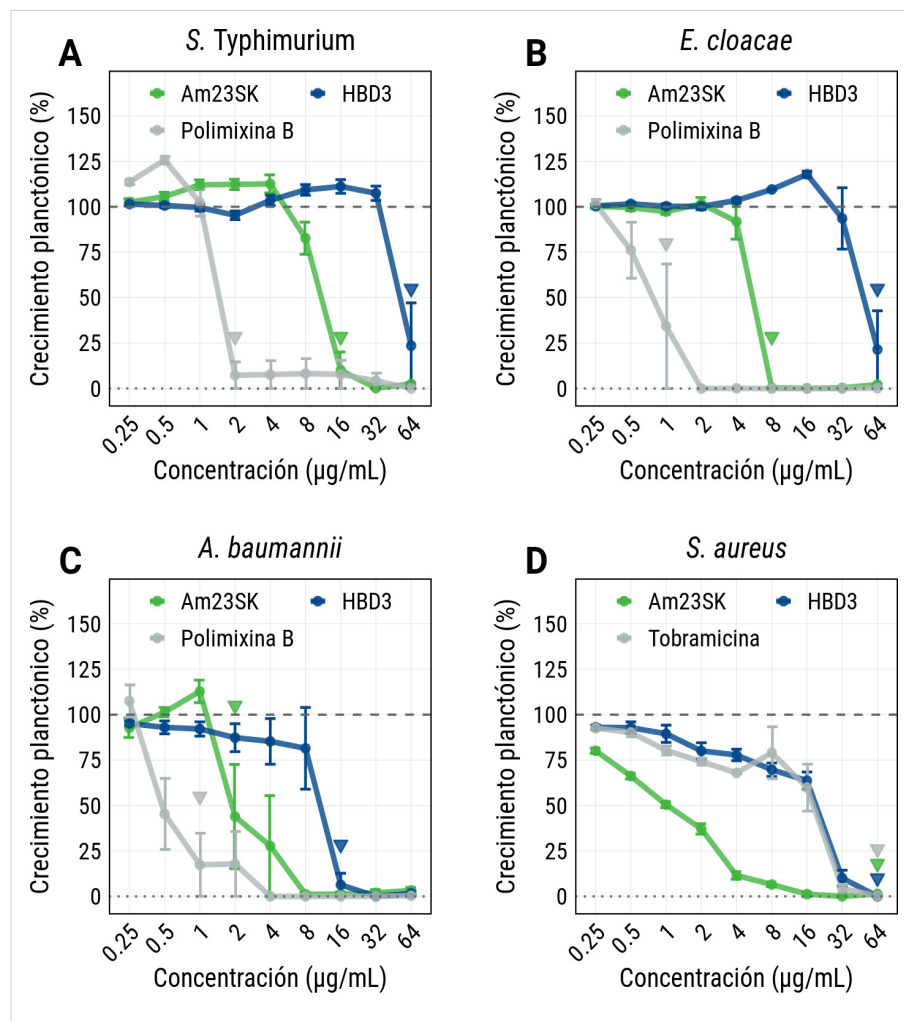


Figura S1: Actividad antibacteriana de Am23SK y HBD3. La actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas se evaluó en medio TSB 5 % al cabo de 24 horas de tratamiento con varias concentraciones de péptido. El antibiótico Polimixina B se utilizó como control contra *S. Typhimurium* (ATCC 14028) (**A**), *E. cloacae* (218R1) (**B**) y *A. baumannii* (Ab5075) (**C**), mientras que la Tobramicina se empleó contra *S. aureus* (SAP0017) (**D**). Los valores se presentan como por ciento de crecimiento planctónico en relación al control de crecimiento. Los datos se muestran como la media de al menos tres experimentos independientes, y las barras de error representan el error estándar de la media. Las concentraciones de tratamientos más bajas a las que no se recuperaron colonias individuales del sobrenadante de la placa se indican con un triángulo (▼) coloreado.

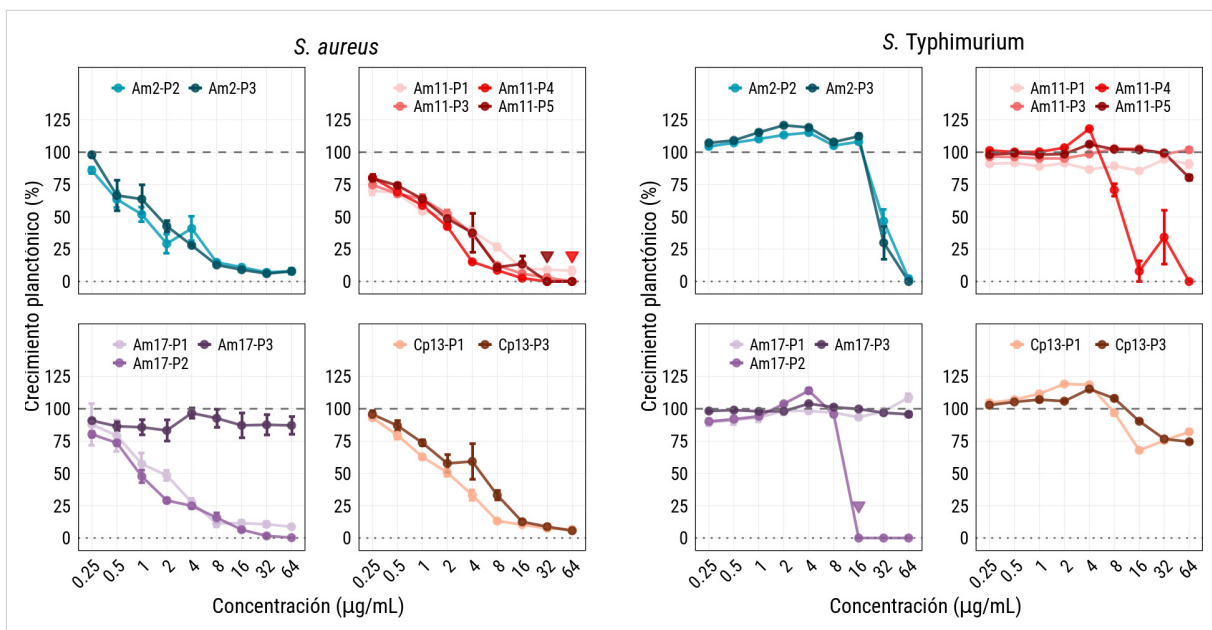


Figura S2: Actividad antibacteriana de las isoformas de β -defensinas de cocodrilianos. La actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas se evaluó en medio TSB 5 %, al cabo de 24 horas de tratamiento con varias concentraciones de péptido. Los valores se presentan como porcentaje de crecimiento planctónico en relación con el control de crecimiento. Los datos se muestran como la media de tres experimentos independientes, y las barras de error representan el error estándar de la media. Las concentraciones bactericidas se indican con un triángulo (\blacktriangledown) coloreado según la isoforma específica.

Tabla S4: Secuencias de catelicidinas identificadas en *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*.

Nombre	Secuencia	Especie
Am-CATH1	MGRWGWGVLLGLAMLVASASASQHKMLSIEEAVSLAVDFYNQEPGIDHAFRLLRAD PQPAWDMTSKPRQELQFVVRETVC PRAQDPPASECDFKDNGLVRNCTGLFSMERESP TVIITCDTVTPEQHVRVTRSERRNGHKRRRGSRRGQYSSTKHGGRKHPRKRPGSGS RLGHETPHVAPIDKGHVG	<i>Alligator mississippiensis</i>
Am-CATH11	MLVASASASQHKMLSIEEAVSLAVDFYNQEPGIDHAFRLLRADPQPAWDMTSKPRQE LQFVVRETVC PRAQDPPASECDFKDNGLVRNCTGLFSMERESPTVIITCDTVTPEQHVR VRRSGWVWNRSKRRRGSRRGRFSHIAHGGRKGHERIARV	
Am-CATH3	MGCRGWGVLLGLATLVAAASASQRKMLTYREAAFAVDFYNRQPGIDHTFQLLSVEP QPVPDTSKSRQEVRFVVCETVCPQADNHPDSECNIFNGLVRNCMWLLSTEHLKPT SIITCDTVTPGKHVPANPKLPGKGPGRHPSSGIWRGQGTFFSLPITKKPVG	
Am-CATH5	METCLLLLLLVAVATAQAQAQAQTQSQSQAGYEDAVTTAVDIFNQESGLPQAYR LLEAEPQSEWNPSSQAAQPLKFSVKETVCPAQKGNLQKQDFKENGVLKDCSGLFTA GKKPPVTAVKCEDTSQEPELVTRRKFVWKILNGALKIAPFFLG	
Am-CATH6	MKSCWALVLLVGCMAAATAQSQLNFNEAVSLAVDFYNRGLAVNNTFQLLRTPSG DVVSSPSEFRRLNFTIMETTCPVGSQPTQELCQFKENGLVRACVGFSTQQVAPLIVVT CEEAPSEPVTRVTRWLWLLRGGLKAAGWGIRAHLNRNQ	
Am-CATH8	APPALSSYQEALAAAVNTYNQESGLPQAYRLEAEPQPPQWDPSSQPAQPLKFSIKE TECLVSEKRDVSQCPFKDKGLVKDCKGLYAEKEPPVITAKCEDAGQEPQLVKRVNWP KVGRTVLRFLPYILGG	
As-CATH7	NPPQDLASQPVQPLKFSIKETECLVSEKRDISQCPFKDKGLVKDCAGIYSAEKKPPIVTA NCEDAGQGPQLVKRVNWRKVGRNTALGASYVLSFLG	<i>A. sinensis</i>
As-CATH8	NPPQDLASQPVQPLKFSIKETECLVSEKRDISQCPFKDKGLVKDCKGLYAEKEPPVITAK CEDAGQEPQLVKRVNWAKVGRNTALKLLPYIFG	
Cp-CATH10	MGRRGWVVLLALATLAAGALGSQHRTLSYEEAVSLAVNFYNQGGPGIDHAFRLLRADP QPAWDMTSQPRQELRFVVRETVC PRAQDPPASECDFQDNGLVRNCTGLFSTERESPT VIITCDTATPGQHARVRRSGWRDRIKRHRGSDSRLGYMTPFSTNINKG	<i>C. porosus</i>
Cp-CATH3	MGRRGWVVLLGLATLVAAALASQRKLLSYGEAASFVDFYNQQPGVDHTFRLLDVEP QPAWDTMAKSCQEVRFVRETVC PWTHKLPASECDFKDNGLVRNCTWLFSTKLKLP SIITCDTMTPGKDIHAKPKPKGKDERGRPGSGSWIGKTPFSFPITKKPVG	
Cp-CATH5	MGTCLRLLLLLVGAVATAGLTPPARAQAGAQAGAAQASYETAVATAVDIYNQEPGLAQA YRLEAEPQDSWNPASQAAQPLKFTVKETTPIAQKGNLQKQDFKENGLIKDCSGLFT AGKKPPVTDVKCVDASQEPELVTRKKWVKKVLKGAIKTALK	
Cp-CATH7	AFPRTQDLASQPVQPLRFSIKETTCLVSEKRDVRQCPFKDEGLVKDCTGIYSAEKKPIV TAVCKDAGQEPELVKRVNWRKIGLGSYVMSWLG	

Gg-CATH2	MGRRGWVVLLGLATLVAVALGSQHKTLSYEEAVSLAVSFYNQGGPIDRAFRLLRADPQ PAWDMTSKPRQELRFVRETVC PRAQDPPASECDFKDHGLVRNCTGLFSMERESPTVII TCDTVTPGQHVRVRRSGWWDWIKGRRGSGSRRGRFTHIAHGGSKGHGNNGNIA	<i>G. gangeticus</i>
Gg-CATH4	MQTCWVVLLLLLPLLGAASTDLPTPGTDLQPMPQSYAQALATAVDVYNQGGSGVDAAF QVLEAESRDDWDANEDPLRQLGFRLKETECVGEDQPLDQCDFKDGAVLDCTATF SCSEASLMVLVTCQPAEPPTRDRRGLFKLRRKIKKAFKKVFKRLPPVGVGVSIPLSGHR	
Gg-CATH5	SPQNPSSQAAQPLKFSVKETVCPIAQKGNLQQCNFKENGLIKDCSGLFTAACKPPVT DVKCVDASQEPELVTRRKWWKKVLNGAIAKIAPYILD	
Gg-CATH6	MKSCWALVVLVGCMASTAAAGSQLNFNEAVSLAVDFYNRGLAVNNTFQLLRTAPEG DVVSKPFEFRLLNFTIMETTCPVAGQLPSEPCQFKENGLVRACVGGFFSAQQVAPLIVVT CEEAPSEPVRVTRWIGLVRGGLKLAGWGLRXYLNRNR	
Gg-CATH7	MQPCLRALLVLGA AVAVAMAVALPAPPAPAPKGYQEALAAAINTYNQESGLPQAYRLL EAEPQQWDPASQPVQPLKFSIKETTCLVSEKRDV SQCLFKDKGLVKDCTGIYSVEKQP PIVAVCKDAGQEPQLVKRVNWRKVGLGASYVMSWLG	
Gg-CATH9	MGRRGWVVLLGLATLVAVALGSQHKTLSYEEAVSLAVSFYNQGGPIDRAFRLLRADPQ PAWDMTSKPRQELRFVRETVC PRAQDPPASECDFKDHGLVRNCTGLFSMERESPTVII TCDTVTPGQHVRVRRSGRWDWIKGRRGSGSRRGHYSTIRRGRKGSGR	

Tabla S5: Resumen de la predicción de las secuencias de catelicidinas identificadas *A. mississippiensis*, *A. sinensis*, *C. porosus* y *G. gangeticus*.

Nombre	Ensamble genómico	Cadena	Pos. inicial	Pos. final	Parcial	Referencia
Am_CATH1	gi_397460297_gb_JH735204	-	83125	93242	No	Este trabajo
Am_CATH11	AKHW03000909	+	2068	12185	N-term	Este trabajo
Am_CATH3	gi_397456510_gb_JH738990	-	0	6010	No	Este trabajo
Am_CATH4	gi_397462851_gb_JH732650	-	60	12217	N-term	[11]
Am_CATH5	gi_397462851_gb_JH732650	-	24092	34308	No	Este trabajo
Am_CATH6	AKHW03001069	-	5231	15336	No	Este trabajo
Am_CATH8	AKHW03001069	-	33404	42943	N-term	Este trabajo
As_CATH1	gi_555310491_ref_NW_005843086	-	367921	378020	No	[12]
As_CATH2	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	460	10559	No	[12]
As_CATH3	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	5263	15383	No	[12]
As_CATH4	gi_555310491_ref_NW_005843086	-	0	6074	No	[12]
As_CATH5	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	25222	35432	No	[12]
As_CATH6	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	53173	63350	No	[12]
As_CATH7	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	12151	22328	N-term	Este trabajo
As_CATH8	gi_555311385_ref_NW_005842192	+	16243	26462	N-term	Este trabajo
Cp_CATH10	gi_698084222_gb_JRXG01071781	-	2052	12151	C-term	Este trabajo
Cp_CATH3	gi_698053534_gb_JRXG01102469	-	0	6985	No	Este trabajo
Cp_CATH5	gi_698089567_gb_JRXG01066436	+	4753	14996	No	Este trabajo
Cp_CATH7	gi_698089567_gb_JRXG01066436	+	0	5837	N-term	Este trabajo
Gg_CATH2	gi_699340657_gb_JRWT01256782	-	0	2350	No	Este trabajo
Gg_CATH4	gi_699490068_gb_JRWT01141868	+	6112	13962	No	Este trabajo
Gg_CATH5	gi_699490071_gb_JRWT01141865	+	0	4273	N-term	Este trabajo
Gg_CATH6	gi_699490068_gb_JRWT01141868	+	0	7535	No	Este trabajo
Gg_CATH7	gi_699518732_gb_JRWT01120362	+	0	7133	No	Este trabajo

Gg_CATH9	gi_699359619_gb_JRWT01242099	+	7	10103	C-term	Este trabajo
----------	------------------------------	---	---	-------	--------	--------------

Pos. inicial = coordenada inicial en pares de base (pb) de la secuencia en el ensamble; Pos. final = coordenada final en pares de base (pb) de la secuencia en el ensamble; Parcial = muestra si la secuencia se identificó de manera parcial (N-terminal o C-terminal) o completamente (No).