



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PÉPTIDOS
ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA
DE *LITHODYTES LINEATUS* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: EDWIN ALEXIS YAMBAY COLLAGUAZO

TUTOR: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo - Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Edwin Alexis Yambay Collaguazo con documento de identidad N° 1726781865, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 11 de mayo de 2022

Firma:



Edwin Alexis Yambay Collaguazo

C.I: 1726781865

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización molecular de péptidos antimicrobianos a partir de la secreción cutánea de *Lithodytes lineatus* (Anura: Leptodactylidae)”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Edwin Alexis Yambay Collaguazo, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 11 de mayo de 2022

Firma:

Carolina Del Carmen Proaño Bolaños
C.I: 1714818760

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Regional Amazónica Ikiám y al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica por las facilidades de infraestructura para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Carolina Proaño por permitirme realizar este trabajo de titulación bajo su dirección, su apoyo, disponibilidad y su capacidad para guiar con éxito no sólo el desarrollo de esta investigación, sino también en mi formación profesional. Además, de facilitar siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante la etapa experimental del presente trabajo.

A los técnicos de investigación del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica; en especial a Giovanna por su valiosa ayuda en el uso de materiales y equipos en la obtención de los resultados.

A mi familia, porque gracias a su apoyo y cariño y guía he llegado a realizar muchas de mis metas.

A mis amigos, por su ayuda, anécdotas y alegrías compartidas durante toda la carrera.

DEDICATORIA

*A mis padres y hermano; gracias por la paciencia y apoyo,
por ustedes fue esto posible*

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR..... | ii |
| CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| DEDICATORIA | v |
| TABLA DE CONTENIDO..... | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| ABREVIACIONES..... | xi |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.1.1. <i>Péptidos antimicrobianos</i> | 1 |
| 1.1.2. <i>Mecanismos de acción</i> | 2 |
| 1.1.3. <i>Péptidos identificados en la familia Leptodactylidae</i> | 2 |
| 1.1.4. <i>Rana Lithodytes lineatus (Anura: Leptodactylidae)</i> | 4 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 5 |
| 1.3. Justificación de la investigación..... | 6 |
| 1.4. Objetivos de la investigación | 7 |
| 1.4.1. <i>General</i> | 7 |
| 1.4.2. <i>Específicos</i> | 7 |
| CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO | 8 |
| 2.1. Recolección de especímenes de <i>Lithodytes lineatus</i> | 8 |
| 2.2. Extracción de las secreciones cutáneas de <i>Lithodytes lineatus</i> | 8 |
| 2.3. Fraccionamiento de las secreciones cutáneas de <i>L. lineatus</i> | 8 |
| 2.3.1. <i>Fraccionamiento por HPLC en fase reversa de la secreción total</i> | 8 |
| 2.3.2. <i>Actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC</i> | 9 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.3.3. | <i>Espectrometría de masas MALDI-TOF de las fracciones con actividad antimicrobiana</i> | 9 |
| 2.4. | Clonaje Molecular | 9 |
| 2.4.1. | <i>Extracción del ARNm de las secreciones totales de L. lineatus</i> | 9 |
| 2.4.2. | <i>Construcción de las librerías 3'ADNc</i> | 10 |
| 2.4.3. | <i>RACE PCR de las librerías 3'ADNc</i> | 10 |
| 2.4.4. | <i>Electroforesis de los productos de la RACE PCR</i> | 11 |
| 2.4.5. | <i>Purificación de los productos de las RACE PCR</i> | 11 |
| 2.4.6. | <i>Ligación al vector pGEM-T Easy</i> | 11 |
| 2.4.7. | <i>Transformación bacteriana</i> | 12 |
| 2.4.8. | <i>PCR de colonias y visualización de los productos por electroforesis</i> | 12 |
| 2.4.9. | <i>Secuenciación de los precursores peptídicos</i> | 12 |
| 2.4.10. | <i>Análisis e identificación de los péptidos codificados de ADNc</i> | 13 |
| 2.5. | Secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem.. | 13 |
| 2.6. | Síntesis en fase solida del péptido lineatina-2 | 14 |
| 2.7. | Ensayos biológicos | 15 |
| 2.7.1. | <i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del péptido sintetizado</i> | 15 |
| 2.7.2. | <i>Actividad hemolítica del péptido sintetizado</i> | 15 |
| 2.8. | Análisis estadístico..... | 16 |
| CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS | | 17 |
| 3.1. | Fraccionamiento de la secreción cutáneas de <i>L. lineatus</i> y actividad biológica de las fracciones | 17 |
| 3.2. | Clonaje molecular de las secuencias de precursores..... | 18 |
| 3.3. | Características fisicoquímicas de los péptidos identificados | 22 |
| 3.4. | Espectrometría de masas en tándem..... | 24 |
| 3.5. | Síntesis química del péptido lineatina-2 | 26 |
| 3.6. | Actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético lineatina-2..... | 26 |
| CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN | | 28 |

| | | |
|--|---|----|
| 4.1. | Fraccionamiento de las secreciones cutáneas y actividad antimicrobiana | 28 |
| 4.2. | Clonaje molecular de las secuencias precursoras de péptidos | 29 |
| 4.3. | Análisis de los péptidos identificados | 30 |
| 4.4. | Actividad biológica y hemolítica del péptido sintético lineatina-2 | 31 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 34 |
| 5.1. | Conclusiones..... | 34 |
| 5.2. | Recomendaciones | 34 |
| REFERENCIAS | | 35 |
| ANEXOS | | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Actividad antimicrobiana de 61 fracciones obtenidas por HPLC..... | 18 |
| Tabla 2: Parámetros resultantes al someter los ORFs a un BLASTn..... | 20 |
| Tabla 3: Parámetros resultantes al someter las secuencias aminoacídicas a un BLASTp..... | 21 |
| Tabla 4: Características fisicoquímicas de los péptidos identificados en las secreciones de <i>L. lineatus</i> | 23 |
| Tabla 5: Predicción de la estructura secundaria mediante Jpred 4 y PHD, predicción de la estructura 3D por I-TASSER y diagramas de rueda helicoidal de los péptidos identificados..... | 24 |
| Tabla 6: Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del péptido sintético lineatina-2..... | 27 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1: | Ejemplar de <i>Lithodytes lineatus</i> | 5 |
| Figura 2: | Perfil cromatográfico de la secreción cutánea de <i>L. lineatus</i> mediante RP-HPLC..... | 17 |
| Figura 3: | Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas traducidas del marco de lectura abierto que codifican a los péptidos Lineatina-1, Lineatina-2 y Lineatina-3..... | 19 |
| Figura 4: | Secuencias aminoacídicas precursoras de Lineatina-1, Lineatina-2 y Lineatina-3 traducidas del marco abierto de lectura..... | 20 |
| Figura 5: | Comparación de las secuencias aminoacídicas de los péptidos identificados en <i>L. lineatus</i> | 21 |
| Figura 6: | Comparación de las secuencias aminoacídicas de los péptidos maduros identificados con 13 ocelatinas identificadas en especímenes de la familia Leptodactylidae..... | 22 |
| Figura 7: | Fragmentos MS/MS del ion precursor [M+4H] ⁴⁺ : 619,17 de lineatina-2 (2474,67 Da)..... | 25 |
| Figura 8: | Síntesis del péptido lineatina-2..... | 26 |
| Figura 9: | Actividad hemolítica del péptido sintético lineatina-2..... | 27 |

ABREVIACIONES

| | |
|------------------------|---|
| ACN | Acetonitrilo |
| AMPs | Péptidos antimicrobianos |
| BLASTn | herramienta básica de búsqueda de alineación local para nucleótidos |
| BLASTp | herramienta básica de búsqueda de alineación local para aminoácidos |
| CH₅₀ | Concentración hemolítica media |
| CMB | Concentración mínima bactericida |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| DIC | Diisopropilcarbodiimida |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| OD | Densidad óptica |
| DODT | dioxa-1,8-octano-ditiol |
| g | Fuerza G o fuerza centrífuga relativa |
| HPLC | cromatografía líquida de alta eficiencia |
| INSPI | Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública |
| MAE | Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica |
| MALDI-TOF | Desorción/ionización por láser asistida en matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo |
| MHA | Agar Mueller Hinton |
| MHB | Caldo Mueller Hinton |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ORFs | Marcos abiertos de lectura |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Solución salina tamponada con fosfato |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RP-HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa |

| | |
|-------------|--|
| SOC | Caldo superóptimo con represión de catabolitos |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TIPS | Triisopropil silano |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| UTR | Región no traducida |

RESUMEN

Los anfibios secretan un coctel químico rico en moléculas bioactivas, como: alcaloides, aminas y péptidos bioactivos, que cumplen un rol defensivo. Los péptidos bioactivos presentan diversas actividades biológicas, tales como: antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, entre otros. En este sentido, los péptidos bioactivos son de interés biomédico porque pueden dar lugar al desarrollo de nuevos fármacos. Además, el uso indiscriminado de fármacos, la liberación de compuestos tóxicos en las aguas y suelos, el desarrollo industrial, entre otros, ha provocado la aparición de microorganismos farmacorresistentes convirtiéndose en una grave amenaza para la salud pública y ha generado la necesidad de identificar nuevos tipos de fármacos. En este estudio analizamos la actividad antimicrobiana en las fracciones obtenidas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de la secreción cutáneas de *Lithodytes lineatus*. Adicionalmente, caracterizamos la estructura primaria de cinco nuevos péptidos mediante clonaje molecular y espectrometría de masas en tándem. Entre ellos, el péptido Lineatina-2 fue sintetizado y se determinó su concentración inhibitoria mínima (CMI), concentración bactericida mínima (CMB) y actividad hemolítica. Lineatina-2 es un péptido catiónico α -helicoidal que mostró una buena actividad antimicrobiana en contra de *Escherichia coli* (CMI = 6,5 μ M), *Staphylococcus aureus* (CMI = 1,6 μ M) y *Candida albicans* (CMI = 12,9 μ M) y una concentración hemolítica media (CH₅₀) de 45,7 μ M. En este estudio se evidencia la importancia de investigar especies inexploradas para descubrir la diversidad molecular que se esconde en ellas y descubrir moléculas potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos.

Palabras claves: secreciones cutáneas, *Lithodytes lineatus*, resistencia microbiana, clonación molecular, péptidos antimicrobianos.

ABSTRACT

Amphibians secrete a chemical cocktail rich in bioactive molecules, such as: alkaloids, amines, and bioactive peptides, which play a defensive role. Bioactive peptides show diverse biological activities, such as: antimicrobial, anticancer, antiviral, among others. In this sense, bioactive peptides are of biomedical interest because they can lead to the development of new drugs. In addition, the indiscriminate use of drugs, the release of toxic compounds in water and soil, industrial development, among others, has led to the emergence of drug-resistant microorganisms, which have become a serious threat to public health, and have generated the need to identify new types of drugs. In this study, we analyzed the antimicrobial activity in the fractions obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) of the cutaneous secretion of *Lithodytes lineatus*. In addition, we characterized the primary structure of five novel peptides by molecular cloning and tandem mass spectrometry. Among them, Lineatina-2 peptide was synthesized and its minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC), and hemolytic activity were determined. Lineatina-2 is cationic α -helical peptide that showed good antimicrobial activity against *Escherichia coli* (MIC = 6,5 μ M), *Staphylococcus aureus* (MIC = 1,6 μ M) and *Candida albicans* (MIC = 12.9 μ M) and a mean hemolytic concentration (CH₅₀) of 45.7 μ M. This study evidence the importance of researching unexplored species to discover the molecular diversity hidden on them and discover potential molecules to the discovery of novel drugs.

Keywords: *skin secretions, Lithodytes lineatus, microbial resistance, molecular cloning, antimicrobial peptides.*

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

Los anfibios son capaces de desarrollarse en ambientes terrestres y acuáticos, por lo que su piel está en constante exposición a diferentes entornos cargados de microorganismos patógenos, parásitos y predadores que pueden afectar negativamente la integridad de la piel de los anfibios [1,2]. Por ende, los anfibios han desarrollado un sistema de defensa basado en la producción de compuestos químicos que forman parte de su sistema inmune innato y favorecen su supervivencia [1–4]. Dichos compuestos químicos no son solamente útiles para los anfibios, sino que, además, podrían serlo para el ser humano, ya que, han sido ampliamente estudiados describiendo una gran variedad de actividades biológicas de interés terapéutico [2,5,6].

Además, la piel cumple funciones importantes en la supervivencia de los anfibios, por lo cual necesitan un sistema de defensa que actúe rápido en la superficie [7,8]. Por ende, en la piel de los anfibios existen dos glándulas principales: las glándulas mucosas que se encargan de mantener la piel húmeda y las glándulas granulares que secretan compuestos químicos para su defensa [5,7,9]. Por lo tanto, las secreciones cutáneas de los anfibios albergan una amplia gama de compuestos químicos de amplio espectro, tales como: alcaloides, aminas, proteínas, mucinas, ácidos nucleicos, fragmentos de péptidos asociados al procesamiento de prohormonas y péptidos bioactivos [5,9–12]. Estos últimos han demostrado ser el componente principal en la defensa contra predadores, microorganismos patógenos y reparación de heridas de la piel de los anfibios [2,13,14].

Varios estudios han demostrado que los péptidos bioactivos identificados a partir de las secreciones cutáneas de los anfibios se pueden considerar como una auténtica farmacia, dado que, presentan una amplia variedad de actividades biológicas. Estas actividades biológicas pueden ser: antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria, inmunomodulatoria, entre otras actividades [2,5].

1.1.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son cadenas cortas de aminoácidos que facilitan su almacenamiento y movilización para neutralizar infecciones [6,15]. Por ende, los AMPs se encuentran distribuidos en órganos y tejidos expuestos a patógenos, por lo que, se expresan y liberan ampliamente en superficies epiteliales y en sitios de potencial infección [16,17].

Por un lado, la estructura primaria de los AMPs no exhibe dominios invariables que estén asociados con la actividad biológica, no obstante, estas moléculas están asociadas entre sí por ciertas características fisicoquímicas comunes [3,4,17,18]. La mayoría de los AMPs son relativamente pequeños de aproximadamente 5 a 100 aminoácidos, a la par, presentan una carga neta positiva, debido a la presencia de múltiples residuos de arginina y lisina [3,4,6]. Además, la mayoría de estas moléculas son anfipáticas e hidrofóbicas debido a la presencia de al menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos [18–20]. Así mismo, la mayoría de estas moléculas son lineales y tienen un gran potencial de formar estructuras α -hélices u hojas- β anfipáticas, esta conformación estructural a menudo está inducida por la interacción con los fosfolípidos de la membrana de la célula diana [19,20].

1.1.2. Mecanismos de acción

Los AMPs muestran múltiples mecanismos de acción y a pesar de que estos provienen de diferentes fuentes se han descrito semejanzas en ciertas vías de acción [6,21]. Por ejemplo, la interacción entre los AMPs y las células diana es el producto de la atracción electrostática en donde los péptidos catiónicos interactúan con los componentes de carga negativa en la superficie de las células bacterianas [22,23]. En este punto el mecanismo de acción de los péptidos diverge y se los clasifican en AMPs activos de membrana, si hay perturbación de la integridad de la membrana citoplasmática, y AMPs intracelularmente activos si existe la translocación del péptido al citoplasma [6,16,20,22–24].

Los AMPs activos de membrana tienen su primera interacción con el microorganismo por atracción electrostática. Dado que, los péptidos al ser catiónicos son atraídos por las superficies aniónicas de las bacterias, ya sea por los ácidos teicoicos en Gram positivos o lipopolisacáridos en Gram negativos [23–25]. Esta interacción ocasiona que ciertas zonas de la membrana externa del microorganismo se desestabilicen y generen poros hidrofóbicos, que provocan la pérdida de material citoplasmático, causando la muerte de los microorganismos [20,24–26]. Mientras que, los AMPs intracelularmente activos que logran penetrar la membrana, tienden a acumularse en el interior e interferir con los procesos metabólicos, incluyendo la síntesis de los componentes celulares de vital importancia, duplicación de ADN, traducción y plegamiento de proteínas, síntesis de la pared celular y el recambio metabólico [6,16,20,22–24].

1.1.3. Péptidos identificados en la familia Leptodactylidae

Por otro lado, hasta el 2019, se han reportado más de 4325 péptidos biológicamente activos [27]. Y, de acuerdo con Xu y Lai (2015) se han descrito más de 2000 péptidos, agrupados en más de 100 familias diferentes de péptidos [2]. Además, dado que los AMPs de los anfibios presentan un rápido efecto letal y una amplia actividad antimicrobiana, han despertado el interés como una nueva fuente potencial de antimicrobianos, especialmente contra patógenos resistentes [19].

Por ello, la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial uso biomédico abarca una amplia variedad de anuros, principalmente de las familias Hylidae, Ranidae, Dendrobatidae y Leptodactylidae [28]. En esta última familia, en el Ecuador se hallan 5 de los 13 géneros de anfibios con los que cuenta, además, estos géneros se encuentran en tres subfamilias: Leiuperinae, Leptodactylinae y Paratelmatobiinae [29,30]. De la subfamilia Leptodactylinae se han descrito varios péptidos con una variada actividad biológica, entre ellas la antimicrobiana. Estos péptidos biológicamente activos se encuentran descritos dentro de las familias de péptidos: ocelatinas, taulinas, plasticinas y leptoglicinas [2,13,14,31–35].

Las ocelatinas son péptidos que contienen residuos altamente conservados, pues presentan una Gly¹, Asp⁴, Lys⁷, Lys¹¹, His¹⁶ y Lys²⁰ [36]. La mayoría de los péptidos descritos de esta familia muestran una actividad antimicrobiana débil, en contra de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, y una baja actividad hemolítica [14,31,33,37–39]. Entre ellos se describen los siguientes: ocelatina-1 a ocelatina-11 caracterizada de *Leptodactylus ocellatus*; ocelatina-PT1 a ocelatina-PT8 de *L. pustulatus*; ocelatina-S de *L. syphax*; ocelatina-1I y ocelantina-2I de *L. insularum*; ocelatina-1N y ocelatina-2N de *L. nesiotus*; ocelatina-V1 a ocelatina-V3 de *L. validus*; ocelatina-L de *L. laticeps*; y ocelatina-P de *L. pentadactylus* [14,31,33,37–41]. Además, el péptido ocelatina-L también presenta actividad en contra de *Candida albicans* y el péptido ocelatina-P exhibe anticancerígena en la línea celular del melanoma murino B16F10 [13,42]. Por otra parte, los péptidos ocelatina-4 a ocelatina-6 de *L. ocellatus* son inactivos en contra de *E. coli* y *S. aureus* [14].

Las taulinas son péptidos que se caracterizan por ser ricos en Gly/Leu [34]. Además, hasta la fecha sólo se han descrito cuatro péptidos a partir de las secreciones de *Pleurodema thaul*. El péptido taulina-1 es el único de su familia que presenta una moderada actividad antimicrobiana en contra de *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, además, muestra baja tasa de citotoxicidad en contra de células humanas y animales [34].

Las plasticinas son péptidos antimicrobianos que se caracterizan por tener dos Gly conservadas en la posición 1 y 4 [35]. La plasticina-L1 fue descrita a partir de las secreciones de *L. laticeps* y tiene la inusual actividad de liberar insulina de las líneas celulares BRIN-BD11 β clonales de rata [35,43].

Hasta la fecha, sólo se ha descrito una leptoglicina de *L. pentadactylus* [44]. La leptoglicina es un péptido antimicrobiano selectivo únicamente para bacterias Gram negativas, debido a que inhibe a *Pseudomona aeruginosa*, *E. coli* y *C. freundii* [14,44].

1.1.4. *Rana Lithodytes lineatus* (Anura: Leptodactylidae)

La mayoría de los péptidos previamente descritos provienen de especies que pertenecen a la subfamilia Leptodactylinae [29]. En esta subfamilia se encuentra la única especie descrita en el género *Lithodytes* [29,30]. *L. lineatus* es una especie de anuro terrestre que habita zonas de bosque húmedo primario y secundario [30,45]. Además, esta especie se encuentra presente en la cuenca amazónica que abarcan los países de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y las Guyanas [30,46–48]. En el Ecuador, se ha reportado especímenes en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe [30].

L. lineatus es un anuro mediano, además, los machos se diferencian de las hembras por su tamaño, dado que, los machos llegan a medir de 33-45 milímetros y las hembras de 44-56 milímetros [30,45]. Por otro lado, su dorso y flancos son negros y presenta un par de rayas dorsolaterales que se originan en la punta del hocico hasta la ingle [30]. Las rayas dorsolaterales varían entre el color amarillo y bronce, en los juveniles son amarillo cremosas y en adultos bronce-dorada [45]. Además, las superficies dorsales en las extremidades inferiores presentan una tonalidad marrón pálido con maracas transversales en marrón oscuro. El iris de esta especie se caracteriza porque presenta un color bronce oscuro con reticulaciones y una banda horizontal cafés oscuras [30,45,47], véase Figura 1.



Figura 1: Ejemplar de *L. lineatus*. Esta especie de anuro se distribuye ampliamente en la cuenca amazónica y se caracteriza por su dorso negro y rayas dorsolaterales que varía entre amarillo-bronce.

Fuente: Ron y FaunaWebEcuador, 2022 [30].

Es una especie con actividad diurna y su reproducción está asociada a hormigas cortadoras de hojas (*Atta cephalotes*) [46–48]. Esta especie deposita sus huevos en un nido de espuma que se encuentra en pozos superficiales o subterráneo [30,48]. Los renacuajos son rosados y su cuerpo se encuentra vascularizada para captar el escaso oxígeno presente en su hábitat (pozos de agua) [30,48].

1.2. Planteamiento del problema

El incremento de la resistencia antimicrobiana a los fármacos convencionales se asocia principalmente al uso indebido y excesivo de fármacos, la liberación de compuestos tóxicos en las aguas y suelos, el desarrollo industrial, el crecimiento urbanístico, la ingesta de fármacos antimicrobianos en alimentos y la transmisión de microorganismos resistentes de los animales [49–55]. Esto ha provocado que los antibióticos se vuelvan menos efectivos, ocasionando que cada vez nos quedemos sin alternativas terapéuticas para tratar las enfermedades infecciosas [27,49,51]. Además, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un desafío creciente y constituye una amenaza para la salud. Debido a que, los pacientes corren el riesgo de tener resultados clínicos adversos, como: la prolongación de una enfermedad infecciosa puede llegar a producir la muerte. Incluso los costos hospitalarios se incrementan, dada la necesidad de utilizar dosis más altas, no obstante, las bajas condiciones socioeconómicas de muchas familias no les permiten acceder a estos tratamientos, ocasionando que aumente la mortalidad [50,52,55].

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de su Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana realizó un estudio en 22 países donde evidenció la resistencia generalizada de: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella spp.* [55,56]. Dado que, la resistencia a los antibióticos en todo el mundo se está acercando a niveles peligrosos, la OMS promueve que los gobiernos establezcan políticas que incentiven la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos fármacos [52]. Además, en el Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) determinó que las especies de bacterias más resistentes son: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* [57,58].

Bajo esta problemática, es imperativo la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. La naturaleza es por excelencia una importante fuente de estos compuestos bioactivos [59]. Dado que, los organismos en su hábitat se han visto obligados a desarrollar estrategias para su defensa o competencia, de esta forma se puede obtener compuestos bioactivos en las plantas, organismos marinos, microorganismos, hongos, insectos, anfibios, entre otros [12,20,59].

1.3. Justificación de la investigación

El potencial farmacológico de las secreciones cutáneas de los anfibios ha sido ampliamente descrita y caracterizada mundialmente [2]. Además, la piel de los anfibios han demostrado ser una fuente importante de moléculas con valor biomédico, útiles para el desarrollo de nuevos antimicrobianos [5,9–12]. Así mismo, a pesar de la alta diversidad de anfibios que posee el Ecuador (658 especies), muy pocos estudios se han realizado en torno al potencial biomédico de los AMPs [30]. Con esto en mente, Ecuador no puede quedar exento de realizar investigaciones en este campo.

Dicho esto, *Lithodytes lineatus* es una especie de rana perteneciente a la subfamilia Leptodactylinae, de la cual se han descrito péptidos con actividad antimicrobiana en especímenes, como: *Leptodactylus ocellatus*, *L. lantrons*, *L. labyrinthicus*, *Physalaemus nattereri*, *L. pustulatus*, *L. nesiotus*, entre otros [14,36,37,39,40,60,61]. Así mismo, un estudio exploratorio realizado en el parque “La Isla” Tena-Ecuador, demostró que las secreciones cutáneas de 4 especies de anfibios: *Scinax ruber*, *L. lineatus*, *L. discodactylus* y *Dendropsophus rhodopeplus* presentan actividad antimicrobiana en contra de al menos un microorganismo (ya sea bacteria u hongo). Entre ellas, las secreciones de *L. lineatus* mostraron amplios espectros de actividad (inhibiendo a 6/8 microorganismos analizados) y por ello fue elegida para este estudio [62]. Cabe recalcar

que, el perfil peptídico de la secreción cutánea de *L. lineatus* no ha sido investigado; por lo tanto, la caracterización estructural y biológica de sus compuestos significa una oportunidad inestimable de descubrir y describir nuevos compuestos químicos biológicamente activos, con potencial aplicación farmacéutica.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. General

Analizar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de *Lithodytes lineatus* y caracterizar la estructura primaria de un péptido que presente actividad antimicrobiana

1.4.2. Específicos

- Evaluar la actividad antibacterial y antifúngica de las fracciones aisladas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en contra de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*
- Caracterizar la estructura primaria de cinco péptidos presentes en las secreciones de *L. lineatus* mediante clonación molecular
- Sintetizar un péptido antimicrobiano y determinar la potencia y actividad bacteriostática o bactericida en contra de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*
- Determinar el grado de hemólisis del péptido sintetizado

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Recolección de especímenes de *Lithodytes lineatus*

En este estudio se emplearon seis especímenes de *L. lineatus*: cinco adultos silvestres recolectados en diferentes localidades de la provincia de Napo y un espécimen adulto cautivo proporcionado por el Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios (véase Tabla S1, anexos). Todos los individuos colectados fueron transportados al laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para la extracción de las secreciones cutáneas. Una vez que se obtuvieron las secreciones crudas, los especímenes fueron devueltos a su hábitat natural. Finalmente, el permiso para el acceso a los recursos genéticos fue proporcionado por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAE), bajo el contrato marco: MAE-DNB-CM-2016-0051.

2.2. Extracción de las secreciones cutáneas de *Lithodytes lineatus*

Las secreciones cutáneas de *L. lineatus* fueron extraídas mediante estimulación manual por medio de un masaje suave en la zona dorsal del espécimen. Luego, las secreciones blanquecinas se lavaron con agua destilada. Las muestras obtenidas se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C durante 24 horas. Finalmente, las muestras se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

2.3. Fraccionamiento de las secreciones cutáneas de *L. lineatus*

2.3.1. Fraccionamiento por HPLC en fase reversa de la secreción total

La secreción liofilizada fue fraccionada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC de Waters). Primero, se pesaron 3 mg de la secreción y se disolvieron en 200 µL de Buffer A (H₂O al 99,95%, ácido trifluoroacético TFA al 0,05%), luego se clarificó por centrifugación a 16000 g (fuerza G o RCF: fuerza centrífuga relativa) durante 10 minutos y se filtró con una membrana de 0,22 µm (Fisherbrand Sterile Syringe PES, Acrylic). Seguidamente, 50 µL de la muestra filtrada se sometió a RP-HPLC empleando un sistema de HPLC con un detector dual UV-Vis 12 2489 en el rango de 214 y 280 nm, bombas e inyector 2545, colector de fracciones III (Waters, USA) y equipado con una columna analítica C-18 (Phenomenex Jupiter; 4,6 × 250 mm). Los péptidos eluyeron con un gradiente lineal formado por 95% del buffer A y 5% del buffer B (acetonitrilo ACN al 99,95%, TFA al 0,05%) hasta el 100% del buffer B, durante 120 minutos a un caudal de 1 mL/min. La recolección de las fracciones se realizó

manualmente para cada pico visualizado en el cromatograma. Finalmente, se realizó alícuotas de 200 μ L de cada fracción y las muestras se guardaron a 4°C.

2.3.2. Actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC

Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana empleando las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Para lo cual, 200 μ L de cada fracción se concentraron al vacío durante 3 horas a 21°C. Luego, las muestras fueron resuspendidas en 20 μ L de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Previamente, se reanimaron *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, para lo cual se transfirió 100 μ L de un cultivo crio conservado en 15 mL de Caldo Mueller Hinton (MHB) y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación a 150 rpm. Luego, se transfirieron 500 μ L de cada medio de cultivo, a una nueva botella con 20 mL de MHB y se incubó con agitación a 150 rpm (revoluciones por minuto) y 37°C hasta obtener 1×10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia por cada mililitro). Para el ensayo, se inocularon 20 μ L del microorganismo en una placa Petri con Agar Mueller Hinton (MHA), el inóculo se distribuyó homogéneamente con un hisopo estéril. Seguidamente, con una pipeta Pasteur se retiraron 27 tampones de agar de cada placa. En cada pocillo se agregaron 2 μ L de cada fracción, este ensayo se realizó por triplicado para cada microorganismo y como control negativo se empleó PBS. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche y se visualizó la actividad antimicrobiana a través de la formación de halos de inhibición.

2.3.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF de las fracciones con actividad antimicrobiana

Las masas moleculares de las fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Desorción/ionización por láser asistida en matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo) en modo reflectrón positivo, en un espectrómetro de masas Axima Performance (Shimadzu). Para ello, se colocaron 2 μ L de cada fracción más 1 μ L de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 10 mg/mL) en la placa de muestras MALDI y se dejaron secar. Posteriormente, se analizaron las fracciones con los siguientes ajustes del equipo: el rango del espectro de masas fue de 1000 a 5000 Da, número de disparos del láser 2/espectro y una potencia de 40 V.

2.4. Clonaje Molecular

2.4.1. Extracción del ARNm de las secreciones totales de *L. lineatus*

El ARN total de las secreciones se extrajo mediante el kit SV Total RNA Isolation System. En resumen, 5 mg de la secreción liofilizada fueron diluidos en 175 μ L del buffer de lisis y se homogenizó. Luego, se agregaron 350 μ L del buffer de dilución, inmediatamente se incubó a 70°C durante tres minutos y se centrifugó a 14000 g durante 10 min. El ARN total se separó empleando una columna de centrifugado, para lo cual se agregaron 50 μ L del buffer de incubación de DNasa y se incubó a 21°C durante 15 min. Luego se añadieron 200 μ L del buffer de Stop DNasa y se centrifugó a 14000 g durante 1 min. El ARN total se recuperó con un lavado con 100 μ L agua libre de nucleasas. Por otro lado, para recuperar el ARNm se utilizó el Kit PolyATtract® mRNA Isolation Systems. En resumen, al ARN total se agregaron 3 μ L de Oligo-dT biotinilados y 13 μ L 20X SSC; y se incubó a 21°C durante 10 min. El ARNm poliadenilado se separó utilizando partículas paramagnéticas acopladas a estreptavidina, se incubó a 21°C durante 10 min y se lavó con el buffer 0,1X SSC. El ARNm se recuperó con 40 μ L agua libre de nucleasas (dos lavados de 20 μ L). Finalmente, el ARNm total aislado se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.4.2. Construcción de las librerías 3'ADNc

Se efectuó la transcripción reversa de 4 μ L del ARNm previamente extraído, esto permitirá obtener la cadena 3'ADNc. Para ello, la muestra de ARNm del paso anterior fue concentrada al vacío hasta un volumen de 20 μ L. Luego se utilizó el kit GoScript™ Reverse Transcription System para preparar el ADNc. En resumen, 4 μ L del ARNm y 1 μ L del primer 3'CDS 20 μ M (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT30V N-3'; V = A, C, o G, N = A, T, C, o G) se incubaron a 70 °C durante 5 minutos en el termociclador. Luego, se añadieron 15 μ L de la Master Mix preparada con: 5,8 μ L H₂O, 4 μ L Buffer GoScript 5X, 3,2 μ L MgCl₂ 5 mM, 1 μ L dNTPs 10 mM y 1 μ L la enzima GoScript retro transcriptasa. Se incubó la reacción a 25°C por 5 min, luego a 42°C durante 60 min y a 70°C por 7 min. Finalmente, se guardó la librería 3'ADNc a -20°C. Este proceso se realizó 4 veces.

2.4.3. RACE PCR de las librerías 3'ADNc

Se empleó la librería construida previamente para obtener las secuencias nucleotídicas de los péptidos que transcribe *L. lineatus*. Primero, se preparó una Master Mix, para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que está constituida de: 8,5 μ L de H₂O tipo PCR, 4 μ L del Buffer Green 5X, 0,9 μ L del MgCl₂ 1,5 mM, 0,4 μ L de dNTPs 10 mM, 0,5 μ L del primer forward DERMO-PDS (5'-GAC CAA AGA TGT CWT TCT TGA AGA AAT-3') 20 μ M, 0,5 μ L del primer reverse NUP (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-

3') 20 μM , 0,2 μL de la enzima GoTaq polimerasa y 5 μL de la librería. Además, el control negativo para cada repetición se preparó adicionando 15 μL de la Master Mix y 5 μL de agua en lugar de la librería. Luego las muestras se colocaron en el termociclador y los parámetros de los ciclos fueron los siguientes: 1 ciclo de 94°C/60 s; 40 ciclos de 94°C/30 s, 59 y 61°C/30 s y 72°C/ 180 s; y 1 ciclo de 72°C/600 s.

2.4.4. Electroforesis de los productos de la RACE PCR

Los productos de la RACE PCR se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa. Primero, se preparó agarosa al 2% con el buffer TBE 1x. En el gel de agarosa se cargaron 5 μL del marcador de peso molecular 100 pb (pares de bases) de Promega y 5 μL de cada producto de RACE PCR con su respectivo control negativo. La corrida electroforética fue configurada con los siguientes parámetros: 400 miliamperios y 70 V durante 60 minutos. Una vez terminada la corrida, se tiñeron las bandas de ADN con el tinte Diamond™ Nucleic Acid Dye de Promega, para lo cual, se preparó la solución de tinción con 5 μL del tinte junto a 50 mL del buffer TBE 1x reciclado. Luego, el gel se incubó en la solución de tinción a 22°C en un agitador orbital a 60 rpm durante 35 minutos. Finalmente, se visualizó el gel en el fotodocumentador con luz UV.

2.4.5. Purificación de los productos de las RACE PCR

Los productos de la PCR, de entre 400 y 500 pb, se purificaron utilizando el kit de purificación PureLink PCR (de Invitrogen™). En primer lugar, se determinó el volumen de los productos de PCR seleccionados. Luego, se agregaron 4 volúmenes del buffer de unión a 1 volumen del producto de PCR y se homogenizó. Luego, se transfirió a una columna de centrifugado y se centrifugó a 10000 g durante 1 min. El ADN se lavó con 650 μL del buffer de lavado y se centrifugó a 10000 g durante 1 min y luego se volvió a centrifugar a 14000 g durante 3 min. Finalmente, se agregaron 50 μL del buffer de elución a la columna que contenía el ADN y se incubó a 21°C durante 1 min. El ADN se recuperó por centrifugación a 14000 g durante 2 min.

2.4.6. Ligación al vector pGEM-T Easy

Los productos purificados se ligaron al sistema pGEM-T Easy Vector (Promega). Para ello, se preparó un Master Mix constituida de: 2,5 μL de 2X Rapid Ligation Buffer, 0,5 μL del pGEM-T Easy Vector 50 ng, 1 μL del producto purificado 22,5 ng, 0,5 μL de la T4 DNA Ligasa 3 weiss units/ μl y 0,5 μL de agua desionizada, volumen final de 5 μl .

Finalmente, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (21°C) y luego toda la noche a 4°C.

2.4.7. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó utilizando células competentes de alta eficiencia *E. coli* DH5- α . Para lo cual, se dispensaron 100 μ L de células competentes y 2,3 μ l del producto de ligación con el vector pGEM-T Easy y se incubó en una cama de hielo por 20 minutos. Transcurrido el tiempo establecido, el tubo de Eppendorf con la solución de bacterias *E. coli* y el producto de ligación se incubaron en el termobloque a 42°C durante 45 segundos y después en hielo durante 2 min. Luego, se agregaron 950 μ L de medio SOC y se incubó a 37 °C con agitación a 150 rpm durante 110 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se inocularon 100 μ L de las bacterias transformadas en placas con medio MacConkey y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Finalmente, se seleccionaron las colonias blancas/transparente y con un palillo estéril se subcultivaron en una placa con medio MacConkey. Se eligieron 100 colonias transformadas y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

2.4.8. PCR de colonias y visualización de los productos por electroforesis

Cada colonia transformada del paso anterior fue resuspendidas en 20 μ L de agua estéril. Luego, las muestras fueron incubadas a 100°C por 5 min y luego en hielo por 5 min. El ADN plasmídico se separó por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante.

El ADN plasmídico se amplificó por PCR. Para ello, se preparó una Master mix constituida por: 14,8 μ L de H₂O tipo PCR, 5 μ L del Buffer Green 5X, 0,8 μ L del MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ L de dNTPs 10 mM, 1,25 μ L del primer M13F (5'-GTA ACG CCA GGG TTT TCC CAC-3') 10 μ M, 1,25 μ L del primer M13R (5'-TGT GAG CGG ATA ACA ATT TCA C-3') 10 μ M, 0,125 μ L de la enzima GoTaq polimerasa y 1,25 μ L del ADN plasmídico. Luego las muestras se colocaron en el termociclador y los parámetros de los ciclos fueron los siguientes: 1 ciclo de 94°C/60 s; 30 ciclos de 94°C/30 s, 55°C/30 s y 72°C/180 s; y 1 ciclo de 72°C/600 s. Finalmente, la visualización de los productos de PCR se siguió la metodología empleada en la visualización de los productos del RACE PCR, de la sección 2.4.4.

2.4.9. Secuenciación de los precursores peptídicos

Los productos de la PCR del paso previo que presentaron un tamaño de banda de 600 pb fueron seleccionados para secuenciar empleando el método Sanger en el Laboratorio de la Universidad de las Américas. Para esto, se enviaron alícuotas de 10 μ L y se solicitó la purificación de las muestras previo al secuenciamiento.

2.4.10. Análisis e identificación de los péptidos codificados de ADNc

Se utilizó el software libre MEGA X para el análisis de las secuencias de los péptidos. Luego, las secuencias fueron analizadas comparándolas con las bases de datos de NCBI (Centro Nacional de información Biotecnológica) para verificar coincidencias con otras secuencias, mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) BLASTn (para nucleótidos) y BLASTp (para aminoácidos) [63,64]. Los parámetros empleados en BLASTn fueron: organismo “frogs & todas (taxid:8342)” y el algoritmo discontinuous megablast, mientras que, los parámetros para BLASTp fueron: base de datos estándar y el algoritmo blastp. Además, los resultados obtenidos de BLASTn y BLASTp se filtraron de acuerdo con el porcentaje de cobertura. Se obtuvo la masa molecular teórica del péptido empleando el software libre Peptide Mass Calculator V 3.2 [65]. Por otro lado, se realizó la predicción de la estructura secundaria empleando los softwares libres Jpred 4 y el servidor automático para la predicción de estructuras secundarias de proteínas PHD [66,67]. Además, la estructura 3D fue predicha por el software I-TASSER [68]. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas empleado el programa de computadora Bachem Peptide Calculator y Heliquest [69,70].

2.5. Secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem

Se realizó espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de la secreción liofilizada para conocer la secuencia de los péptidos maduros. Primero, se diluyó 1 mg de secreción liofilizada en 500 μ l del buffer A (H_2O al 99,99% y ácido fórmico al 0,01 %), la muestra fue clarificada por centrifugación a 16000 g durante 1 min, este proceso se realizó 3 veces, y se filtró en una membrana de 0,22 μ m (Fisherbrand Sterile Syringe PES, Acrylic). Luego, se inyectaron 10 μ l en la columna UPLC C-18 (Phenomenex C-18; 4,6 x 150 mm) del sistema de UPLC-QTOF (Waters). La secreción se fraccionó primero en un gradiente lineal de 100 % de buffer A (99,9 % de H_2O y 0,1 % de ácido fórmico) a 100 % del buffer B (19,9 % de H_2O , 80 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) durante 23 min a una tasa de flujo de 10 μ L/min. Los parámetros para la espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (QTOF) fueron: el método de adquisición de datos fue DDA (Adquisición dependiente de datos), un umbral para cambiar de y volver a MS/MS de Th: 10^3 y la energía de colisión fue: 60-80 V.

Los datos obtenidos fueron analizados en el software Mascot Distiller. Primero, se elaboró una base de datos con los péptidos maduros identificados en especímenes relacionados a *Lithodytes lineatus*. Los datos de MS/MS y péptidos maduros se cargan en el programa. Luego, el equipo detecta picos al intentar ajustar una distribución isotópica ideal a los datos experimentales. Seguidamente, el perfil de la distribución ideal se ajusta variando la masa, la resolución, la intensidad y el estado de carga, para maximizar la correlación con los datos experimentales. Una vez que se ha obtenido el mejor ajuste, el equipo reporta una lista de picos y la señal correspondiente.

2.6. Síntesis en fase sólida del péptido lineatina-2

El péptido lineatina-2 fue seleccionada para la síntesis porque mostró características físicoquímicas, como: una buena hidrofobicidad (0,82), una propensión para adoptar una conformación α -helicoidal, es anfipático y presenta una carga neta positiva de + 4,1, similares a péptidos con actividad biológica. Además, el péptido fue corroborado mediante espectrometría de masas.

La síntesis del péptido, lineatina-2, se realizó mediante síntesis química en fase sólida usando la estrategia FMOC en un sintetizador automático de péptidos por microondas (Liberty Blue 909410- CEM Corporation). La resina usada para péptidos ácidos fue Fmoc Rink amide (HL), para la desprotección de los grupos aminos se usó piperidina 20% (v/v), para la activación se usó diisopropilcarbodiimida (DIC) 1M y Oxyma base 1M. Después de cada etapa de desprotección y acoplamiento se realizó un lavado con Dimetilformamida (DMF). Una vez sintetizado todo el péptido se escindió del soporte sólido y se eliminaron todos los grupos protectores mediante una solución ácida de TFA: triisopropil silano (TIPS): dioxo-1,-óctani-diotil (DODT): H₂O (92,5%:2,5%:2,5%:2,5%). Luego, el péptido se precipitó con éter dietílico. Posteriormente, se liofilizó a -80 °C.

Por otro lado, la pureza del péptido fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con un detector dual UV-Vis 12 2489 en el rango de 214 y 280 nm, bombas e inyector 2545, colector de fracciones III (Waters, USA) y equipado con una columna analítica C-18 (Phenomenex Jupiter; 4,6 × 250 mm). En resumen, se pesó 1 mg de péptido crudo y se disolvió en 500 μ l del buffer A (H₂O al 99,95% y TFA al 0,05%). La separación se realizó mediante un gradiente lineal desde 70% del buffer A al 100% del buffer B (ACN al 99,95% y TFA al 0,05%) con un flujo de 1 mL/min durante 40 minutos. Además, se corroboró la masa molecular, mediante MALDI-TOF MS, en un espectrómetro de masas Axima Performance (Shimadzu). Para

ello, se colocaron 2 μL del péptido sintetizado más 1 μL de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 10 mg/mL) en la placa de muestras MALDI y se dejaron secar. Posteriormente, se analizó el péptido con los siguientes ajustes del equipo: el rango del espectro de masas fue de 1000 a 5000 Da, número de disparos del láser 2/espectro y una potencia de 40 V.

2.7. Ensayos biológicos

2.7.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del péptido sintetizado

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del péptido sintético se determinó en contra de: *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (hongo). Primero, se prepararon diluciones seriadas del péptido sintético en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1×10^2 mg/L. Los microorganismos en fase exponencial se diluyeron hasta obtener 1×10^6 UFC/mL para las bacterias y 1×10^5 UFC/mL para el hongo. Luego, se colocaron 2 μl de cada dilución de péptido y se agregaron 198 μl del microorganismo a analizar en una placa de 96 pocillos. Como control negativo se empleó el caldo Mueller Hinton estéril (MHB), mientras que, el segundo control se preparó con 198 μl de cultivo microbiano y 2 μL de DMSO en lugar del péptido sintético. Se prepararon 7 réplicas del ensayo. La placa de 96 pocillos se incubó a 37°C durante 18 horas. Después, se midió la absorbancia a 550nm en un lector de microplacas (GloMax® Discover, Promega). Para determinar la CMI se identificaron los pocillos que no presentaban crecimiento microbiano. Este experimento se realizó en triplicado. Además, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), para lo cual, 10 μL de cada concentración de péptido que no presentó crecimiento se subcultivo en placas de Agar Muller Hinton y se incubó a 37°C durante toda la noche. La CBM se determinó como aquella concentración mínima donde no creció el microorganismo. Finalmente, el experimento se replicó tres veces.

2.7.2. Actividad hemolítica del péptido sintetizado

La actividad hemolítica del péptido lineatina-2 se evaluó a las concentraciones empleadas en los ensayos de actividad antimicrobiana. En resumen, se prepararon 50 mL de una solución de glóbulos rojos al 4% (v/v) del grupo sanguíneo O positivo. Luego, se mezclaron 200 μl de la suspensión de glóbulos rojos (4%) con 200 μl de cada concentración de péptido (512 a 1×10^2 mg/L). El control negativo se preparó adicionando 200 μl de glóbulos rojos y 200 μl de PBS en lugar de péptido. Mientras que, el control positivo se preparó con 200 μl de glóbulos rojos, 195 μl de PBS y 5 μl Triton X-

100. Los tubos fueron incubados durante 120 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos. La lisis de los glóbulos rojos se analizó en el lector de microplacas (GloMax® Discover, Promega) a una longitud de onda de 570 nm.

Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de hemólisis con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{(A - A_0)}{(A_x - A_0)} * 100$$

Donde:

%H = porcentaje de hemólisis

A = al valor de la densidad óptica (OD) de la concentración del péptido

A₀ = OD del control negativo

A_x = OD del control positivo

A su vez, con los datos de porcentaje se calculó la concentración hemolítica media (CH₅₀), que es la concentración a la que una dosis del péptido sintético generó el 50% de hemólisis, mediante la calculadora AAT Bioquest – Calculadora EC50 (<https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>) [71].

2.8. Análisis estadístico

Los ensayos biológicos se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba post hoc de Dunnett usando el programa estadístico GraphPad Prism 8. Además, los datos son presentados como el promedio ± la desviación estándar. Finalmente, el nivel de significancia se estableció con p < 0,05.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Fraccionamiento de la secreción cutánea de *L. lineatus* y actividad biológica de las fracciones

El perfil cromatográfico de la secreción de *L. lineatus* reveló la presencia de varios picos a una longitud de onda de 214 nm. Adicionalmente, el fraccionamiento por RP-HPLC (columna C-18) a partir de un pool de muestras de exudados cutáneos de *L. lineatus* permitieron coleccionar 61 fracciones. En cada fracción se analizó la actividad antimicrobiana en contra de: *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (véase tabla 1). Diez fracciones marcadas con un número en el perfil cromatográfico de la figura 1 presentaron actividad antibacteriana inhibiendo a *E. coli*. Así mismo, las muestras marcadas con un asterisco (*) en la misma figura también inhibieron a *S. aureus*. Sin embargo, ninguna de las fracciones analizadas mostró actividad biológica en contra de *C. albicans*, véase tabla 1.

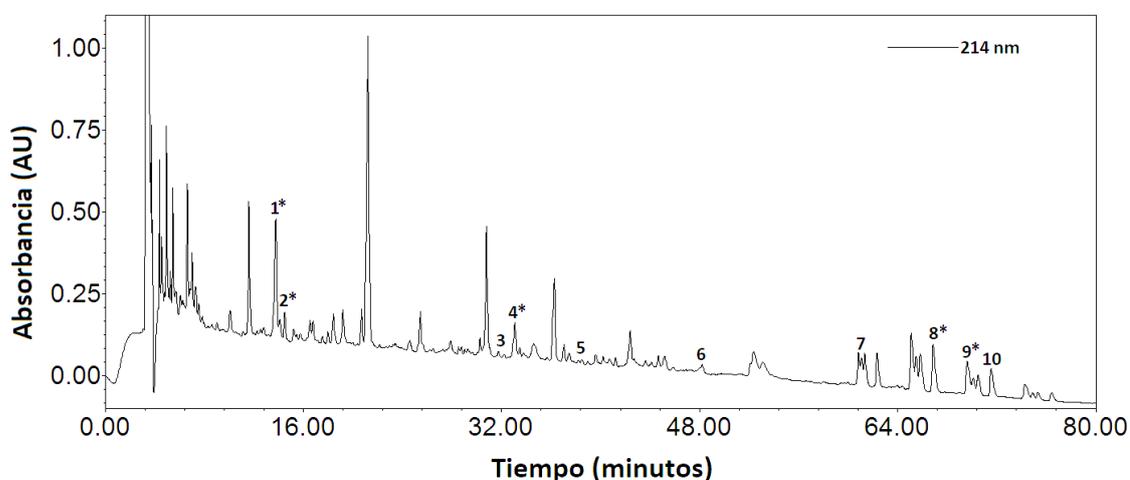


Figura 2: Perfil cromatográfico de la secreción cutánea de *Lithodytes lineatus* mediante RP-HPLC. Los picos que presentaron actividad biológica en contra de *E. coli* están marcados con un número y lo que también mostraron actividad en contra de *S. aureus* con un asterisco.

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de 61 fracciones obtenidas por HPLC. El signo “+” significa que la fracción inhibió el crecimiento del microorganismos, caso contrario ocurre con el signo “-”. Además, las fracciones que no se muestran no exhibieron actividad biológica en contras de los microorganismos probados.

| Número de fracción | | Actividad antimicrobiana | | | Masa (Da) |
|--------------------|--------------|--------------------------|------------------|--------------------|-----------|
| HPLC | Cromatograma | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | Maldi-TOF |
| f-10 | 1* | + | + | - | ND |
| f-11 | 2* | + | + | - | ND |
| f-25 | 3 | + | - | - | ND |
| f-26 | 4* | + | + | - | 1312,42 |
| f-32 | 5 | + | - | - | ND |
| f-39 | 6 | + | - | - | ND |
| f-45 | 7 | + | - | - | 1737,29 |
| f-49 | 8* | + | + | - | ND |
| f-50 | 9* | + | + | - | ND |
| f-52 | 10 | + | - | - | ND |

ND : no determinado

3.2. Clonaje molecular de las secuencias de precursores

A partir de un pool de muestras de secreciones cutáneas de *Lithodytes lineatus* se identificaron tres secuencias de nucleótidos, de longitud completa, que codifican pro-péptidos. Los marcos abiertos de lectura (ORF) de estas secuencias constan de 186 a 264 nucleótidos que se traducen en una estructura tripartita, conformada por: un péptido señal, una región ácida y el péptido maduro. La región no traducida (3'UTR) consta de una región variable de 88 a 152 nucleótidos y la cola poli A de 23 a 30 nucleótidos.

El péptido Lineatina-1 consta de un péptido señal de 22 residuos seguido por una región ácida de 22 residuos con tres sitios de procesamiento (KR) y un precursor de péptido maduro de 45 residuos con un sitio de procesamiento KR, generando dos péptidos de 13 y 30 residuos (lineatina-1a y 1b, respectivamente) (figura 2a y figura 3). El péptido Lineatina-2 muestra un péptido señal de 22 residuos continuado por una región ácida de 16 residuos con dos sitios de procesamiento KR y un péptido maduro amidado en el C-terminal de 22 residuos (figura 2b y figura 3). Finalmente, Lineatina-3 consta de un péptido señal de 22 residuos seguido por una región ácida de 10 residuos con dos sitios de procesamiento KR y un péptido maduro de 47 residuos con un sitio de procesamiento KK, generando dos péptidos de 13 y 30 residuos, denominados Lineatina-3a y Lineatina-3b respectivamente (figura 2c y figura 3). Lineatina-3b es un péptido maduro amidado

en el C-terminal. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los pro-péptidos se muestran en la figura 2.

(a) **Lineatina-1**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | S | F | L | K | K | S | L | F | L | V | L | F | L | G | L | V | S |
| 1 | ATGTCTTTCTTGAAGAAATCTCTGTTTCCTTGTACTATTCCCTTGGATTGGTCTCC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>C</u> <i>D</i> <i>E</i> <i>E</i> K R <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>G</i> <i>E</i> <i>M</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | ATTTCCATCTGTGATGAAGAGAAAAGAGAGGAAGAAGGAGAAAATGGAAGAAGAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | K R <i>I</i> <i>Y</i> K R <i>D</i> <i>S</i> <i>M</i> <i>D</i> <i>V</i> <i>I</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>T</i> <i>E</i> <i>C</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 109 | AAGAGAATTTATAAACGTGACTCTATGGATGTTATAGCTGCAGCAACCGAATGT | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T K R <i>I</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>S</i> <i>D</i> <i>L</i> <i>T</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>S</i> <i>N</i> <i>I</i> <i>K</i> <i>S</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 163 | ACAAAGCGCATACTAAAAACAGTGATCTAACTTCTTTAAGTAATATTAAAAGT | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>H</i> <i>A</i> <i>K</i> <i>E</i> <i>V</i> <i>S</i> <i>A</i> <i>C</i> <i>V</i> <i>K</i> <i>Q</i> <i>R</i> <i>M</i> <i>S</i> <i>S</i> * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 217 | CACGCAAAGGGAAGTAAGTGCATGTGTTAAGCAGAGGATGAGCTCCTAAAAGTGA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 271 | TATAAAAAGGAATCTATTGAAAGTAAAAGCTTATCTTACATAAAGATGTCACCA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 325 | GAATGCAATTTTTCTATGAGATCACAATTATTACTAGTGTCACATGATAATAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 379 | AGTATATTAGCCCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(b) **Lineatina-2**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | S | F | L | K | K | S | L | F | L | V | L | F | L | G | L | V | S |
| 1 | ATGTCTTTCTTGAAGAAATCTCTATTTCCTTGTACTATTCCCTTGGATTGGTCTCC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>C</u> <i>D</i> <i>E</i> <i>E</i> K R <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>K</i> <i>L</i> <i>H</i> <i>E</i> <i>Q</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | CTTTCCATCTGTGATGAAGAGAAAAGAGAGGAAGAAGAGAAACTCCATGAACAG | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | K R <i>I</i> <i>L</i> <i>P</i> <i>L</i> <i>L</i> <i>I</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>K</i> <i>V</i> <i>I</i> <i>P</i> <i>K</i> <i>I</i> <i>H</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 109 | AAGAGAATATTACCATTGTTAATAACTGCAGCAAAAAGTAATTCCAAAGATACAC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>S</i> <i>F</i> <i>F</i> <i>K</i> <i>N</i> <i>L</i> <i>G</i> * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 163 | AGTTTTTTTTAAAAATTTAGGATAAAAATCCATAAAGGTGTCACCAGACTCAATGT | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 217 | CTCCTAAGACCGCACAAATTATTACTAGTGCCCTAATAATAAAGCATATTTAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 271 | CCAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(c) **Lineatina-3**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | S | F | L | K | K | S | L | F | L | V | L | F | L | G | L | V | S |
| 1 | ATGTCATTCTTGAAGAAATCGCTGTTTCTTGTGCTATTCCCTTGGATTGGTCTCC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>C</u> <i>D</i> <i>E</i> <i>E</i> K R <i>E</i> <i>E</i> <i>E</i> <i>K</i> R <i>S</i> <i>Q</i> <i>E</i> <i>S</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | CTTTCCATCTGTGATGAAGAGAAAAGAGAGGAAGAAGAAAAGTCAAGAAAGT | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>D</i> <i>W</i> <i>Q</i> <i>K</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>D</i> <i>K</i> <i>M</i> <i>Q</i> <i>E</i> <i>C</i> <i>T</i> <i>Q</i> <i>R</i> <i>V</i> <i>L</i> <i>K</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 109 | GATTGGCAAAAAGCTGTAGATAAAAATGCAGGAATGTACACAGCGTGTATTTAAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | K <i>S</i> <i>G</i> <i>P</i> <i>Y</i> <i>S</i> <i>P</i> <i>S</i> <i>E</i> <i>I</i> <i>N</i> <i>Q</i> <i>N</i> <i>M</i> <i>L</i> <i>Q</i> <i>I</i> <i>I</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 163 | AAGAGTGGTCCGTATTCTCCTAGTGAAATAAACCAAATATGCTGCAATAAATC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>E</i> <i>C</i> <i>S</i> <i>K</i> <i>A</i> <i>L</i> <i>S</i> <i>G</i> * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 217 | GAATGTTCCAAAGCTCTCAGCGGATAGTAAAAACATAATTGTGAATGAAGATGTC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 271 | ACCAAAATGCAATATTTCTTAAGACCGCACAAATCATTACTAGTGCCATAATACA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 325 | ATAAAGCAGATTTAACCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 3: Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas traducidas del marco de lectura abierto que codifican a los péptidos Lineatina-1, Lineatina-2 y Lineatina-3. Los péptidos señal están subrayados, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, los péptidos maduros están resaltados de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR y KK) están en negrita.

```

<-----1-----> <-2-> <3> <-----4----->
Lineatina-1 M S F L K K S L F L V L F L G L V S I S I C D E E K R E E E G E M E E E K R I Y
Lineatina-2 M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C D E E K R E E E E K L H E Q
Lineatina-3 M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C D E E K R E E E

<5> <-----6-----> <7> <8>
Lineatina-1 K R D S M D V I A A A T E C T K R
Lineatina-2 K R I L P L L I T A A K V I P K I H S F F K N L G *
Lineatina-3 K R S Q E S D W Q K A V D K M Q E C T Q R V L K K

<-----9-----> <7>
Lineatina-1 I L K N S D L T S L S N I K S H A K E V S A C V K Q R M S S *
Lineatina-3 S G P Y S P S E I N Q N M L Q I I E C S K A L S G *

```

Figura 4: Secuencias aminoacídicas precursoras de Lineatina-1, Lineatina-2 y Lineatina-3 traducidas del marco abierto de lectura. La estructura de los precursores consiste en: (1) péptido señal; (2,4) espaciadores ácidos; (3,5,8) sitios de procesamiento de péptidos dibásicos; (6,9) péptidos maduros; (7) donantes de amida.

Por otro lado, al someter los ORFs de las secuencias nucleotídicas a un BLASTn, se evidenció que, la secuencia precursora de Lineatina-1 tiene una cobertura de 28% y un 84% de similitud a la filoseptina-15 de *Phyllomedusa hypochondrialis*; mientras que, la secuencia precursora de nucleótidos de Lineatina-2 tiene un 99% de cobertura y un 71% de similitud a filoseptinas de *P. tarsius*, *Agalychnis spurrelli* y *P. coelestis*; y Lineatina-3 presenta una cobertura de 40% y un 77% de similitud a una dermaseptina-AC de *A. callidryas*, véase la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros resultantes al someter los ORFs a un BLASTn. La alineación local se realizó con la secuencia nucleotídica.

| Péptido | Secuencia de consulta | Especie | Cobertura | Porcentaje de Identidad | Valor de E | Número de acceso |
|-------------|-----------------------|---------------------------|-----------|-------------------------|------------|------------------|
| Lineatina-1 | Filoseptina-15 | <i>P. hypochondrialis</i> | 28% | 84,8% | 3,0E-25 | AM292541.1 |
| | Filoseptina-PT | <i>P. tarsius</i> | 99% | 71,1% | 2,0E-31 | LT703448.1 |
| Lineatina-2 | Filoseptina-SP1 | <i>A. spurrelli</i> | 99% | 71,8% | 1,0E-33 | MK766841.1 |
| | Filoseptina-PCo | <i>P. coelestis</i> | 99% | 70,6% | 7,0E-31 | LN999523.1 |
| Lineatina-3 | Dermaseptina-AC | <i>A. callidryas</i> | 40% | 77,6% | 1,0E-22 | MN809621.1 |

Además, al realizar un BLASTp de las secuencias aminoacídicas completas de los péptidos identificados, se observó que, la secuencia de lineatina-1 tiene una cobertura del 87% y una similitud de 48% con la dermaseptina-A4 de *A. annae*; Lineatina-2 presenta una cobertura del 100% y 49% de similitud con la filoseptina-PV1 de *P. vaillantii* y 47% con la filoseptina-PCo de *P. coelestis*; y lineatina-3 tiene una cobertura del 87% y una similitud del 44% a una dermaseptina-PH de *P. hypochondrialis*, véase Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros resultantes al someter las secuencias aminoacídicas a un BLASTp. La alineación local se realizó con la secuencia aminoacídica completa traducida del ORFs.

| Péptido | Secuencia de consulta | Especie | Cobertura | Porcentaje de Identidad | Valor de E | Número de acceso |
|-------------|-----------------------|---------------------------|-----------|-------------------------|------------|------------------|
| Lineatina-1 | Dermaseptina-A4 | <i>A. annae</i> | 87% | 48,6% | 9,0E-03 | O93224.1 |
| Lineatina-2 | Filoseptina-PV1 | <i>P. vaillantii</i> | 100% | 49,2% | 2,0E-06 | QMP81456.1 |
| | Filoseptina-PCo | <i>P. coelestis</i> | 100% | 47,8% | 4,0E-06 | CUX90934.1 |
| Lineatina-3 | Dermaseptina-PH | <i>P. hypochondrialis</i> | 87% | 44,5% | 2,3E-02 | A0A2U8JCR5.1 |

De la misma forma, al realizar un alineamiento con las secuencias que comparte similitud, exhiben aminoácidos conservados en la región del péptido señal y en la región de los espaciadores ácidos. Mientras que, en la región del péptido maduro no comparten aminoácidos conservados típicos de cada familia de péptidos, véase Figura 5.

| | Péptido | Secuencia |
|-----|------------------|---|
| (a) | 1 | 22 |
| | Lineatina-1 | M S F L K K S L F L V L F L G L V S I S I C |
| | Dermaseptin-A4 | . A M . . L . . . |
| | 23 | 43 |
| | Lineatina-1 | D E E K R E E E G E M E E E K R I - Y K R |
| | Dermaseptin-A4 | E N . Q . D D E Q S E E . . |
| | 44 | 67 |
| | Lineatina-1 | D S M D V I A A A T E C T K R I L K N S D L T |
| | Dermaseptin-A4 | G M - - - - - F . N M L . G . G . L A G Q A |
| | 68 | 90 |
| | Lineatina-1 | S L S N I K S H A K E V S A C V K Q R M S S * |
| | Dermaseptin-A4 | A . G A V . T L . G . Q - - - - - |
| (b) | 1 | 22 |
| | Lineatina-2 | M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C |
| | Phylloseptin-PV1 | . A F |
| | Phylloseptin-PCo | . A F F |
| | 23 | 46 |
| | Lineatina-2 | D E E K R E E E E K L H E Q - - - - - K R |
| | Phylloseptin-PV1 | E T . . . E N D . E E D D K S E E . . |
| | Phylloseptin-PCo | E T . . . E N D . E E D D K S E E . . |
| | 47 | 70 |
| | Lineatina-2 | I L P L L I T A A K V I P K I H S F F K N L G * |
| | Phylloseptin-PV1 | F . S . I - - - P . I A G G . A A L V |
| | Phylloseptin-PCo | F . S M I - - - P . I A G G . A S L V |
| (c) | 1 | 22 |
| | Lineatina-3 | M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C |
| | Dermaseptin-PH | . D I I V |
| | 23 | 44 |
| | Lineatina-3 | D E E K R - - E E E - - - - - K R |
| | Dermaseptin-PH | E E N . . . M E Q D D E Q S E M . . |
| | 45 | 68 |
| | Lineatina-3 | S Q E S D W Q K A V D K M Q E C T Q R V L K K S |
| | Dermaseptin-PH | A L - - - - - - - - - - W K E . . . N A |
| | 69 | 93 |
| | Lineatina-3 | G P Y S P S E I N Q N M L Q I I E C S K A L S G * |
| | Dermaseptin-PH | . K A A L N N L V Q G G Q - - - . . |

. : aminoácidos conservados - : gaps añadidos para maximizar la alineación * : codón de parada

Figura 5: Comparación de las secuencias aminoacídicas de los péptidos identificados en *L. lineatus*. a) Comparación de Lineatina-1 con la dermaseptina-A4. b) Comparación

de Lineatina-2 con la filoseptina-PV1 y filoseptina-PCo. c) Comparación de lineatina-3 con la dermaseptina-PH. Los péptidos señales están subrayados, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, los péptidos maduros están resaltadas de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR y KK) está en negrita. La zona marcada de naranja corresponde a los residuos de aminoácidos conservados de las filoseptinas. La zona marcada de verde corresponde a los residuos de aminoácidos conservados de las dermaseptinas.

Aparte de esto, al analizar las secuencias aminoacídicas de los péptidos maduros no se obtuvo resultados significativos al comparar con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando BLASTp. De la misma forma, al comparar con péptidos de la familia ocelatinas, se observa que no comparte aminoácidos conservados, véase figura 6.

| Péptido | Secuencia (aa) |
|---------------|--|
| Lineatina-1a | D S M D V I A A A T E C T |
| Lineatina-1b | I L K N S D L T S L S N I K S H A K E V S A C V K Q R M S S |
| Lineatina-2 | I L P L L I T A A K V I P K I H S F F K N L G |
| Lineatina-3a | S Q E S D W Q K A V D K M Q E C T Q R V L |
| Lineatina-3b | S G P Y S P S E I N Q N M L Q I I E C S K A L S G |
| Ocelatina-PT1 | G V F D I I K D A G K Q L V A H A M G K I A E K V |
| Ocelatina-PT2 | G V F D I I K D A G K Q L V A H A T G K I A E K V |
| Ocelatina-1 | G V V D I L K G A G K D L L A H L V G K I S E K V |
| Ocelatina-2 | G V L D I F K D A A K Q I L A H A A E K Q I |
| Ocelatina-F | G V V D I L K G A A K D I A G H L A S K V M N K L |
| Ocelatina-L1 | G V V D I L K G A A K D L A G H L A T K V M N K L |
| Ocelatina-L2 | G V V D I L K G A A K D L A G H L A I K V M D K L |
| Ocelatina-S | G V L D I L K G A A K D L A G H V A T K V I N K I |
| Ocelatina-V1 | G V V D I L K G A G K D L L A H A L S K L S E K V |
| Ocelatina-V2 | G V L D I L K G A G K D L L A H A L S K I S E K V |
| Ocelatina-K1 | G V V D I L K G A A K D L A G H L A S K V M N K I |
| Ocelatina-LB1 | G V V D I L K G A A K D I A G H L A S K V M |
| Ocelatina-LB2 | G V V D I L K G A A K D I A G H L A S K V M N |

aa: aminoácidos

Figura 6: Comparación de las secuencias aminoacídicas de los péptidos maduros de las lineatinas con 13 ocelatinas identificadas en especímenes de la familia Leptodactylidae. La zona marcada de naranja corresponde a los residuos de aminoácidos conservados de las ocelatinas.

3.3. Características fisicoquímicas de los péptidos identificados

La longitud de los cinco péptidos maduros identificados es variada, puesto que los residuos de aminoácidos varían entre 13 y 30: el péptido más corto es lineatina-1a y el más largo es lineatina-1b, justo en medio se encuentra lineatina-2, lineatina-3a y

lineatina-3b con 22, 21 y 24 aa respectivamente. Lineatina-2 tiene el mayor valor de hidrofobicidad (0,8) seguido de lineatina-3b>lineatina-1a>lineatina-1b>lineatina-3a. Lineatina-1b y lineatina-3b presentan momentos hidrofóbicos similares con un valor de 22%, mientras que, los valores para lineatina-1a, lineatina-2 y lineatina-3a son 29, 45 y 47% respectivamente. Además, dos péptidos tienen una carga neta positiva: lineatina-1b con un valor de +3 y lineatina-2 con +4,1; lineatina-1a y lineatina-3a presentan una carga neta negativa de -3 y -1 respectivamente y lineatina-3b tiene carga neutra (0). Finalmente, lineatina-1b y lineatina-2 presentan valores similares en el punto isoeléctrico de >10. Las características fisicoquímicas de los cinco péptidos se predicen y se tabulan en la tabla 4.

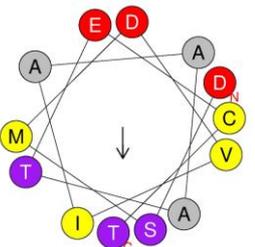
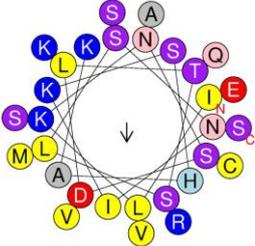
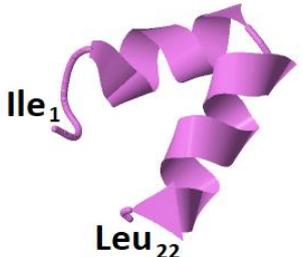
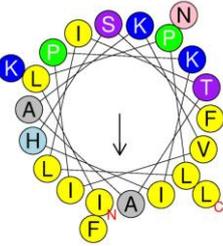
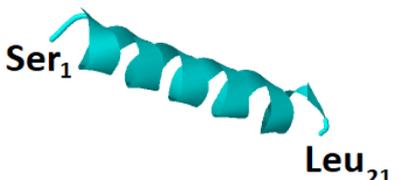
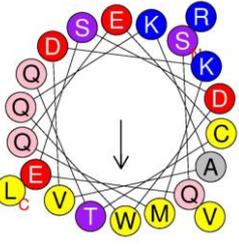
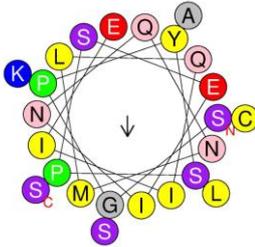
Tabla 4: Características fisicoquímicas de los péptidos identificados en las secreciones de *L. lineatus*.

| Nombre | Secuencia (aa) | Tamaño | Hidrofobicidad | Momento hidrofóbico | Carga a pH 7 | Masa teórica (Da) | pI |
|---------------------|------------------------------------|--------|----------------|---------------------|--------------|-------------------|------|
| Lineatina-1a | DSMDVIAAATECT | 13 | 0,386 | 0,294 | -3 | 1325,55 | 2,9 |
| Lineatina-1b | ILKNSDLTSLSNIKSHAKEVS ACVKQRMSS | 30 | 0,228 | 0,222 | 3 | 3273,72 | 10,2 |
| Lineatina-2 | ILPLLITAAKVIPKIHSFFKNLa | 22 | 0,802 | 0,450 | 4,1 | 2474,55 | 10,3 |
| Lineatina-3a | SQESDWQKAVDKMQECTQ RVL | 21 | 0,141 | 0,479 | -1 | 2508,17 | 4,6 |
| Lineatina-3b | SGPYSPSEINQNMLQIIECSK ALSa | 24 | 0,424 | 0,226 | 0 | 2607,27 | 6,4 |

a: péptido amidado en el extremo C-terminal

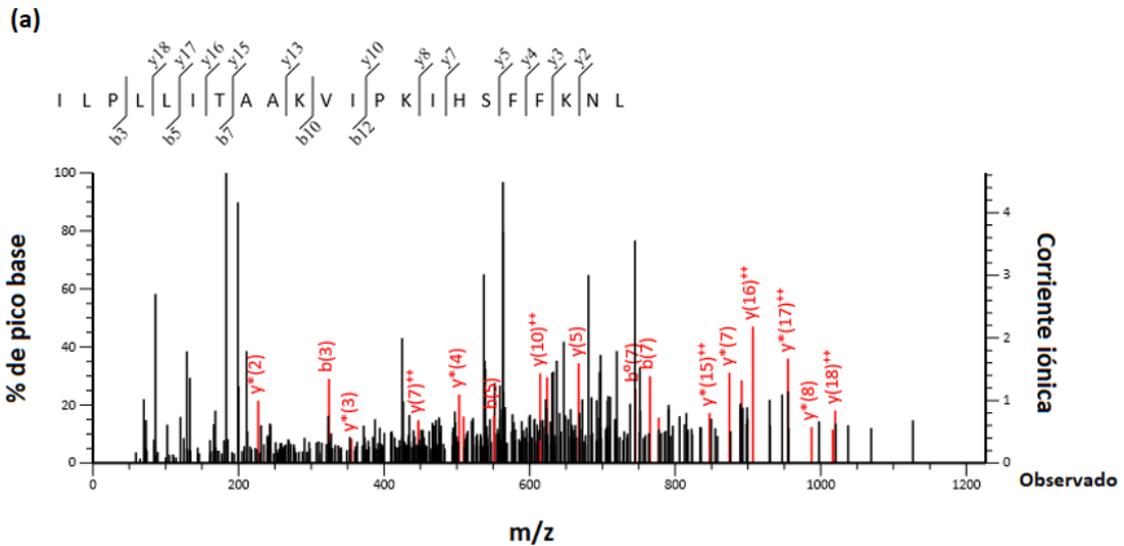
Las estructuras teóricas secundarias predichas por Jpred 4 y PHD revelan una propensión de los péptidos para adoptar una conformación α -helicoidal, el contenido de esta estructura está entre 36-81%, véase tabla 5. Mientras que, las estructuras tridimensionales (3D) predichas por I-TASSER varían entre dos tipos: péptidos con una sola α -hélice para lineatina-1a, lineatina-1b, lineatina-3a y lineatina-3b, y un péptido con dos hélices unidas por un pliegue, para lineatina-2, como se observa en la tabla 5. Además, la proyección de rueda helicoidal de lineatina-2 demuestra que es anfipático, con residuos polares, como: Lys (K) y His (H) alineados en una cara de la hélice y los residuos hidrofóbicos Leu (L), Val (V) e Ile (I) alineados en la cara opuesta, así mismo, lineatina-3a muestra una conformación similar. Sin embargo, la proyección de rueda ilustra una baja anfipaticidad en la conformación de lineatina-1a, lineatina-1b y lineatina-3b (véase tabla 5).

Tabla 5: Predicción de la estructura secundaria mediante Jpred 4 y PHD, predicción de la estructura 3D por I-TASSER y diagramas de rueda helicoidal de los péptidos identificados. El código de color de los aminoácidos para las proyecciones de la rueda: amarillo = no polar hidrofóbico, en gris = Gly y Ala (no polar hidrofóbico), azul = básico, rojo = ácido, morado = polar sin carga, rosa = polar sin carga, verde = Pro (apolar sin carga) y verde claro = His.

| Péptido | Predicción de la estructura secundaria | | Predicción de la estructura 3D | Proyección de rueda helicoidal |
|--------------|---|---|--|---|
| | Jpred 4 [%] | PHD [%] | | |
| Lineatina-1a | — | Hélice (Val ₅ –Ala ₉) [38,5%] |  |  |
| Lineatina-1b | Hélice (His ₁₆ –Arg ₂₇) [36,7%] | Hélice (Ile ₁₃ –Met ₂₈) [53,3%] |  |  |
| Lineatina-2 | Hélice (Leu ₂ –Ala ₁₀ ; Val ₁₃ –Lys ₂₀) [77,3%] | Hélice (Pro ₃ –Lys ₂₀) [81,8%] |  |  |
| Lineatina-3a | Hélice (Trp ₆ –Arg ₁₉) [66,7%] | Hélice (Asp ₅ –Val ₂₀) [76,2%] |  |  |
| Lineatina-3b | Hélice (Glu ₈ –Glu ₁₈) [45,8%] | Hélice (Pro ₆ –Ser ₂₀) [62,5%] |  |  |

3.4. Espectrometría de masas en tándem

El péptido lineatina-2 identificado inicialmente por clonación molecular, luego se confirmó mediante espectrometría de masas en tándem (UPLC-QTOF) que mostró 29 iones fragmento peptídicos de la secuencia (véase figura 7). Así mismo, se identificó un ión con su masa monoisotópica de $[M+4H]^{4+} = 619,17$ Da y su masa molecular de 2474,67 Da.



(b)

| # | b | b ⁺⁺ | b ⁺ | b ⁺⁺⁺ | b ⁰ | b ⁰⁺⁺ | Seq. | y | y ⁺⁺ | y ⁺ | y ⁺⁺⁺ | y ⁰ | y ⁰⁺⁺ | # |
|----|-----------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|------|-----------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----|
| 1 | 114.0913 | 57.5493 | | | | | I | | | | | | | 22 |
| 2 | 227.1754 | 114.0913 | | | | | L | 2362.4737 | 1181.7405 | 2345.4472 | 1173.2272 | 2344.4631 | 1172.7352 | 21 |
| 3 | 324.2282 | 162.6177 | | | | | P | 2249.3896 | 1125.1985 | 2232.3631 | 1116.6852 | 2231.3791 | 1116.1932 | 20 |
| 4 | 437.3122 | 219.1598 | | | | | L | 2152.3369 | 1076.6721 | 2135.3103 | 1068.1588 | 2134.3263 | 1067.6668 | 19 |
| 5 | 550.3963 | 275.7018 | | | | | L | 2039.2528 | 1020.1300 | 2022.2263 | 1011.6168 | 2021.2422 | 1011.1248 | 18 |
| 6 | 663.4804 | 332.2438 | | | | | I | 1926.1688 | 963.5880 | 1909.1422 | 955.0747 | 1908.1582 | 954.5827 | 17 |
| 7 | 764.5280 | 382.7677 | | | 746.5175 | 373.7624 | T | 1813.0847 | 907.0460 | 1796.0581 | 898.5327 | 1795.0741 | 898.0407 | 16 |
| 8 | 835.5652 | 418.2862 | | | 817.5546 | 409.2809 | A | 1712.0370 | 856.5221 | 1695.0105 | 848.0089 | 1694.0264 | 847.5169 | 15 |
| 9 | 906.6023 | 453.8048 | | | 888.5917 | 444.7995 | A | 1640.9999 | 821.0036 | 1623.9733 | 812.4903 | 1622.9893 | 811.9983 | 14 |
| 10 | 1034.6972 | 517.8523 | 1017.6707 | 509.3390 | 1016.6867 | 508.8470 | K | 1569.9628 | 785.4850 | 1552.9362 | 776.9718 | 1551.9522 | 776.4797 | 13 |
| 11 | 1133.7656 | 567.3865 | 1116.7391 | 558.8732 | 1115.7551 | 558.3812 | V | 1441.8678 | 721.4375 | 1424.8413 | 712.9243 | 1423.8573 | 712.4323 | 12 |
| 12 | 1246.8497 | 623.9285 | 1229.8232 | 615.4152 | 1228.8391 | 614.9232 | I | 1342.7994 | 671.9033 | 1325.7729 | 663.3901 | 1324.7888 | 662.8981 | 11 |
| 13 | 1343.9025 | 672.4549 | 1326.8759 | 663.9416 | 1325.8919 | 663.4496 | P | 1229.7153 | 615.3613 | 1212.6888 | 606.8480 | 1211.7048 | 606.3560 | 10 |
| 14 | 1471.9974 | 736.5024 | 1454.9709 | 727.9891 | 1453.9869 | 727.4971 | K | 1132.6626 | 566.8349 | 1115.6360 | 558.3217 | 1114.6520 | 557.8296 | 9 |
| 15 | 1585.0815 | 793.0444 | 1568.0550 | 784.5311 | 1567.0709 | 784.0391 | I | 1004.5676 | 502.7874 | 987.5411 | 494.2742 | 986.5570 | 493.7822 | 8 |
| 16 | 1722.1404 | 861.5738 | 1705.1139 | 853.0606 | 1704.1298 | 852.5686 | H | 891.4835 | 446.2454 | 874.4570 | 437.7321 | 873.4730 | 437.2401 | 7 |
| 17 | 1809.1724 | 905.0899 | 1792.1459 | 896.5766 | 1791.1619 | 896.0846 | S | 754.4246 | 377.7160 | 737.3981 | 369.2027 | 736.4141 | 368.7107 | 6 |
| 18 | 1956.2409 | 978.6241 | 1939.2143 | 970.1108 | 1938.2303 | 969.6188 | F | 667.3926 | 334.1999 | 650.3661 | 325.6867 | | | 5 |
| 19 | 2103.3093 | 1052.1583 | 2086.2827 | 1043.6450 | 2085.2987 | 1043.1530 | F | 520.3242 | 260.6657 | 503.2976 | 252.1525 | | | 4 |
| 20 | 2231.4042 | 1116.2058 | 2214.3777 | 1107.6925 | 2213.3937 | 1107.2005 | K | 373.2558 | 187.1315 | 356.2292 | 178.6183 | | | 3 |
| 21 | 2345.4472 | 1173.2272 | 2328.4206 | 1164.7139 | 2327.4366 | 1164.2219 | N | 245.1608 | 123.0840 | 228.1343 | 114.5708 | | | 2 |
| 22 | | | | | | | L | 131.1179 | 66.0626 | | | | | 1 |

Figura 7: Fragmentos MS/MS del ion precursor $[M+4H]^{4+}$: 619,17 de lineatina-2 (2474,67 Da) identificado en las secreciones sutáneas de *Lithodytes lineatus*. a) espectro de MS/MS de los iones fragmentos identificados. b) la tabla muestra los iones fragmentos b y y predichos para lineatina-2. Estos iones se destacan en color rojo.

Curiosamente, las características que presenta el péptido lineatina-2 (Tabla 4 y Tabla 5) y su corroboración por espectrometría de masas (figura 7), lo hizo ideal para ser sintetizado y evaluado *in vitro*.

3.5. Síntesis química del péptido lineatina-2

El péptido lineatina-2 fue sintetizado, utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida y se obtuvo una pureza > al 81% (véase figura 8b). Adicionalmente, la identidad molecular del péptido sintético fue corroborado por MADI-TOF MS ($[M+H]^+ = 2475,1$ Da) versus su masa teórica calculada (2474,5 Da) (véase Tabla 4 y Figura 8a).

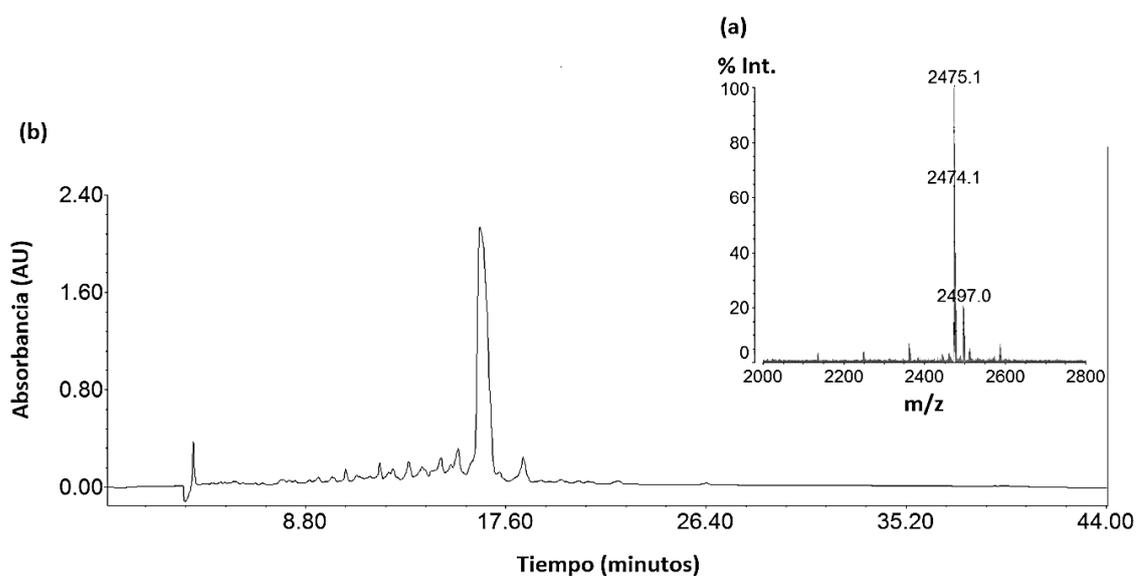


Figura 8: Síntesis del péptido lineatina-2: a) perfil cromatográfico con una pureza > 81% y b) identidad molecular del péptido lineatina-2 ($[M] = 2774,1$ Da, $[M+H]^+ = 2475,1$ Da).

3.6. Actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético lineatina-2

La actividad antimicrobiana del péptido sintético lineatina-2 fue evaluado en contra de: *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. El péptido sintético mostró una buena actividad antimicrobiana con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,6 μ M para *S. aureus*, 6,5 μ M para *E. coli* y 12,9 μ M en *C. albicans*. Así mismo, mostró una concentración mínima bactericida (CMB) de 3,2, 6,5 y 25,9 μ M en contras de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* respectivamente, los valores se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del péptido sintético lineatina-2. En comparación con péptidos identificados en especímenes de la familia Leptodactylidae.

| Péptido | CMI μM (mg/L) | | | CMB μM (mg/L) | | | Ref. |
|----------------|--------------------------|------------------|--------------------|--------------------------|------------------|--------------------|------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | |
| Lineatina-2 | 6,5 (16) | 1,6 (4) | 12,9 (32) | 6,5 (16) | 3,2 (8) | 25,9 (64) | |
| Pentadactilina | 25 (55) | 200 (438) | >200 (>438) | NP | NP | NP | [43] |
| Laticeptina | 50 (110) | >200 (>438) | >200 (>438) | NP | NP | NP | [13] |
| Taulina-1 | 25,8 (62,5) | 197,5 (500) | NP | 25,8 (62,5) | 197,5 (500) | NP | [33] |
| Ocelatina-LB1 | 114 (250) | ND | 233,5 (512) | NP | NP | NP | [38] |
| Ocelatina-PT1 | 300 (800) | >300 (>800) | NP | NP | NP | NP | [14] |
| Ocelatina-PT4 | 80 (200) | >300 (>800) | NP | NP | NP | NP | [14] |

NP: no probado, ND: no determinado

Por otro lado, cuando se probó la citotoxicidad en contra de eritrocitos el péptido lineatina-2 mostró una actividad hemolítica de 2,95% a 6,5 μM , concentración a la cual presenta una CMI y CMB en contra de las dos bacterias analizadas, véase Figura 9 y Tabla 6. Además, el péptido presenta una concentración hemolítica media (CH_{50}) de 45,7 μM .

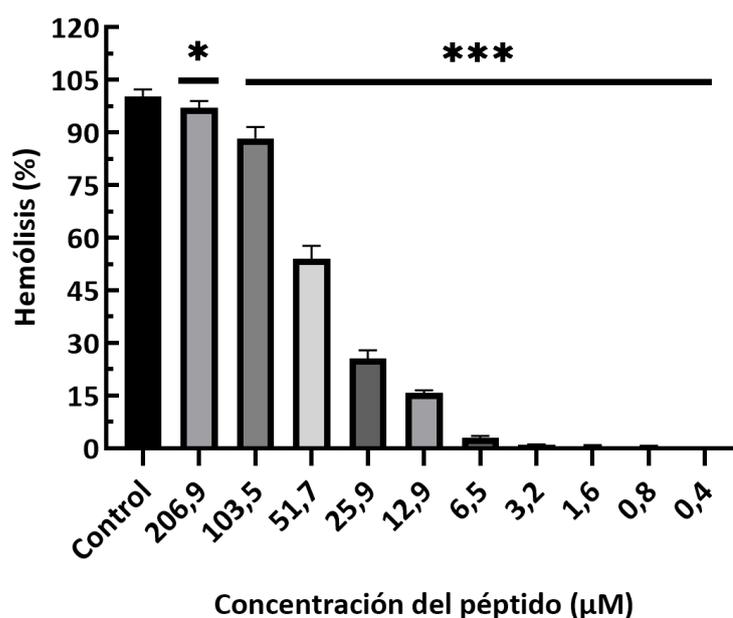


Figura 9: Actividad hemolítica del péptido sintético lineatina-2. Lineatina-2 induce una hemólisis menor al 3% a la concentración que inhibe a las bacterias. El control positivo (triton X-100) fue considerado como el 100% de hemólisis. Existe diferencia significativa comparado al control positivo determinado por ANOVA y prueba post hoc de Dunnett: * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Fraccionamiento de las secreciones cutáneas y actividad antimicrobiana

En los resultados obtenidos se observa que ciertas fracciones de la secreción cutánea de *L. lineatus* tiene actividad antimicrobiana, dado que, 10 fracciones (fracción-1 a 10) fueron capaces de controlar el crecimiento de *E. coli* y 5 de estas fracciones (fracción-1, 2, 4, 8 y 9), también, presentaron actividad en contra de *S. aureus*, sin embargo, de las fracciones analizadas todas fueron inactivas para *C. albicans*. Esto indica que debe existir diferentes moléculas en la piel de esta especie y que éstas deben tener diferentes tipos de acción dependiendo de las células sobre las que actúan.

Se presume que la actividad antimicrobiana proviene de los péptidos. Esta presunción se realiza en base a la presencia de varios picos en el perfil cromatográfico a 280 y 214 nm de las secreciones cutáneas de *L. lineatus*. Dado que, a la longitud de 214 nm permite la identificación de componentes que contienen enlaces peptídicos, mientras que, a la longitud de 280 nm permite detectar péptidos que contengan residuos aromáticos (aminoácidos aromáticos) [72–74]. Esto indicando la variada diversidad peptidómica de la piel de este anfibio [75]. Así mismo, la variación, selectividad y potencia observada de las fracciones reflejan la diversa concentración de los péptidos antimicrobianos que tienen las secreciones cutáneas de esta especie [12,37,75]. Estos resultados son congruentes con estudios realizados en especímenes de su misma familia (Leptodactylidae), en donde, se ha observado perfiles cromatográficos a 280 y 214 nm con una variada presencia de picos [14,32,76]. Además, varias investigaciones realizadas desde el 2004 hasta el 2020 han descrito 28 secuencias de aminoácidos y de secuencias de ADNc precursoras de péptidos presentes en la secreción cutánea de varias especies del género *Leptodactylus* [14,77]. Estas secuencias se han identificado en los perfiles cromatográficos de las especies en las que se han identificado [14,36]. Por lo que, la mayoría de los picos observados en el perfil cromatográfico de *L. lineatus* podrían ser péptidos con diferente número de aminoácidos, lo que resulta en una variedad de moléculas.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana en contra de *E. coli* y *S. aureus*, se correlaciona con varias investigaciones en especímenes de la misma familia, ya que, han descrito que son un recurso rico en péptidos con diversas actividades biológicas, pues se han encontrado péptidos, como: ocelatina-PT1-PT8, ocelatina-V1-V2, ocelatina-4-6, entre otros, que presentan actividad en contra de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Proteus mirabilis* y *K. pneumoniae* [13,14,34,38,39,44,62,78,79].

4.2. Clonaje molecular de las secuencias precursoras de péptidos

La estructura de los pro-péptidos identificados es similar entre sí y con los pro-péptidos ya descritos de otras especies. Es así como, está constituido por 3 regiones: el péptido señal, los espaciadores ácidos y el péptido maduro [12,14,34,36,80]. El péptido señal de las secuencias identificadas, comprende a un péptido de señal potencial para la translocación de la membrana del retículo endoplasmático, que termina con un residuo Cys (C₂₂) [14,81]. El péptido señal es seguido de una zona ácida que termina con dos aminoácidos básicos consecutivos Lys-Arg (KR), estos residuos dibásicos son conocidos como una señal de procesamiento pro-hormonal de escisión de la tripsina [14,80,82]. Finalmente, los péptidos maduros identificados difieren de los péptidos encontrados en los miembros de su misma familia, además, se identificó que dos de los cinco péptidos maduros identificados (lineatina-2 y 3b) presentan un residuo de Gly (G) en el extremo C- terminal, lo que implica la amidación del péptido en ese extremo [36].

Por otro lado, la secuencia nucleotídica y aminoacídica de lineatina-2 comparte una similitud del 71 y 49 %, respectivamente, con otras filoseptinas [63,64]. Estos valores hacen pensar que se ha identificado una nueva filoseptina. Sin embargo, al analizar las secuencias aminoacídicas completas de las filoseptinas con las que comparte similitud, presentan una secuencia conservada FLSXIP (donde, X: es un aminoácido no conservado) en la región N-terminal, y, de acuerdo con Proaño y sus colaboradores [12] y Wu y sus colaboradores [83], las filoseptinas comparten una secuencia conservada (FLSLIP) en la región N-terminal. Así pues, se observa que lineatina-2 no comparte esta secuencia de aminoácidos conservados en el péptido maduro, por lo tanto, no se puede considerar como una nueva filoseptina. En realidad, la similitud atribuida a las filoseptinas se debe en gran medida a que comparte regiones conservas en el péptido señal y la región ácida. Esta característica no hace que forme parte de las filoseptinas porque al analizar las regiones mencionadas de lineatina-2, filoseptina-PV1 y ocelatinaa-PT1 comparten secuencias de aminoácidos conservados, pese a que los últimos péptidos son de diferentes familias (véase figura S2 en anexos). De la misma forma, la secuencia nucleotídica y aminoacídica de lineatina-1 comparte una similitud del 84 y 48 % con filoseptinas y dermaseptinas, respectivamente. Pese a que el porcentaje de cobertura para la secuencia aminoacídica es de 87%, el valor de e-value es bajo (0,003), haciendo que la identificación no sea precisa. Así mismo, el porcentaje de similitud (48%) para la secuencia aminoacídica se debe a que comparte regiones conservas en el péptido señal y la región ácida. Además, el péptido lineatina-1 no comparte las características de las demaseptinas porque no contiene una W (Trp) en la

posición tres y la secuencia conservada AA(A/G)KAAL(G/N)A en la región media, que fueron descritas por Proaño y sus colaboradores [12] y por Nicolas y sus colaboradores [84]. El panorama que presenta lineatina-1 se repite para lineatina-3. En vista de ello, también se comparó con las secuencias de péptidos maduros que se han identificado en la familia Leptodactylidae. Las ocelatinas empleadas en la comparación exhiben aminoácidos conservados en la posición cuatro (D-Aps), siete (K-Lys), once (K-Lys), dieciséis (H-His) y veinte (K-Lys), pero, en lineatina-1, lineatina-2 y lineatina-3 no conservan dichos aminoácidos, por ende, no se considera como nuevas ocelatinas [14,36,37,39,77].

Está claro que al no tener una nomenclatura para los nuevos péptidos identificados porque sus secuencias no permitieron que se asignaran a ninguna de las familias de péptidos descritos hasta la fecha. Entonces, los nuevos péptidos se denominaron Lineatinas siguiendo la nomenclatura propuesta por Amiche y sus colaboradores [85] y por Conlon [86]. La propuesta para la nomenclatura de péptidos se deriva a partir del nombre de la especie de la rana de la que se aislaron los péptidos y se incorporaron los números para indicar que estos son los primeros péptidos encontrados en esta especie [85,86].

4.3. Análisis de los péptidos identificados

La diversidad en cuanto a estructura y mecanismos de acción por parte de los péptidos antimicrobianos no permite una asociación clara entre estructura y actividad, sin embargo, hay parámetros estructurales y propiedades fisicoquímicas que comparten muchos péptidos antimicrobianos [87–90]. En este sentido, una característica que poseen muchos péptidos antimicrobianos es su carga neta positiva, pues es importante para la interacción electrostática péptido-microorganismo [87,89]. Dicho esto, la carga neta neutra (0) de lineatina-3b y la carga negativa de -3 de lineatina-1a y -1 de lineatina-3a no ayuda a la interacción electrostática, por ende, estos péptidos no van a exhibir actividad antimicrobiana [34]. Por otro lado, la carga neta positiva que posee el péptido lineatina-1b de +3 y lineatina-2 de +4,1 favorece la interacción electrostática, y, por ende, se espera que presenten actividad antimicrobiana. Así mismo, dado que el momento hidrofóbico es una medida cuantitativa de la anfipaticidad del péptido, por ende, valores altos y moderados del momento hidrofóbico promueven la actividad antimicrobiana, y, el péptido lineatina-2 tiene un valor moderado, y se espera que presente mayor actividad en comparación a lineatina-1b [91–93]. Esto es evidente, en los diagramas de rueda helicoidal porque se observa que lineatina-2 tiene un carácter

anfipático más remarcado que lineatina-1b. Además, la hidrofobicidad refleja la capacidad que tienen los péptidos para penetrar la membrana bacteriana hace necesario que esté presente una alta hidrofobicidad, tal es el caso de lineatina-2 que tiene una alta hidrofobicidad y se espera que presente una buena actividad antimicrobiana [93,94]. Finalmente, al analizar la estructura 3D se observa la presencia de una Gly en el extremo C-terminal de lineatina-2, esto favorece la amidación en ese extremo, y aumenta la actividad antimicrobiana [90].

Finalmente, uno de los 5 péptidos maduros identificados (lineatina-2) se corroboró mediante espectrometría de masas en tándem, por ende, este péptido fue sometido a síntesis química. Sin embargo, al emplear la misma metodología no se pudo identificar a los otros cuatro péptidos maduros restantes, esto podría atribuirse a: una baja concentración de la muestra, una baja expresión del péptido, sin expresión es decir que no fueron traducidas o que la degradación de los péptidos sea rápida [12,95].

4.4. Actividad biológica y hemolítica del péptido sintético lineatina-2

Los resultados muestran una buena actividad antimicrobiana por parte del péptido sintético lineatina-2. De acuerdo con los modelos de Shai-Matsuzaki-Huang (SMH), se necesita una carga neta positiva (péptidos catiónicos) para interactuar con las membranas de las bacterias [88,89,96]. En efecto el péptido lineatina-2 posee una carga neta (a pH 7) de + 4,1 haciéndolo ideal para ejercer actividad sobre la membrana bacteriana. Puesto que, el efecto de la cationicidad de los péptidos antimicrobianos es proporcional a la actividad antimicrobiana y citotóxica [97,98]. Además, lineatina-2 comparte características estructurales e hidrofóbicas con otros péptidos antimicrobianos [36,80,99]. En este sentido, estas características son importantes en el mecanismo de acción, dado que, varios estudios han de mostrado que la membrana celular es el principal objetivo de los péptidos catiónicos [100]. El efecto de la potencia del péptido sobre las bacterias puede ser el resultado de la composición de la membrana [89,90]. Dado que, en las bacterias Gramnegativas (por ejemplo *E. coli*) la interacción del péptido se ve favorecida por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) aumentando la carga neta negativa hacia la membrana externa [25,89,98]. Mientras que, en las bacterias Grampositivas (por ejemplo *S. aureus*) no tiene una membrana externa o LPS, pero, su estructura superficial está formada por peptidoglucano que es rico en ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos están cargados negativamente, por lo tanto, favorecen la carga negativa de la pared celular y la interacción con péptidos catiónicos, véase figura S3 en anexos [25,90,98]. Además, como se observa en la predicción de la rueda helicoidal, el

péptido lineatina-2 tiende a forma hélices anfipáticas, y, de acuerdo con varios autores este tipo de estructuras son característicos de los péptidos antimicrobianos, ya que ayudan a interactuar con las membranas bacterianas [25,89,101,102]. Finalmente, lineatina-2 es un péptido amidado en el extremo C-terminal. Esta es otra característica que permite tener una buena actividad antimicrobiana, dado que, varios autores mencionan que la amidación del grupo C-terminal resulta en un aumento de la actividad antimicrobiana porque se incrementa en +1 la cationicidad del péptido [90,103–105].

Por otro lado, el aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas y la aparición de la resistencia a los antifúngicos en *Candida spp.* ha impulsado la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, y, los péptidos antimicrobianos son una alternativa prometedora debido a sus actividades de amplio espectro [106,107]. En este contexto, el péptido lineatina-2 tiene una actividad de amplio espectro, dado que, fue capaz de ejercer actividad biológica en contra de *C. albicans*. La actividad antifúngica del péptido lienatus-2 está dada por su característica catiónica porque promueve la atracción electrostática hacia los fosfolípidos en las membranas fúngica como el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina o hacia los componentes de la pared como las manoproteínas en la levadura [106,108]. Además, Lum y sus colaboradores [68] sugieren que el aumento de los residuos catiónicos mejora la interacción del péptido con las paredes de las levaduras. De la misma forma que en las bacterias, la potencia con la que actúa el péptido es el resultado de la composición de la membrana de la levadura [89,90].

Cabe señalar que en la tabla 3 se observa que el péptido, también, presenta actividad microbicida (bactericida y fungicida) en contra de *E. coli* (CMB = 6,5 μM), *S. aureus* (CMB = 3,2 μM) y *C. albicans*, (CMB = 25,9 μM). Esto sugiere que el mecanismo de acción que ejerce el péptido sobre los microorganismos ocasiona lisis celular [25,89,90,106,109]. Es decir, que el péptido microbicida induce la muerte por necrosis celular en los microorganismos analizados, ya que provoca una serie de incidentes que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática ocasionando la expulsión del contenido celular [110].

Por otra parte, la actividad hemolítica que presentan los péptidos es uno de los principales obstáculos a la hora de su formulación como fármacos [83]. Por ende, se hace indispensable realizar ensayos de citotoxicidad. En este sentido, el péptido sintético lineatina-2 presentó un bajo efecto hemolítico (3%) en la concentración que presenta CMI y CMB, en contra de *E. coli* y *S. aureus*. La baja actividad hemolítica del péptido se debe a que es un péptido amidado en el extremo C-terminal, lo que favorece

a una buena actividad biológica y una baja tasa de hemólisis [90]. Además, este hallazgo se correlaciona con la carga neta del péptido dado que varios autores describen que, cuando un péptido presenta una carga que varía entre +2 y +5 tienden a mostrar una baja citotoxicidad y una buena actividad antimicrobiana [109]. Sin embargo, a concentraciones altas del péptido se evidencia mayor hemólisis debido a su alta hidrofobicidad [111]. Esta limitación puede ser reducida mediante estrategias como la modificación de la secuencia de aminoácidos original para reducir la hidrofobicidad y aumentar la carga neta [112]. Sin embargo, se debe recordar que si la carga neta supera los +6 y tiene una hidrofobicidad alta ocasionara una disminución en la potencia del péptido y un aumento su toxicidad [109,113].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El estudio realizado determina que la secreción total de *L. lineatus* presenta actividad antibacteriana en contra de *E. coli* y *S. aureus*. Por lo que, la secreción cutánea de *L. lineatus* es promisoría para la identificación de péptidos con actividad antimicrobiana. Además, se caracterizó la estructura primaria de 5 nuevos péptidos que se denominaron lineatinas. Especialmente, el péptido lineatina-2 mostró una buena actividad antimicrobiana, en contra de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, con un bajo efecto hemolítico a los eritrocitos humanos. Así mismo, este estudio demuestra la importancia de conservar la biodiversidad de anfibios, explorar nuevas especies en el descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos claves en el desarrollo de nuevos fármacos terapéuticos basados en estructuras de compuestos naturales.

5.2. Recomendaciones

En futuros trabajos se sugiere enfocarse en la determinación de la actividad biológica y hemolítica de los péptidos identificados, dada las características que estos presentan, por ejemplo: determinar la actividad biológica y hemolítica de lineatina-1b, usar como péptido molde a lineatina-3b (carga neta 0) para aumentar la carga neta y determinar su actividad biológica, y dado que lineatina-2 presenta una actividad de amplio espectro, también, es interesante probar sobre líneas celulares. Además, hay que tomar en cuenta que la secreción total de *L. lineatus* existe un sin número de moléculas, por lo tanto, es imperativo continuar la búsqueda de péptidos bioactivos empleando otros tipos de primers.

REFERENCIAS

1. You D, Hong J, Rong M, Yu H, Liang S, Ma Y, et al. The first gene-encoded amphibian neurotoxin. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284: 22079–22086. doi:10.1074/jbc.M109.013276
2. Xu X, Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*. 2015;115: 1760–1846. doi:10.1021/cr4006704
3. Ma Y, Liu C, Liu X, Wu J, Yang H, Wang Y, et al. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics*. 2010;95: 66–71. doi:10.1016/j.ygeno.2009.09.004
4. Conlon JM. *Evolution in Action: Skin Peptides*. Second Edi. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00252-9
5. Lazarus LH, Attila M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Progress in Neurobiology*. 1993;41: 473–507. doi:10.1016/0301-0082(93)90027-P
6. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*. 2017;133: 117–138. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.018
7. Clarke BT. *The Natural History of Amphibian Skin Secretions, Their Normal Functioning and Potential Medical Applications*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1997;72: 365–379. doi:10.1017/s0006323197005045
8. Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, et al. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME Journal*. 2009;3: 818–824. doi:10.1038/ismej.2009.27
9. Simmaco M, Mignogna G, Barra D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers*. 1998;47: 435–450. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<435::AID-BIP3>3.0.CO;2-8
10. Toledo RC, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Biochem Physiol*. 1995.
11. Rodríguez C, Rollins-Smith L, Ibáñez R, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. pp. 235–254. doi:10.1016/j.jep.2016.12.021
12. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida JR, Wang L, Llumiquinga MA, Rivera M, et al. Unravelling the skin secretion peptides of the gliding leaf frog, *Agalychnis spurrelli* (hylidae). *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9110667
13. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, Sonnevend A, King JD, Nielsen PF. Purification and Properties of Laticeptin, an Antimicrobial Peptide from Skin Secretions of the South American Frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein & Peptide Letters*. 2006.
14. Marani MM, Dourado FS, Quelemes PV, de Araujo AR, Perfeito MLG, Barbosa EA, et al. Characterization and Biological Activities of Ocellatin Peptides from the Skin Secretion of the Frog *Leptodactylus pustulatus*. *Journal of Natural Products*. 2015;78: 1495–1504. doi:10.1021/np500907t
15. Aniszewski T. *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier; 2007.
16. Signorini ML, Guerrero-Legarreta I. Biogenic amine production in beef preserved with lactic acid of chemical and bacterial sources. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*. 2009;8: 41–49.

17. Martínez Augustin O, de Victoria E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 2006;21: 1–14.
18. Gésime JM, Acevedo AM, Lalaguna F. Las Mucinas Salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odontológica Venezolana*. 2009;47: 446–452. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000200024&nrm=iso
19. Cabrera FJA, Garcia GCC. Mucins of the Male Genital Tract of the Spectacled Cayman. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV*. 2007;48: 77–84.
20. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
21. Mulero Cánovas J, Zafrilla Rentero P, Martínez-Cachá Martínez A, Leal Hernández M, Abellán Alemán J. Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2011;23: 219–227. doi:10.1016/j.arteri.2011.04.004
22. Rollins-Smith LA, Reinert LK, O’Leary CJ, Houston LE, Woodhams DC. Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and Comparative Biology*. 2005;45: 137–142. doi:10.1093/icb/45.1.137
23. Li B, Lyu P, Xie S, Qin H, Pu W, Xu H, et al. LFB: A novel antimicrobial brevinin-like peptide from the skin secretion of the fujian large headed frog, *Limnonectes Fujianensi*. *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9060242
24. Zhang QY, Yan Z bin, Meng YM, Hong XY, Shao G, Ma JJ, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*. BioMed Central Ltd; 2021. doi:10.1186/s40779-021-00343-2
25. Téllez G, Castaño J. Antimicrobial peptides. 2010;14: 55–67. Available: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
26. Pretzel J, Mohring F, Rahlfs S, Becker K. Antiparasitic Peptides. 2013. doi:10.1007/10
27. Cartelle Gestal M, Villacís JE, Alulema MJ, Chico P. De La Granja a la Mesa. Implicaciones del Uso de Antibióticos en la Crianza de Animales para la Resistencia Microbiana y la Salud. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr*. 2014;1: 2221.
28. Conlon JM, Mechkarska M, Lukic ML, Flatt PR. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides*. Elsevier Inc.; 2014. pp. 67–77. doi:10.1016/j.peptides.2014.04.019
29. Frost D. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.1. 2021 [cited 5 Jul 2021]. doi:<https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>
30. Ron S, Merino-Viteri A, Ortiz D. *Anfibios del Ecuador*. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2019 [cited 29 Jan 2021]. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
31. Sousa NA, Oliveira GAL, de Oliveira AP, Lopes ALF, Iles B, Nogueira KM, et al. Novel Ocellatin Peptides Mitigate LPS-induced ROS Formation and NF-κB Activation in Microglia and Hippocampal Neurons. *Scientific Reports*. 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-59665-1
32. Barbosa EA, Iembo T, Martins GR, Silva LP, Prates MV, Andrade AC, et al. Skin secretion peptides: The molecular facet of the deimatic behavior of the four-eyed frog, *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2015;29: 2061–2068. doi:10.1002/rcm.7313

33. Dourado FS, Leite JRSA, Silva LP, Melo JAT, Bloch C, Schwartz EF. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. *Toxicon*. 2007;50: 572–580. doi:10.1016/j.toxicon.2007.04.027
34. Marani MM, Perez LO, de Araujo AR, Plácido A, Sousa CF, Quelemes PV, et al. Thaulin-1: The first antimicrobial peptide isolated from the skin of a Patagonian frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) with activity against *Escherichia coli*. *Gene*. 2017;605: 70–80. doi:10.1016/j.gene.2016.12.020
35. Conlon JM, Abdel-Wahab YHA, Flatt PR, Leprince J, Vaudry H, Jouenne T, et al. A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides (NY)*. 2009;30: 888–892. doi:10.1016/j.peptides.2009.01.008
36. Marani MM, Aguilar S, Cuzziol Boccioni AP, Cancelarich NL, Basso NG, Albericio F. Identification of new ocellatin antimicrobial peptides by cDNA precursor cloning in the frame of this family of intriguing peptides. *Antibiotics*. 2020;9: 1–19. doi:10.3390/antibiotics9110751
37. Christina A, Nascimento C, Zanotta LC, Kyaw CM, Schwartz ENF, Schwartz CA, et al. Ocellatins: New Antimicrobial Peptides from the Skin Secretion of the South American Frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). 2004. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
38. Nascimento A, Chapeaurouge A, Perales J, Sebben A, Sousa M v., Fontes W, et al. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*. 2007;50: 1095–1104. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.014
39. Gusmão KAG, dos Santos DM, Santos VM, Cortés ME, Reis PVM, Santos VL, et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): Characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2017;23. doi:10.1186/s40409-017-0094-y
40. Barran G, Kolodziejek J, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Nowotny N, et al. Peptidomic analysis of skin secretions of the caribbean frogs *leptodactylus insularum* and *leptodactylus nesiotus* (Leptodactylidae) identifies an ocellatin with broad spectrum antimicrobial activity. *Antibiotics*. 2020;9: 1–15. doi:10.3390/antibiotics9100718
41. King JD, Leprince J, Vaudry H, Coquet L, Jouenne T, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). *Peptides (NY)*. 2008;29: 1287–1292. doi:10.1016/j.peptides.2008.04.005
42. Libério MS, Joanitti GA, Azevedo RB, Cilli EM, Zanotta LC, Nascimento AC, et al. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids*. 2011;40: 51–59. doi:10.1007/s00726-009-0384-y
43. Sarmiento BE, Menezes LFS, Schwartz EF. Insulin release mechanism modulated by toxins isolated from animal venoms: From basic research to drug development prospects. *Molecules*. MDPI AG; 2019. doi:10.3390/molecules24101846
44. King JD, Al-Ghaferi N, Abraham B, Sonnevend A, Leprince J, Nielsen PF, et al. Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 2005;141: 393–397. doi:10.1016/j.cbpc.2005.09.002
45. Rodriguez LO, Duellman WE. *Guide to the frogs of the Iquitos Region, Amazonian Peru*. 1994.

46. Thaler R, Folly H, Fadel R, Alves-Da-silva L, Mângia S, Santana DJ. New records of lithodytes lineatus (Anura: Leptodactylidae) in the cerrado-amazon transition. *Caldasia*. 2020;42: 157–160. doi:10.15446/caldasia.v42n1.77257
47. Duellman WE. MUSEUM OF NATURAL HISTORY The Biology of an Equatorial Herpetofauna in Amazonian Ecuador. 1978.
48. Bernarde PS, Kokubum MNDC. Seasonality , age structure and reproduction of *Leptodactylus* (*Lithodytes*) lineatus (Anura , Leptodactylidae) in Rondônia state , southwestern Amazon , Brazil. 2009;99: 368–372.
49. de Sá Del Fiol F, de Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistencia bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*. 2003;57: 1129–1140. doi:10.20453/rmh.v9i2.2384
50. CDC. Antibióticos - Preguntas y respuestas sobre la resistencia a los antibióticos. 2021. Available: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/sp/about/antibiotic-resistance-faqs.html>
51. Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo ME, Salgado I, Olivares S, et al. Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares river. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2010;41. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220509038>
52. Lawe O, OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. 2017 [cited 20 Dec 2021]. Available: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
53. Blanco G, López-Hernández I, Morinha F, López-Cerero L. Intensive farming as a source of bacterial resistance to antimicrobial agents in sedentary and migratory vultures: Implications for local and transboundary spread. *Science of the Total Environment*. 2020;739. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140356
54. Guo H, Xue S, Nasir M, Gu J, Lv J. Impacts of cadmium addition on the alteration of microbial community and transport of antibiotic resistance genes in oxytetracycline contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 2021;99: 51–58. doi:10.1016/j.jes.2020.04.015
55. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022. doi:10.1016/s0140-6736(21)02724-0
56. Lindmeier C, OMS. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. 2018 [cited 20 Dec 2021]. Available: <https://www.who.int/es/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
57. INSPI. Datos de Resistencia a los Antimicrobianos. 2018.
58. INSPI. Datos de Resistencia Bacteriana Ecuador - 2015. 2015. Available: <http://www.investigacionosalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2017/07/1-DATOS-RESISTENCIAS-2015.docx.pdf>
59. Callies O. Nature Pharmacy - Source of Drugs in the XXI Century. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*. 2011.
60. Siano A, Humpola MV, de Oliveira E, Albericio F, Simonetta AC, Lajmanovich R, et al. *Leptodactylus* latrans amphibian skin secretions as a novel source for the isolation of antibacterial peptides. *Molecules*. 2018;23. doi:10.3390/molecules23112943
61. Castro MS, Pires Júnior OR, Fontes W, Roepstorff P. Analysis of skin derived peptides from the Cuyaba Dwarf Frog *Physalaemus nattereri* by off-line LC MALDI MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2017;416: 90–95. doi:10.1016/j.ijms.2016.10.005

62. Yambay E, Paucar K, Proaño-Bolaños C. Compuestos antimicrobiales en las secreciones de la piel de 6 especies de anfibios del parque “La Isla”, Tena-Ecuador. Quito; 2017.
63. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 1997. Available: <http://nar.oxfordjournals.org/>
64. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY*. Mary Ann Liebert, Inc. Pp; 2000.
65. Rozenski. Peptide Mass Calculator v3.2. 1999 [cited 24 Jan 2022]. Available: <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>
66. Rost B, Sander C, Schneider R. PHD-an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *CABIOS*. 1994. Available: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/>
67. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*. 2015;43: W389–W394. doi:10.1093/nar/gkv332
68. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010;5: 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
69. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008;24: 2101–2102. doi:10.1093/bioinformatics/btn392
70. Bachem. Peptide calculator. [cited 24 Jan 2022]. Available: <https://www.bachem.com/service-support/peptide-calculator/>
71. Faujdar C, Priyadarshini. Comparative study of hydroalcoholic extracts of *Bryophyllum pinnatum* and *Macrotyloma uniflorum* for their antioxidant, antiulcerogenic, and wound healing potential. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2022;10: 196–205. doi:10.7324/JABB.2021.100124
72. Kuipers BJH, Gruppen H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55: 5445–5451. doi:10.1021/jf0703371
73. Conlon JM. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. *Nature Protocols*. 2007;2: 191–197. doi:10.1038/nprot.2006.437
74. Tobias R. Validation of a Dual Wavelength Size Exclusion HPLC Method with Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates of a Monoclonal Antibody Biotherapeutic. 2013.
75. Conlon JM, Mechkarska M, Leprince J. Peptidomic analysis in the discovery of therapeutically valuable peptides in amphibian skin secretions. *Expert Review of Proteomics*. Taylor and Francis Ltd; 2019. pp. 897–908. doi:10.1080/14789450.2019.1693894
76. Zhang L, Chen X, Wu Y, Zhou M, Ma C, Xi X, et al. A Bowman-Birk type chymotrypsin inhibitor peptide from the amphibian, *Hylarana erythraea*. *Scientific Reports*. 2018; 1–9. doi:10.1038/s41598-018-24206-4
77. Marani MM, Aguilar S, Cuzziol Boccioni AP, Cancelarich NL, Basso NG, Albericio F. Identification of new ocellatin antimicrobial peptides by cDNA precursor cloning in the frame of this family of intriguing peptides. *Antibiotics*. 2020;9: 1–19. doi:10.3390/antibiotics9110751
78. Leite JMA, Silva LP, Silva-Leite RR, Ferrari AS, Noronha SE, Silva HR, et al. *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): Mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 2010;313: 1–8. doi:10.1002/jez.551

79. Rollins-Smith LA, King JD, Nielsen PF, Sonnevend A, Conlon JM. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regulatory Peptides*. 2005;124: 173–178. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.013
80. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53: 853–868. doi:10.1007/s00726-021-02986-w
81. Brand GD, Leite JRSA, de Sá Mandel SM, Mesquita DA, Silva LP, Prates M v., et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;347: 739–746. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.168
82. Hayakawa E, Watanabe H, Menschaert G, Holstein TW, Baggerman G, Schoofs L. A combined strategy of neuropeptide prediction and tandem mass spectrometry identifies evolutionarily conserved ancient neuropeptides in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE*. 2019;14. doi:10.1371/journal.pone.0215185
83. Wu X, Pan J, Wu Y, Xi X, Ma C, Wang L, et al. PSN-PC: A Novel Antimicrobial and Anti-Biofilm peptide from the skin secretion of *phyllomedusa-camba* with cytotoxicity on human lung cancer cell. *Molecules*. 2017;22. doi:10.3390/molecules22111896
84. Nicolas P, el Amri C. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009. pp. 1537–1550. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.006
85. Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily *Phyllomedusinae*. *Peptides*. 2008. pp. 2074–2082. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.017
86. Conlon JM. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. *Peptides (NY)*. 2008;29: 1631–1632. doi:10.1016/j.peptides.2008.04.016
87. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*. Higher Education Press; 2010. pp. 143–152. doi:10.1007/s13238-010-0004-3
88. Harrison PL, Heath GR, Johnson BRG, Abdel-Rahman MA, Strong PN, Evans SD, et al. Phospholipid dependent mechanism of smp24, an α -helical antimicrobial peptide from scorpion venom. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2016;1858: 2737–2744. doi:10.1016/j.bbamem.2016.07.018
89. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. 1999. Available: www.elsevier.com/locate/bba
90. Sitaram N, Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. 1999. Available: www.elsevier.com/locate/bba
91. Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Lee Maloy W, Macdonald DL, et al. Peptide Hydrophobicity Controls the Activity and Selectivity of Magainin 2 Amide in Interaction with Membranes. 1997.
92. Eisenberg D. THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF MEMBRANE AND SURFACE PROTEINS. 1984. Available: www.annualreviews.org
93. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. Available: www.elsevier.com/locate/bba
94. Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and

- haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters*. 1997;403: 208–212. doi:10.1016/S0014-5793(97)00055-0
95. Defossez E, Bourquin J, von Reuss S, Rasmann S, Glauser G. Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2021. doi:10.1002/mas.21715
 96. Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2011;20: 228–235. doi:10.1159/000331009
 97. Raja Z, André S, Piesse C, Sereno D, Nicolas P, Foulon T, et al. Correction: Structure, Antimicrobial Activities and Mode of Interaction with Membranes of Bovine Phylloseptins from the Painted-Belly Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagii*. *PLoS ONE*. 2013;8. doi:10.1371/annotation/dbb3e614-dc4c-40dd-b9e0-37787ae6b150
 98. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. 1999. Available: www.elsevier.com/locate/bba
 99. Bowie JH, Separovic F, Tyler MJ. Host-defense peptides of Australian anurans. Part 2. Structure, activity, mechanism of action, and evolutionary significance. *Peptides (NY)*. 2012;37: 174–188. doi:10.1016/j.peptides.2012.06.017
 100. Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. 2000; 402–410.
 101. Castañeda-Casimiro J, Ortega-Roque JA, Venegas-Medina AM, Aquino-Andrade A, Seraf  n-López J, Estrada-Parra S, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Péptidos antimicrobianos*. 2009. Available: www.medigraphic.com
 102. Tonarelli G, Simonetta  . Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terap  uticos y conservantes de alimentos. 2013. Available: www.who.int/
 103. da Silva AVR, de Souza BM, dos Santos Cabrera MP, Dias NB, Gomes PC, Neto JR, et al. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2014;1838: 2357–2368. doi:10.1016/j.bbamem.2014.06.012
 104. Marino G, Eckhard U, Overall CM. Protein Termini and Their Modifications Revealed by Positional Proteomics. *ACS Chemical Biology*. 2015;10: 1754–1764. doi:10.1021/acscchembio.5b00189
 105. Shahmiri M, Mechler A. The role of C-terminal amidation in the mechanism of action of the antimicrobial peptide aurein 1.2. *The EuroBiotech Journal*. 2020;4: 25–31. doi:10.2478/ebtj-2020-0004
 106. Lum KY, Tay ST, Le CF, Lee VS, Sabri NH, Velayuthan RD, et al. Activity of novel synthetic peptides against *Candida albicans*. *Scientific Reports*. 2015;5. doi:10.1038/srep09657
 107. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS ONE*. 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0101510
 108. van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. pp. 3545–3570. doi:10.1007/s00018-013-1260-1
 109. Liu Y, Du Q, Ma C, Xi X, Wang L, Zhou M, et al. Structure–activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin-PHA: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of

- bioactivities. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;13: 447–458. doi:10.2147/DDDT.S191072
110. Agudelo E, López M. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. 2010.
 111. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;141: 528–536. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
 112. Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. 2001.
 113. Malmsten M. Antimicrobial peptides. *Upsala Journal of Medical Sciences*. Informa Healthcare; 2014. pp. 199–204. doi:10.3109/03009734.2014.899278

ANEXOS

Tabla S 1: Muestras utilizadas en la fase experimental de este trabajo.

| Muestra | Especie | Fecha | Codificación | Localización | Colector |
|---------|--------------------|------------|--------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | <i>L. lineatus</i> | 14/11/2019 | SB001 | Ikiam, Napo-Ecuador | Carolina Proaño |
| 2 | <i>L. lineatus</i> | 14/11/2019 | SB002 | Ikiam, Napo-Ecuador | Sebastián Bermudez |
| 3 | <i>L. lineatus</i> | 15/11/2019 | CP005 | Misahuallí, Napo-Ecuador | Carolina Proaño |
| 4 | <i>L. lineatus</i> | 16/11/2019 | CP006 | Alto Tena, Napo-Ecuador | Lic. Raus |
| 5 | <i>L. lineatus</i> | 18/11/2019 | - | Misahuallí, Napo-Ecuador | - |
| 6 | <i>L. lineatus</i> | 22/11/2019 | - | Bajo un tronco - PUCE | - |

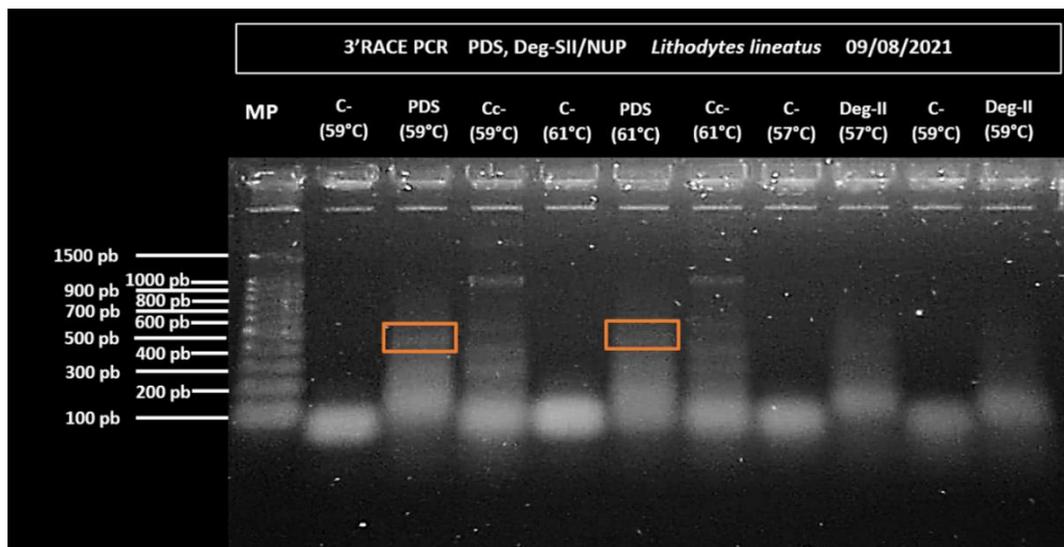


Figura S 1: 3'RACE PCR de la librería de ADNc (con el primer PDS). Se observa fragmentos (rectángulo naranja) de ADN amplificados con un peso entre 400-500 pb a 59 y 61°C. Los productos de la 3'RACE PCR fueron purificados y empleados en clonaje molecular.

| | | | |
|-------------------------|--|--|----|
| | 1 | | 22 |
| Lineatina-2 | <u>M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C</u> | | |
| Phylloseptin-PV1 | . A F | | |
| Ocellantín-PT1 | . A | | |
| | 23 | | 46 |
| Lineatina-2 | <i>D E E K R E E E E K L H E Q - - - - - K R</i> | | |
| Phylloseptin-PV1 | E T . . . E N D . E E D D K S E E . . | | |
| Ocellantín-PT1 | Q D . - D D D D D D D D D - - E E . . | | |
| | 47 | | 70 |

Figura S 2: Comparación del péptido señal y espaciador ácido de Lineatina-2, filloseptina-PV1 y ocelatinaa-PT1. Los péptidos señal están subrayados y los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas.

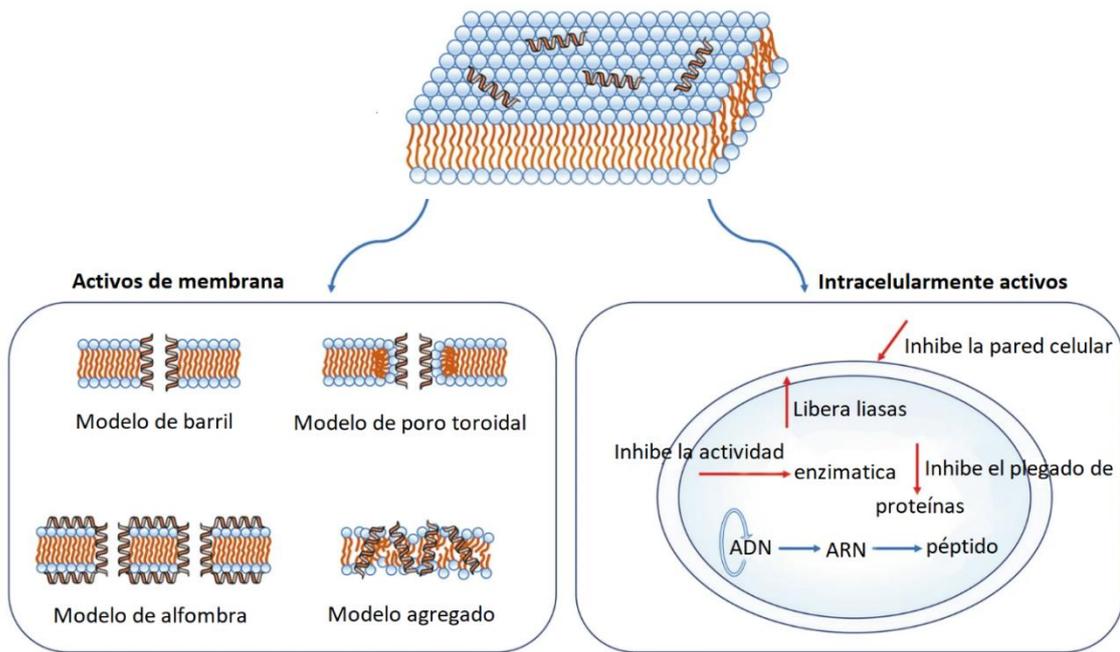


Figura S 3.- Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. El mecanismo bactericida de los AMPs activos de membrana da como resultado el aumento de la permeabilidad de la membrana, lisis de la membrana celular o liberación de contenidos intracelulares. Mientras que, los intracelularmente activos Inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas, inhibe el plegado de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular, también, promueve la liberación de liasas. Figura tomada y traducida de los autores: Zhang y sus colaboradores [24].

Fuente: Zhang y sus colaboradores, 2021, 6.