



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE PÉPTIDOS DE LA
SECRECIÓN CUTÁNEA DE LA RANA MONO DE LÍNEAS
BLANCAS *Phyllomedusa vaillantii***

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: NAYELI MARIUXI PINEDA PILLA

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Nayeli Mariuxi Pineda Pilla con documento de identidad N° 2300375769, 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, 14 de septiembre de 2023

A handwritten signature in dark ink, reading "Nayeli Pineda" in a cursive script.

Nayeli Mariuxi Pineda Pilla

2300375769

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, NAYELI MARIUXI PINEDA PILLA, con documento de identidad N° 2300375769, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: DETERMINACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO POR METALES PESADOS EN EL RÍO HUAMBUNO, PARROQUIAN AHUANO, NAPO-ECUADOR de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 14 de septiembre de 2023



Nayeli Mariuxi Pineda Pilla

CI: 2300375769

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de titulación: “Caracterización estructural de péptidos de la secreción cutánea de la rana mono de líneas blancas *Phyllomedusa vaillanti*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Nayeli Mariuxi Pineda Pilla, 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 Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 14 de septiembre de 2023

A handwritten signature in blue ink, reading "Carolina Proaño B", with a horizontal line underneath.

Carolina Del Carmen Proaño Bolaño

CI: 1714818760

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam y al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica que contribuyeron de manera significativa en la realización de este trabajo de investigación. En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Carolina Proaño, por su orientación experta, disponibilidad, paciencia y valiosos aportes que fueron fundamentales para dar forma a este presente trabajo.

También quiero extender mi gratitud a los técnicos del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica; en especial a Giovanna Morán por su constante apoyo, su experiencia, habilidad y dedicación para la realización exitosa de los experimentos y la obtención de resultados significativos.

A mis amigas de laboratorio, Dayana y Areliz por su apoyo incondicional, sus consejos e intercambio de ideas. Cada día en el laboratorio se volvió más ameno y motivador gracias a su compañía.

A Erika, Josselyn, Edwin, Jhon, Freddy, Bryan, Nicole, Argenis y Cristian que han sido un constante apoyo desde el colegio, les agradezco de corazón su disponibilidad para colaborar y siempre llevo una parte de ustedes conmigo.

Sobre todo, quiero expresar mi más profundo agradecimiento. A mis familiares, su apoyo y contribución han sido de un valor inmenso para mí.

DEDICATORIA

*A mi abuelita y mi tío; Marina y Manuel,
mi pilar fundamental de apoyo y confianza,
Gracias a ustedes fue esto posible.*

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE DERECHO, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIACIONES.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Péptidos de las secreciones cutáneas de anuros.....	1
1.1.2. Péptidos antimicrobianos: estructura y función	2
1.1.3. Péptidos identificados en la subfamilia Phyllomedusidae	3
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Justificación de la investigación.....	6
1.4. Preguntas de investigación.....	6
1.5. Hipótesis.....	6
1.6. Objetivos.....	7
1.6.1. General	7
1.6.2. Específicos.....	7
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	8
2.1. Recolección de muestras de <i>Phyllomedusa vaillantii</i>	8
2.2. Clonaje Molecular	8
2.2.1. Extracción de ARNm de la secreción cutánea	8

2.2.2.	Construcción de librería de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)	9
2.2.3.	Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE PCR).....	9
2.2.4.	Visualización de productos de PCR por electroforesis	9
2.2.5.	Purificación de los productos de las RACE PCR.....	10
2.2.6.	Ligación de productos de RACE PCR con pGEM [™] -T Easy Vector.....	10
2.2.7.	Transformación bacteriana	10
2.2.8.	Selección de colonias transformadas.....	11
2.2.9.	Aislamiento del ADN recombinante	11
2.2.10.	Amplificación de ADN recombinante mediante PCR	11
2.2.11.	Visualización por electroforesis de productos de Cloning PCR	12
2.2.12.	Secuenciación de los precursores peptídicos.....	12
2.2.13.	Análisis bioinformáticos de las secuencias	12
CAPÍTULO III. Presentación de Datos y Resultados.....		13
3.1.	Secuencias precursoras obtenidas a partir de clonaje molecular	13
3.2.	Características fisicoquímicas de los péptidos identificados	28
3.3.	Predicción de la estructura secundaria mediante SOPMA y predicción de la estructura 3D por I-TASSER.....	30
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....		32
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		38
5.1.	Conclusiones y recomendaciones.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de los péptidos Filoquininogeno-PV1, Filoquinina-PV1 y Filoquinina-PV2 identificados en <i>P. vaillantii</i>	16
Tabla 2.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del péptido filoseptina-PV identificado en la secreción cutánea de <i>P. vaillantii</i>	18
Tabla 3.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del péptido medusina	19
Tabla 4.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de Dermaseptinas-PV1 a PV5.....	22
Tabla 5.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de péptidos ricos en tirosina.	26
Tabla 6.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del péptido Desconocido-PV identificado en la secreción cutánea de <i>P. vaillantii</i>	28
Tabla 7.	Características fisicoquímicas de los péptidos identificados en la secreción cutánea de <i>P. vaillantii</i>	29
Tabla 8.	Características fisicoquímicas del péptido filoseptina-PV identificado en las secreciones de <i>P. vaillantii</i>	29
Tabla 9.	Características fisicoquímicas del péptido medusina identificado en las secreciones de <i>P. vaillantii</i>	30
Tabla 10.	Características fisicoquímicas de los péptidos Dermaseptinas identificados en las secreciones de <i>P. vaillantii</i>	30
Tabla 11.	Predicción de la estructura secundaria y 3D por I-TASSER y diagramas de rueda helicoidal de los péptidos identificados	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas traducidas del marco de lectura abierto que codifican a los péptidos	14
Figura 2. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de secreción cutánea de <i>P. vaillantii</i> y su traducción a aas del marco abierto de lectura de filoseptina-PV1.....	16
Figura 3. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de s. cutánea de <i>P. vaillantii</i> y su traducción a aas del marco abierto de lectura medusina-PV1.....	18
Figura 4. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de la s. cutánea de <i>P. vaillantii</i> y su traducción aas del marco abierto de lectura de Dermaseptina-PV1-5.....	19
Figura 5. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de s. cutánea de <i>P. vaillantii</i> y su traducción a aas del marco abierto de lectura del péptido rico en tirosina	26
Figura 6. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de la s. cutánea de <i>P. vaillantii</i> en aas del marco abierto de lectura de huérfano-PV.....	27

ABREVIACIONES

AMPs: Péptidos antimicrobianos

BLASTp: herramienta básica de búsqueda de alineación local para aminoácidos

MAE: Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm: Revoluciones por minuto

AMR: Resistencia antimicrobiana

ADNc: ADN complementario

ARNm: ARN mensajero

RACE PCR: Amplificación rápida de los extremos de ADNc

NUP: Nested Universal Primer

dNTPs: desoxirribonucleótidos

RESUMEN

El incremento preocupante de la resistencia a los antibióticos está impulsando la investigación hacia la exploración de alternativas terapéuticas. Una de las opciones en auge son los péptidos bioactivos presentes en la secreción cutánea de anfibios. El presente trabajo de pregrado se centró en identificar la composición peptídica de la secreción cutánea de la rana mono de líneas blancas *Phyllomedusa vaillantii*. El aislamiento y la identificación de los péptidos bioactivos de su secreción cutánea se realizaron mediante clonaje molecular y bioinformática. El ARNm se aisló de la secreción cutánea y se utilizó para establecer una biblioteca de ADNc mediante transcripción de ARNm. El ADNc de interés se amplificó mediante clonaje molecular y se secuenció por el método de Sanger para obtener la estructura prepropeptídica. Las secuencias que codificaban a prepropéptidos fueron sujetos a una búsqueda NCBI-BLAST y a una alineación de secuencias en MEGAX para verificar coincidencias con otras secuencias. De modo que, se caracterizó la estructura primaria de doce secuencias prepropeptídicas. Entre ellos se encontraron tres filoquininas y una filoseptina que se informaron previamente en otras especies. Las otras ocho secuencias de péptidos eran nuevas, incluida una variante de medusina, cinco dermaseptinas, un péptido rico en tirosina y un péptido huérfano. Además, se predijo la actividad antimicrobiana mediante sus propiedades físico-químicas, en el cual las nuevas dermaseptinas (DRSPV1 a DRSPV5) presentaron una actividad antimicrobiana significativa. En este estudio se evidencia la gran diversidad de péptidos bioactivos que presentan las secreciones cutáneas resaltando la importancia de abarcar la farmacología de los péptidos y su función biológica en anuros.

Palabras clave: *Phyllomedusa vaillantii*, secreción cutánea, clonaje molecular, péptidos bioactivos, péptidos antimicrobianos.

ABSTRACT

The worrying increase in antibiotic resistance is propelling investigation into the exploration of therapeutic alternatives. Bioactive peptides found in the skin secretions of amphibians are one of the emerging options. The present undergraduate work focused on identifying the peptide composition of the skin secretion of the white-lined monkey frog *Phyllomedusa vaillantii*. The isolation and identification of bioactive peptides from its skin secretion were performed by molecular cloning and bioinformatics. The mRNA was isolated from the skin secretion and used to establish a cDNA library by mRNA transcription. The cDNA of interest was amplified by molecular cloning and sequenced by the Sanger method to obtain the prepropeptide structure. Therefore, the sequences encoding prepropeptides were subjected to an NCBI-BLAST search and sequence alignment in MEGAX to verify matches with other sequences. Thus, was characterised the primary structure of twelve prepropeptide sequences. Among them, three phyloquinins and one phyloseptin were found, which were previously reported in other species. The other eight peptide sequences were new, including a medusin variant, five dermaseptins, a tyrosine-rich peptide and an orphan peptide. In addition, antimicrobial activity was predicted by their physicochemical properties, in which the novel dermaseptins DRSPV1 to PV5 exhibited significant antimicrobial activity. This study demonstrates the great diversity of bioactive peptides present in skin secretions and highlights the importance of understanding peptide pharmacology and their biological function in anurans.

Keywords: *Phyllomedusa vaillantii*, skin secretion, molecular cloning, bioactive peptides, antimicrobial peptides.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Péptidos de las secreciones cutáneas de anuros*

La piel de los anfibios, en especial de los anuros, es el factor clave que les permite permanecer en diversas condiciones climáticas. Por ejemplo, la mayoría de los anuros prefieren hábitats húmedos y fangosos, los cuales están potencialmente ricos en bacterias y hongos patógenos [1–3]. Para sobrevivir en estas zonas, en su piel han desarrollado varias líneas de defensa basadas en la producción de compuestos químicos que forman parte de su sistema inmune innato y favorecen su supervivencia [1–5].

Teniendo en cuenta este antecedente, los anuros tienen su piel altamente especializada que está compuesta por una plétora de glándulas granulares y mucosas. Estas últimas ayudan a mantener una piel húmeda en un entorno terrestre permitiéndoles funciones fisiológicas clave como la respiración cutánea [4,6]. En cambio, las glándulas granulares contienen una amplia gama de moléculas bioactivas que cumplen funciones defensivas ante el primer signo de desafío microbiano. Por lo tanto, la secreción cutánea de anuros está compuesta por ácidos nucleicos, alcaloides, quinonas, esteroides, aminas biógenas y una notable diversidad de péptidos biológicamente activos. Estos últimos, se han destacado por su rol principal en la defensa de peligros ambientales, patógenos y en la cicatrización de heridas [7–15]. Sobre todo, la liberación de estas biomoléculas se da a través de la ruptura de la membrana plasmática y la extrusión de los gránulos secretores mediante un conducto que se abre a la superficie [7,12].

Hasta la fecha se conocen más de 2.800 péptidos biológicamente activos aislados de las secreciones cutáneas de anfibios [11,16]. Los péptidos bioactivos son cadenas cortas de aminoácidos que tienen funciones y objetivos muy específicos. Son diferentes en su composición de aminoácidos, conformaciones, propiedades fisicoquímicas, lo que conduce a diversas funciones biológicas [17]. Por tal razón, cada especie de anuro segrega su propio conjunto individual de péptidos [16]. Los péptidos se pueden clasificar en diferentes familias como: péptidos miotrópicos, péptidos opioides, péptidos liberadores de corticotropina, angiotensinas, péptidos inhibidores de proteasa,

neuropéptidos, péptidos antioxidantes, lectinas, péptidos liberadores de insulina, degradación de mastocitos/liberadores de histamina, péptidos que promueven la cicatrización de heridas, péptidos inmunomoduladores, inhibidores de la óxido nítrico sintasa neuronal, péptidos antimicrobianos, péptidos antivirales, péptidos antitumorales, péptidos antiparasitarios y otros péptidos [13–15].

En este contexto, las aplicaciones biomédicas más relevantes descritas hasta la actualidad en péptidos incluyen a los péptidos antimicrobianos (AMPs). Especialmente, por la amplia gama de propiedades farmacológicas y estructuras moleculares completamente novedosas, por lo que pueden considerarse un recurso importante para el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales.

1.1.2. Péptidos antimicrobianos: estructura y función

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son cadenas cortas de aminoácidos descubiertas en los años 80 [18]. Estos péptidos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata no sólo de los anfibios, sino de la mayoría de las clases de seres vivos. Se ha descubierto que los AMP tienen propiedades bactericidas y también actividad fungicida, viricida y tumoricida [19,20] .

Por un lado, la estructura primaria de los AMPs presenta gran diversidad en su composición aminoacídica y en su longitud, por lo que resulta difícil identificar una plantilla común asociada con la actividad antimicrobiana [16,21]. A pesar de ello, comparten ciertas características fisicoquímicas. Generalmente, los AMPs varían en tamaño de 12 a 50 residuos de aminoácidos [22–24]. La mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, es decir tienen una carga neta positiva a pH fisiológico, lo cual se debe a la presencia de múltiples residuos de arginina y lisina. Los péptidos suelen ser anfipáticos, con una cara hidrofóbica que contiene aproximadamente un 50% de aminoácidos apolares [23–25]. Además, la mayoría de ellos son lineales con potencial de formar hélices α u hojas β a menudo inducidas por la interacción con fosfolípidos de la membrana de la célula diana, mientras que otros son cíclicos debido a la presencia de enlaces disulfuro o tioéteres [17].

El principal mecanismo de acción implica el contacto electrostático de los péptidos catiónicos con la membrana aniónica del microorganismo objetivo, seguido de la inserción en el interior de la membrana. La cara hidrofóbica interactúa con el núcleo

lipídico, mientras que la cara hidrofílica lo hace con los fosfolípidos de la membrana celular, y se han descrito varios modelos, entre ellos: en forma de alfombra, de poro toroidal y de barril [26].

1.1.3. Péptidos identificados en la subfamilia *Phyllomedusidae*

Según la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (APD) hasta mayo 2023, se han identificado 1196 péptidos activos de anfibios [27]. Por ello, haciendo énfasis a la subfamilia *Phyllomedusidae*, de acuerdo a la base de datos de Uniprot para el género *Phyllomedusa* se han identificado 247 péptidos, 93 en el género *Pithecopus*, 52 en el género *Agalychnis*, 43 en el género *Phasmahyla*, 15 en el género *Cruziohyla*, 13 en el género *Hylomantis*. No se presentan registros hasta la fecha de acceso para los géneros *Callimedusa* y *Phrynomedusa* [28].

El elevado número de AMPs encontrados en anuros indica que están siendo ampliamente investigados debido a su prometedora bioactividad [21]. De este modo, los péptidos presentes en la secreción de la cutánea de los anuros de la subfamilia *Phyllomedusinae* se encuentran agrupados en las siguientes familias de péptidos: Dermaseptinas, Dermatoxinas, Filoseptinas, Medusinas, Distinctinas, Plasticinas, Filoquininas, péptidos ricos en tirosina y péptidos huérfanos [21,29].

Las Dermaseptinas (DRS) son péptidos lineares, catiónicos (ricos en Lys) de 24 a 34 aminoácidos y tienen la capacidad de plegarse en estructuras anfipáticas α -helicoidales cuando se presentan en medios hidrófobos [30,31]. Estos péptidos contienen un residuo de triptófano (W) conservado en la posición 3, un motivo de consenso AA(A/G)KAAL(G/N)A en la región central o C-terminal [30–32]. Además, las DRS muestran efectividad *in vitro* contra bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*), bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y levaduras (*Candida albicans*). Adicional a esta propiedad muestran tener actividad citolítica [33]. En cambio, las dermatoxinas tienen un residuo G/R en la posición 3, en lugar del residuo W en el mismo lugar de las dermaseptinas, y todas contienen la secuencia conservada -KGVG-. Tienen una actividad particular sobre las bacterias sin pared celular y pueden actuar selectivamente sobre bacterias Gram-positivas [34].

Las filoseptinas tienen estructuras relativamente conservadas y contienen de 19 a 21 aminoácidos. Estos péptidos tienen su secuencia altamente conservada en la región N-

terminal, FLSLIP- y amidación en la región C-terminal, a su vez presenta una estructura anfifílica catiónica y un dominio helicoidal α [29,35]. Los péptidos de la familia de las filoseptinas son ricos en K/H, la mayoría contiene más de 2 residuos His, lo que resulta en una carga neta significativa y actividad antimicrobiana en condiciones fisiológicas ácidas [36].

Las medusinas difieren en varios aspectos importantes de sus parientes cercanos, las filoseptinas. Estos péptidos antimicrobianos son altamente conservados con solo dos posiciones variables: L/V en la posición 7 y A/S en la posición 14. Contienen 18 aminoácidos y poseen una secuencia N-terminal hexapéptida totalmente conservada, -LLGMIP- y una secuencia C-terminal tetrapéptida amidada -LSKL- [37]. Además, presentan actividad inhibidora frente a la bacteria Gram-positiva *S. aureus* y la levadura *C. albicans* [37].

Las distinctinas tienen una cadena A de 22 residuos de aminoácidos y una cadena B de 25 residuos de aminoácidos, que están conectadas por un enlace disulfuro entre C-19 de la cadena A y C-23 en la cadena B [38,39]. Las distinctinas muestran una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [40].

La familia de las plasticinas suele contener entre 23 y 29 residuos de aminoácidos, son ricas en residuos de Gly y Leu dispuestos en motivos regulares de 5 polímeros GXXXG (donde X es cualquier residuo de aminoácido) [41]. Las Plasticinas tienen relativamente las mismas secuencias, hidrofobicidades y anfipaticidad, pero presentan diferencias significativas en cuanto a sus espectros de actividad y sus interacciones aniónicas con la membrana [42,43].

Las filoquininas son péptidos relacionados con la bradicinina (BRP) que constan de 11 residuos de aminoácidos. Estos péptidos son altamente conservados con solo una posición variable: S/T en la posición 6 de la región media de la secuencia peptídica, a su vez poseen la estructura de una bradicinina con dos residuos adicionales unidos a su arginina C-terminal (IY) [44,45]. Además, esta familia peptídica ha demostrado tener actividad sobre efectos reductores de la presión arterial [44].

Los péptidos ricos en tirosina (TRP), constan de 11 residuos de aminoácidos, diferenciándose únicamente por sustituciones en la posición uno de una valina por una leucina (V/L) y en la posición quinta de una serina por una treonina (S/T) [46]. Los TRP

poseen una amidación en el extremo C-terminal y carecen de información relativa sobre su actividad biológica y farmacológica [46,47].

Por último, los péptidos huérfanos son aquellos que no se pertenecen a ningún miembro de las otras familias peptídicas ya reportadas en la base de datos de Uniprot [48].

1.2. Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos (AMR) se considera un importante problema de salud pública en todo el mundo [49,50]. En 2021, la OMS informó que más de 700 mil muertes anuales se presentan cada año en el mundo debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos, lo que podría ocasionar 10 millones de muertes en los próximos 25 años y dejar pérdidas económicas que superarían los 100 billones de dólares en el 2050 [50]. En el Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en su reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos 2014- 2018, informó que el microorganismo sujeto a vigilancia de resistencia a los antimicrobianos que se ha reportado en mayor porcentaje es *E. coli* con más del 50%, seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, existen otros microorganismos resistentes que se han reportado en menor frecuencia como: *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, entre otros [51].

En relación a lo mencionado, en las dos últimas décadas, la resistencia ha alcanzado proporciones pandémicas debido al uso excesivo e inadecuado de antibióticos [52,53]. Por ende, la falta de eficacia de los fármacos antimicrobianos actuales contra un número cada vez mayor de patógenos conlleva a que la salud de los seres humanos sea gravemente afectada por el surgimiento de especies bacterianas resistentes a antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos [54,55]. Además, la resistencia a los antibióticos tiene una elevada morbilidad y mortalidad, lo que conlleva un aumento de los costes médicos y estancias clínicas prolongadas [56].

Bajo esta problemática, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas frente a la resistencia bacteriana. En este caso, la piel de los anfibios es una de ellas, ya que ha demostrado tener diferentes bioactividades entre ellas, actividad antimicrobiana.

1.3. Justificación de la investigación

La AMR es un problema complejo que requiere un enfoque multisectorial unificado. Por lo tanto, el tema de las resistencias a los antibióticos ha hecho urgente la búsqueda de alternativas a los antibióticos convencionales, con modos de acción novedosos y menos predispuestos a la resistencia bacteriana [55]. En la búsqueda de nuevos antibióticos, los péptidos bioactivos de la secreción cutánea de anfibios son el mejor punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos [57]. En Ecuador existe una alta diversidad anfibios (658 especies). A pesar de que se han realizado estudios en torno al potencial biomédico de los AMPs de anfibios, aún se desconoce la composición peptídica de todas estas especies [58].

Con este enfoque, *Phyllomedusa vaillantii* es una especie de rana perteneciente a la subfamilia Phyllomedusinae, en la cual se ha descubierto un gran número de AMP entre ellos, predominantemente de anuros del género *Phyllomedusa*. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de encontrar compuestos bioactivos en sus secreciones cutáneas. Hasta la fecha solo se ha realizado un único estudio en esta especie, en el cual identificaron un nuevo AMP de la familia filoseptina con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas [59]. Dicho esto, la caracterización estructural de su composición peptídica significa una oportunidad inestimable de descubrir y describir nuevos compuestos químicos biológicamente activos. Además, esto permitirá salvaguardar sus recursos genéticos los cuales pueden tener potencial biomédico para el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos con potencial aplicación farmacéutica.

1.4. Preguntas de investigación

¿Cuál es la composición peptídica presente en la secreción cutánea de la rana mono de líneas blancas *Phyllomedusa vaillantii*?

1.5. Hipótesis

La secreción cutánea de la rana mono de líneas blancas (*Phyllomedusa vaillantii*) está compuesta por dermaseptinas, dermatoxinas, distinctinas, medusinas, filoseptinas, plasticinas, filoquininas, filoxinas y péptidos huérfanos.

1.6. Objetivos

1.6.1. General

Caracterizar la composición peptídica presente en la secreción cutánea de la rana mono de líneas blancas (*Phyllomedusa vaillantii*).

1.6.2. Específicos

- Identificar las secuencias precursoras de péptidos de la secreción cutánea de *Phyllomedusa vaillantii* a través de clonaje molecular.
- Predecir la actividad biológica de los péptidos de *Phyllomedusa vaillantii* mediante herramientas bioinformáticas.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Recolección de muestras de *Phyllomedusa vaillantii*

En este estudio, se emplearon cuatro especímenes de *P. vaillantii* proporcionado por el Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios. Las secreciones cutáneas se extrajeron mediante un masaje en la zona dorsal de los anfibios. Este método estimula la secreción del exudado de las glándulas granulares parótidas y tibiales a la superficie de la piel [60]. La secreción se recolectó con agua destilada en vasos de precipitación estériles de 1 litro. Posteriormente la secreción se trasvasó a tubos cónicos estériles de 25 ml y se congelaron inmediatamente a -80°C por 24h. Las secreciones fueron liofilizadas por 3 días en un VirTis BenchTop Pro Freeze Dryer (Sp Scientific, USA) y finalmente se almacenaron a -20°C hasta su análisis posterior. Una vez realizado este proceso, los especímenes fueron devueltos a sus terrarios. Adicionalmente, esta investigación fue realizada bajo el contrato marco de acceso a recursos genéticos: **MAE-001-13-IC-FAU-DNB/MA**, emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAE).

2.2. Clonaje Molecular

2.2.1. Extracción de ARNm de la secreción cutánea

La extracción del ARNm de la secreción cutánea de *P. vaillantii* se realizó utilizando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ (DynaL Biotec, UK). El ARNm poli-A se aisló de la secreción cutánea liofilizada mediante hibridación con el oligo dT unido a las microesferas y eluyendo posteriormente de las Dynabeads en varios pasos, como se indica a continuación. Primero se diluyeron 4.4 mg de secreción liofilizada en 1 ml de tampón de lisis/unión celular. El ARNm poliadenilado se separó de la dilución utilizando las perlas magnéticas oligo-dT del kit. Posteriormente, se realizaron dos lavados continuos a las perlas hibridadas con 500 µl de los tampones de lavado A y B del kit. Finalmente, el ARNm se separó de las perlas empleando 18 µl de tampón de elución (trisHCl) y shock térmico a 80°C. El ARNm aislado de la secreción se utilizó inmediatamente en la construcción de la librería de ADNc.

2.2.2. Construcción de librería de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)

Se empleó el sistema GoScript™ Reverse Transcription System para sintetizar la primera cadena de 3'ADNc mediante transcripción reversa. Para favorecer la hibridación, se incubaron 4 µl del ARNm extraído y 1 µl del primer 3'CDS (20 µM) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'; V=A, C, o G, N=A, T, C, o G) por 5 min a 70°C seguidos de 5 min en hielo. A esta reacción se añadieron 15 µl de máster mix: 4 µl de Go Script 5x buffer, 3.2 µl $MgCl_2$, 1 µl dNTPs mix, 1 µl Go Script Retrotranscriptasa y 5.8 µl de H_2O PCR. Se prepararon 6 réplicas de esta librería de ADNc

2.2.3. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE PCR)

A partir de la librería de ADNc construida previamente se realizaron 3'-RACE PCR para obtener las secuencias nucleotídicas precursoras de los péptidos antimicrobianos que transcribe *P. vaillantii* [22]. Para lo cual, se usaron 5 µl del cDNA y 15 µl de master mix para cada reacción de RACE PCR: 4 µl de Buffer Green 5x, 4 µl de $MgCl_2$, 0,4 µl dNTPS mix (10mM), 0,5 Primer Forward (20 µM), 0,5 µl de Primer Reverse (20 µM), 0,2 µl de enzima GoTaq polimerasa y 5,8 µl H_2O PCR. Los primers forward utilizados fueron: PDS (5'-GACCAAAGATGTCWTTCTTGAAGAAAT-3') que fue diseñado con base al péptido opioide de *A. dacnicolor* y DERS-1 (5'-TGACCTTCAGTACCCAGCACTTTC-3') fue diseñado a partir de las regiones 5' y 3' UTR conservadas de las preprodermaseptinas [61,62]. En cambio, como primer reverse se usó el Nested Universal Primer (NUP) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'). Por último, las muestras fueron colocadas en el termociclador con el siguiente método: 1 ciclo de 94°C por 60 s para el paso de denaturación inicial, a 94° C por 30 s en cuanto al paso de denaturación, respecto al proceso de hibridación, las temperaturas de annealing empleadas fueron para DERS-1 (55°C y 57°C), PDS (59°C y 61°C) con un tiempo de 30 s, el proceso de extensión se realizó a 72°C por 3 minutos, por 40 ciclos respectivamente, el proceso de extensión se realizó a 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

2.2.4. Visualización de productos de PCR por electroforesis

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Se cargaron 5 µl de cada producto de PCR, su respectivo control negativo

y el marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Promega, USA). Las condiciones de la corrida de electroforesis fueron a 400 mA y 70 V por 90 minutos. Una vez terminada la corrida, el gel se tiñó durante 30 minutos en una solución de 5 µl de Diamond™ Nucleic Acid Dye de Promega en 50 ml de TBE 1X y se visualizó en un transiluminador Enduro GDS touch 1302 (Labnet, USA) con luz UV.

2.2.5. Purificación de los productos de las RACE PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el sistema PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™, USA) para eliminar los dímeros de dNTPs y restos de primers que se producen durante la reacción de PCR. En resumen, se seleccionaron los productos PCR entre 300 y 400 pb. Por ende, 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.

2.2.6. Ligación de productos de RACE PCR con pGEM™ -T Easy Vector

Los productos de PCR purificados se ligaron empleando el sistema pGEM™ -T Easy Vector (Promega). Para este proceso se preparó un master mix de ligación compuesto de: 2,5 µL de 2X Buffer de ligación rápida, 0,5 µL del pGEM™ -T Easy Vector 50 ng, 1 µL del producto purificado, 0,5 µL de la T4 DNA Ligasa 3 unidad weiss/µl y 0,5 µL de agua desionizada, volumen final de 5 µl. El producto de la reacción de ligación en tubo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y luego se incubó a 4°C durante toda la noche (16-18 h) en refrigeración.

2.2.7. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana del producto de ligación con el vector pGEM-T Easy se realizó en *E. coli* JM109 y *E. coli* DH5 α. Primero se descongeló, sobre hielo, una alícuota de 50 µl de bacterias competentes *E. coli* JM109 o 100 µl de *E. coli* DH5 α almacenada a -80 °C y a través de shock térmico se transformaron con 2,3 µl del

producto de ligación. Se incubó la mezcla en una cama de hielo por 20 min, luego se llevó a una temperatura de 42 °C por 50 s para provocar el shock térmico y finalmente se colocó sobre hielo por 2 min. Las muestras se incubaron en 950 µl de medio SOC a 37 °C con agitación de 150 rpm por 2h y 30 min. Se sembraron al menos 4 placas con 100 µl de cultivo en placas con medio MacConkey suplementado con ampicilina (100 µg/ml), 2 placas con Agar LB/AMP, las placas se incubaron por 18h a 37°C.

2.2.8. Selección de colonias transformadas

Se seleccionaron 100 colonias blancas (Lac negativas, resistentes a ampicilina) y se subcultivaron por estriado en nuevas placas con agar MacConkey suplementadas con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

2.2.9. Aislamiento del ADN recombinante

La extracción del ADN recombinante se realizó mediante shock térmico. Para lo cual se resuspendió cada colonia estriada de color blanco en el paso anterior en 20 µl de agua estéril. La lisis bacteriana se provocó incubando las muestras a 100°C por 5 min y luego se provocó shock térmico en hielo por 5 min para la precipitación del ADN. Se separó el ADN por centrifugación del lisado a 14000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante con el ADN recombinante suspendido.

2.2.10. Amplificación de ADN recombinante mediante PCR

El ADN recombinante se amplificó por PCR utilizando los primers Forward M13F (5'-GTAACGCCAGGGTTTCCAC-3') y Reverse M13R (5'-TGTGAGCGGATAACAATTTCAC-3'). La máster mix fue constituida por: 14,8 µL de H_2O tipo PCR, 5 µL del Buffer Green 5X, 0,8 µL del $MgCl_2$ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL del primer M13F a 10 µM, 1,25 µL del primer M13R a 10 µM, 0,125 µL de la enzima GoTaq polimerasa y 1,25 µL del ADN de plásmido. Se empleó agua en lugar de ADN para el control negativo. La reacción de PCR se realizó utilizando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial de 1 ciclo de 94°C/60 s; denaturación a 94°C/30 s, annealing a 55°C/30 s y extensión 72°C/ 180 s a 35 ciclos respectivamente; y 1 ciclo de 72°C por 10 minutos de extensión final.

2.2.11. Visualización por electroforesis de productos de Cloning PCR

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X.

2.2.12. Secuenciación de los precursores peptídicos

Se seleccionaron los productos clonados con un peso mayor a 600 pb y se secuenciaron por el método Sanger (Servicios de laboratorio, Universidad de las Américas, Quito, Ecuador). Se enviaron alícuotas de aproximadamente 10 µl de los productos de PCR. Utilizando los primers M13F y M13R para el secuenciamiento del ADN clonado que codifica a los precursores biosintéticos de péptidos antimicrobianos.

2.2.13. Análisis bioinformáticos de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron en el software de acceso libre MEGA X. Primero se evaluó que la lectura de las secuencias obtenidas sea correcta, con un pico único de lectura por cada nucleótido. Se identificó la secuencia “AAT TCG AT” como inicio de la secuencia inserta en las lecturas forward (con el primer M13F) y se eliminó las secuencias después de la cola de poli A en la secuencia inserta. Se identificó la secuencia “TAG TGA T” en las lecturas reverse (con el primer M13R) y se eliminó las secuencias después de la cola de poli T en la secuencia inserto. Las secuencias nucleotídicas limpias se tradujeron a secuencia de aminoácidos y se realizó un alineamiento básico local en BLAST/n y BLAST/p para comparar la secuencia nucleotídica y de aminoácidos con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología con un cierre de búsqueda en organismos “frogs & toads (taxid:8342)” [40]. La masa teórica del péptido se calculó en el servidor de acceso libre en línea Peptide Mass Calculator V 3.2 [63]. La predicción de la estructura secundaria del péptido se llevó a cabo en SOPMA [64], se predijo la actividad antimicrobiana en antimicrobial peptide scanner vr.1 [65], a su vez las propiedades fisicoquímicas en Bachem Peptide 10 Calculator, se realizó el modelo de predicción rueda helicoidal alfa del péptido utilizando Heliquest [66]. Finalmente, la estructura 3D fue predicha por el software I-TASSER [67].

CAPÍTULO III. Presentación de Datos y Resultados

3.1. Secuencias precursoras obtenidas a partir de clonaje molecular

Con base a un pool de muestras de secreciones cutáneas de *Phyllomedusa vaillantii* se identificaron doce secuencias de nucleótidos que codifican a prepropéptidos. Entre estos se encontraban tres filoquininas y una filoseptina que se informaron previamente en otras especies. Las otras ocho secuencias de péptidos maduros eran nuevas, incluida una variante de medusina, cinco dermaseptinas, un péptido rico en tirosina y un péptido huérfano.

Filoquininas

Se clonó de manera reiterada 3 secuencias precursoras entre 304 a 310 nucleótidos, de longitud completa, que codificaban a prepropéptidos. Los cuales se nombraron: filoquininógeno-PV1, filiquinina-PV1 y filoquinina-PV2.

En primer lugar, se identificó una secuencia precursora de 304 nucleótidos que codifica a un filoquininógeno. El marco de lectura abierto (ORF) consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 29 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR) y una secuencia de cuatro aminoácidos (ESPE) en el lado C-terminal de este último; (3) un péptido maduro de 11 aminoácidos (Figura 1A). Este precursor peptídico se denominó filoquininógeno-PV1 para representar su origen en *P. vaillantii*.

En segundo lugar, se identificaron dos secuencias de nucleótidos de 304 a 310 pb que codifican a filoquininas. Los marcos de lectura abiertos traducidos correspondían a: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 29 aminoácidos que contenía dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR) y una secuencia de cuatro aminoácidos (ESPE o EYKK) en el lado C-terminal de este último; y (3) un péptido maduro de 11 aminoácidos (Figura 1B y 1C, respectivamente). Los precursores peptídicos se denominaron filoquinina-PV1 y filoquinina-PV2.

A. Filoquininógeno-PV1	
	<u>M S F L K K S L L L V L F L G L V S F S</u>
1	ATGTCTTTCTTGAAGAAATCTCTTCTCCTTGACTTTTCCTTGGATTGGTTTCCTTTCT
	<u>I C E E E K R E T E E E E N E D E I E E</u>
61	ATCTGTGAAGAAGAGAAGCGAGAGACTGAAGAGGAAGAGAATGAAGATGAAATAGAGGAA
	E S E E Q K R E S P E R P P G F S P F R
121	GAAAGTGAAGAGCAGAAAAGAGAGTCTCCAGAAAGACCTCCTGGTTTCAGTCCTTTTCGA
	I Y *
181	ATTTATTAACACATTA AAAAGATGTAAACATGCTATAATTTAAATAGCACAGTTATCGATA
241	ATTATGCTAAAAACATATTAAGCATATCTAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
301	AAAA
B. Filoquinina-PV1	
	<u>M S F L K K S L L L V L F L G L V S F S</u>
1	ATGTCTTTCTTGAAGAAATCTCTTCTCCTTGACTTTTCCTTGGATTGGTTTCCTTTCT
	<u>I C E E E K R E T E E E E N E D E I E E</u>
61	ATCTGTGAAGAAGAGAAGCGAGAGACTGAAGAGGAAGAGAATGAAGATGAAATAGAGGAA
	E S E E Q K R E S P E R P P G F T P F R
121	GAAAGTGAAGAGCAGAAAAGAGAGTCTCCAGAAAGACCTCCTGGTTTCACTCCTTTTCGA
	I Y *
181	ATTTATTAACACATTAAGAGATGTAAACATGCTATAATTTAAATAGCACAGTTATCGATA
241	ATTATGCTAAAAACATATTAAGCATATCTAATGGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
301	AAAAAA
C. Filoquinina-PV2	
	<u>M S F L K K S L L L V L F L G L V S F S</u>
1	ATGTCATTCTTGAAGAAATCTCTTCTCCTTGACTTTTCCTTGGATTGGTTTCCTTTCT
	<u>I C E E E K R E T E E E E N E D E I E E</u>
61	ATCTGCGAAGAAGAGAAGCGAGAGACTGAAGAGGAAGAGAATGAAGATGAAATAGAGGAA
	E S E E Q K R E Y K K I P P G F T P F R
121	GAAAGTGAAGAGCAGAAAAGAGAGTATAAAAAAATACCTCCTGGTTTCACTCCTTTTCGA
	I Y *
181	ATTTATTAACACATTA AAAAGATGTAAACATGCTATAATTTAAATAGCACAGTTATCGGTA
241	ATTATGCTAAAAACATATTAAGCATATCTAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
301	AAAA
D.	
	←-----1-----→ 2 3 ←-----4-----→
Filoquininógeno-PV1	MSFLKKSLLLVLFLGLVSFSIC EEE KR ETEEEENEDEIEEESEEQ
Filoquinina-PV1	MSFLKKSLLLVLFLGLVSFSIC EEE KR ETEEEENEDEIEEESEEQ
Filoquinina-PV2	MSFLKKSLLLVLFLGLVSFSIC EEE KR ETEEEENEDEIEEESEEQ
Filoquininógeno-PV1 5	
	←6→ ←-----7-----→
Filoquinina-PV1	KR ESPE RPPGFSPFRIY *
Filoquinina-PV2	KR ESPE RPPGFTPFRIY *
	KR EYKK IPPGFTPFRIY *

Figura 1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas traducidas del marco de lectura abierto que codifican a filoquininas.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023.

Los péptidos señal están subrayados, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas los péptidos maduros están resaltados de color gris, el codón de terminación está marcado por un asterisco. D) Estructuras de dominio de los precursores de Filoquininógeno-PV1, Filoquinina-PV1 y Filoquinina-PV2: 1. Péptido señal putativa. 2, 4, 6. Espaciadores ácidos. 3, 5. Sitios de procesamiento del propéptido convertasa dibásica. 7. Péptido maduro.

Por otro lado, en cuanto al análisis de sus secuencias aminoacídicas al someterlas a un Blast/p en la base de datos de GenBank se obtuvo lo siguiente:

La secuencia aminoacídica del precursor peptídico de péptido del filoquininógeno-PV1 compartió el 98.39% de identidad y 100% de cobertura con el filoquininógeno-B1 de *Phyllomedusa bicolor* (número de acceso: AFR78288.1). En cambio, la secuencia madura es similar en un 100% con el péptido filoquininógeno-B1 de *P. bicolor*, filoquininógeno-1 de *Phithecopus hypochondialis* y filoquinina de *P. sauvagii* (números de acceso: AFR78288.1, P84900.2, y P84697.1 respectivamente). Cabe señalar, que el precursor del péptido reportado solamente se diferencia en un aminoácido ubicado en el péptido señal en comparación con el filoquininógeno-B1, véase Tabla 1.

La secuencia aminoacídica del precursor de la filoquinina-PV1 es similar en un 96.77% con el filoquininógeno-B1 de *P. bicolor* (cobertura 100%) y un 66.67% con el precursor de dermaseptina-PC de *Phyllomedusa coelestis*, pero solamente el 77% de cobertura (números de acceso: AFR78288.1 y QGU34109.1, respectivamente). En este caso, al comparar los precursores de la filoquinina-PV1 con el filoquininógeno-B1 se observa una sustitución de aminoácido en el péptido señal y en el péptido maduro. Sin embargo, al comparar solamente la secuencia del péptido maduro obtuvo una identidad del 100% con el Kininógeno-1 de *Phyllomedusa sauvagii* (número de acceso: Q800F1.1), y con la [Thr⁶]-filoquinina de *Physalaemus nattereri* (número de acceso: C0HKA7.1), en ambos casos con un 100% de cobertura.

Respecto al precursor de la filoquinina-PV2, este comparte un 64.29% de similaridad con precursor de dermaseptina-PC de *Phyllomedusa coelestis* con una cobertura del 83% y un 52,46% con el precursor de amolopquinina- [TR¹] un péptido similar a la bradicinina de *Amolops torrentis* con una cobertura del 98%, (números de acceso: QGU34109.1 y ADV36199.1, respectivamente). Sin embargo, el péptido maduro fue 100% a Des-Arg¹- [Thr⁶]- filoquinina de *Physalaemus signifer*, [Thr⁶]- filoquinina de *P. nattereri*, [Ala¹, Thr⁶]-filoquinina de *P. signifer* y al [Thr⁶]-filoquinina de *Phyllomedusa sauvagii*, todos con una cobertura del 90%, (números de acceso: P86819.1, C0hka7.1, P86818.1, Q800F1.1 respectivamente). Aunque en el alineamiento no considera al primer aminoácido de filoquinina-PV2, véase tabla 1. Cabe mencionar que solamente se encuentra reportada la secuencia del péptido maduro de Des-Arg¹-[Thr⁶]- filoquinina en la base de datos de NCBI.

Tabla 1. Alineamiento múltiple de secuencias traducidas del marco abierto de lectura de Filoquininogeno-PV1, Filoquinina-PV1 y Filoquinina-PV2 en *P. vaillantii*.

Péptido	Secuencia
a)	
Filoquininógeno-PV1	<u>MSFLKKSLLLVFLGLVSFSI</u> C ²²
Filoquininógeno-B1	. A 51
Filoquininógeno-PV1	<i>EEEKRETEEEENEDEIEEESEEQKR</i> ESPE ⁵¹
Filoquininógeno-B1	 63
Filoquininógeno-PV1	RPPGFSPFRI Y [*]
Filoquininógeno-B1	 *
b)	
Filoquinina-PV1	<u>MSFLKKSLLLVFLGLVSFSI</u> C ²²
[Thr ⁶]-filoquinina	. DI F
Filoquininógeno-B1	. A
Filoquinina-PV1	<i>EEEKRETEEEENEDEIEEESEEQKR</i> ESPE ⁵¹
[Thr ⁶]-filoquinina	 D D K A . .
Filoquininógeno-B1	
Filoquinina-PV1	RPPGF TFPFR IY [*] 63
[Thr ⁶]-filoquinina	 *
Filoquininógeno-B1	 S *
c)	
Filoquinina-PV2	<u>MSFLKKSLLLVFLGLVSFSI</u> C ²²
[Thr ⁶]-filoquinina	. DI F
Des-[Arg ¹]-[Thr ⁶]-filoquinina	- - - - -
Filoquinina-PV2	<i>EEEKRETEEEENEDEIEEESEEQKR</i> EYKK ⁵¹
[Thr ⁶]-filoquinina	 D D K A . .
Des-[Arg ¹]-[Thr ⁶]-filoquinina	- - - - -
Filoquinina-PV2	I PPGFTFPFR IY [*] 63
[Thr ⁶]-filoquinina	 *
Des-[Arg ¹]-[Thr ⁶]-filoquinina	- *
[Ala ¹]-[Thr ⁶]-filoquinina	A *

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

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

Los péptidos señales 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) está en negrita.

Filoseptina

Se identificó una secuencia precursora de 310 nucleótidos que codifica a una filoseptina en la secreción cutánea de *P. vaillantii* mediante clonaje molecular. El marco de lectura abierto consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 26 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR); (3) un péptido maduro de 22 aminoácidos. Este precursor prepropeptídico se denominó filoseptina-PV1 para representar su origen en *P. vaillantii*.

La secuencia aminoacídica completa del precursor de la filoseptina-PV1 compartió un 95.45% de similaridad con la filoseptina-B1 de *P. bicolor*, un 93.94% con filoseptina-B2 de *P. bicolor* y un 81.82% tanto con filoseptina-PT de *Phyllomedusa tarsius* y filoseptina-PV1 de *P. vaillantii* (números de acceso: Q800R3.1, AFR78285.1, SIP79164.1 y QMP81456.1). En cambio, considerando solo la secuencia peptídica madura se obtuvo un 100% de identidad y 100% de cobertura tanto para el precursor de filoseptina-1 de *P. sauvagii*, filoseptina-B2 de *Phyllomedusa bicolor* y filoseptina-S1 de *P. sauvagii*, (números de acceso: CBJ56559.1, AFR78285.1 y F7UI84.1). Tomando en cuenta este resultado se observó que, las secuencias de aminoácidos de los precursores correspondientes eran idénticas, pero identificadas en diferentes especies de anuros, (tabla 2).

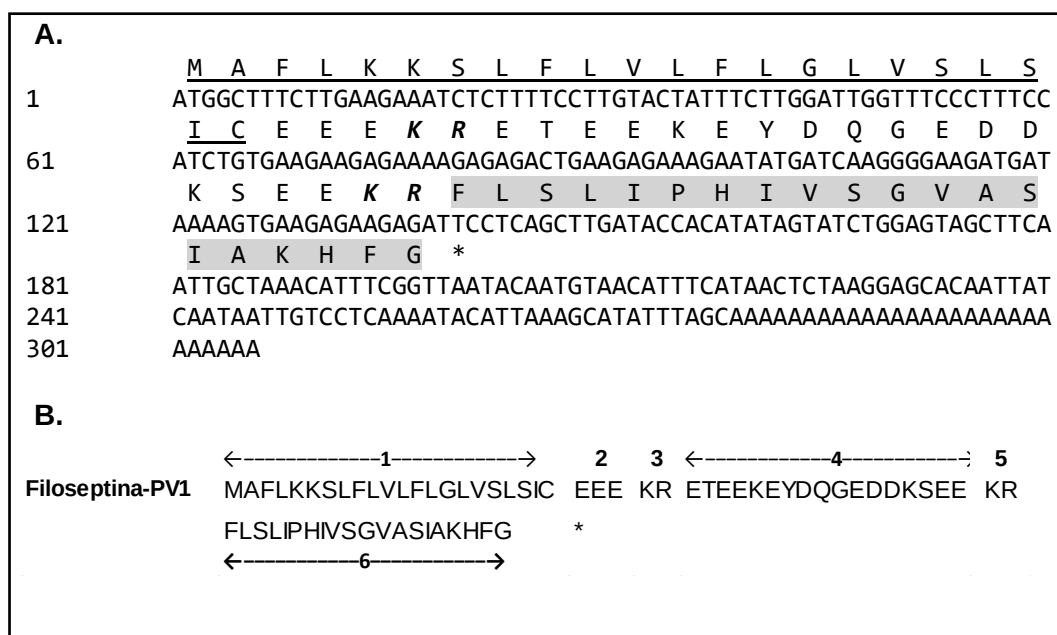


Figura 2. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de secreción cutánea de *P. vaillantii* y su traducción a aas del marco abierto de lectura de filoseptina-PV1.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023.

A) El péptido señal está subrayado, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, el péptido maduro está resaltado de color gris; el codón de terminación está marcado por un asterisco. B) Estructuras de dominio de los precursores filoseptina-PV1: 1. Péptido señal putativa. 2, 4. Espaciadores ácidos. 3, 5. Sitios de procesamiento de la propéptido convertasa dibásica. 6. Péptido maduro.

Tabla 2. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de filoseptina-PV identificado en la secreción cutánea de *P. vaillantii*.

Péptido	Secuencia
Filoseptina-PV1	<u>M A F L K K S - L F L V L F L G L V S L S I C</u> ²³
Filoseptina-B2	 - . . . F R
Filoseptina-S1	 -
Precursor de la filoseptina-1	. D I L ⁴⁷
Filoseptina-PV1	<i>E E E K R E T E E K E Y D Q G E D D K S E E K R</i>
Filoseptina-B2	G . K
Filoseptina-S1	 E . H . . E
Precursor de la filoseptina-1	 E . H . . E
Filoseptina-PV1	F L S L I P H I V S G V A S I A K H F G * ⁶⁸
Filoseptina-B2	 *
Filoseptina-S1	 *
Precursor de la filoseptina-1	 *

. : aminoácidos conservados, - : gaps añadidos para maximizar la alineación,

* : codón de parada

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

El péptido señal está subrayado, el espaciador ácido se encuentra en cursiva, el péptido maduro está resaltado de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR) está en negrita.

Medusina

Se clonó una secuencia precursora de 310 nucleótidos que codifica a una medusina en la secreción cutánea de *P. vaillantii* mediante la construcción de librerías de cDNA. El marco de lectura abierto consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 26 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR); (3) un péptido maduro de 22 aminoácidos (Figura 3). La secuencia aminoacídica completa se denominó Medusina-PV1 para resaltar su origen en *P. vaillantii*.

La secuencia del prepropéptido compartió el 83.58% de identidad con medusina-PT de *Phyllomedusa tarsius* y un 89.55% con Medusina-S1 de *Phyllomedusa sauvagii*, ambas con una cobertura del 100% respectivamente (números de acceso: A0A1M4BLT1.1 y F7UI88.1). En cambio, la secuencia madura comparte el 84.21% de identidad tanto con la medusina-S1 de *P. sauvagii* como con medusina-H1 de *Pithecopus hypochondrialis* y un 78.95% con medusina-PT de *P. tarsius*, las tres con una cobertura del 100% en el alineamiento, (números de acceso: F7UI88.1, LOP402.1 y A0A1M4BLT1.1), (Tabla 3).

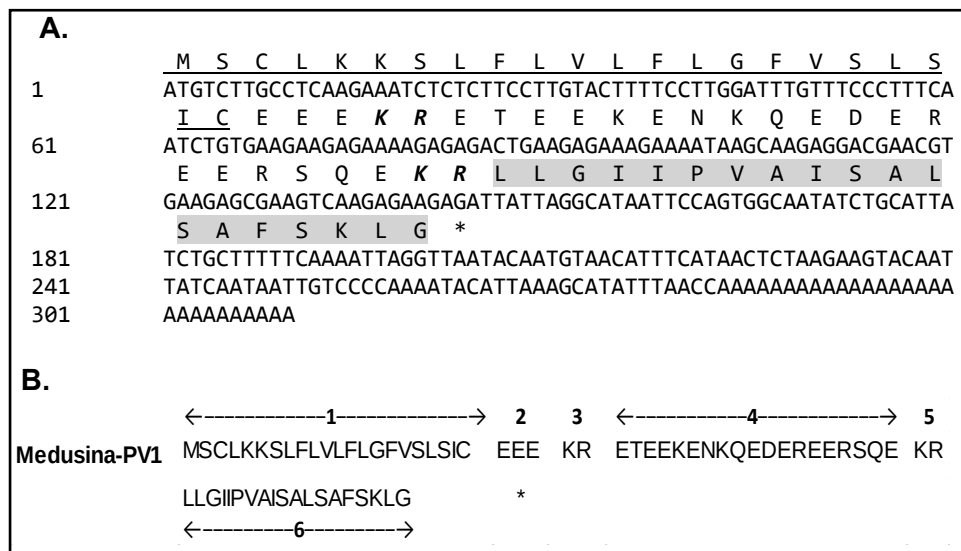


Figura 3. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de s. cutánea de *P. vaillantii* y su traducción a aas del marco abierto de lectura medusina-PV1.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

A) El péptido señal putativo está subrayado; los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, el péptido maduro está resaltado de color gris; el codón de terminación está marcado por un asterisco. B) Estructuras de dominio de los precursores medusina-PV1.: 1. Péptido señal putativa. 2, 4. Espaciadores ácidos. 3, 5. Sitios de procesamiento de la proéptido convertasa dibásica. 6. Péptido maduro.

Tabla 3. Alineamiento múltiple de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de medusina identificado en la secreción cutánea de *P. vaillantii*.

Péptido	Secuencia	
Medusina-PV1	<u>M S C L K K S - L F L V L F L G F V S L S I C</u>	23
Medusina-PT	. A F L F	
Medusin-S1	. . F -	
Medusina-H1	. D F - F	
Medusina-PV1	<i>E E E K R E T E E K E N K Q E D E R E E R S Q E K R</i>	49
Medusina-PT	 D E . . . D E	
Medusin-S1	 E . . . D E	
Medusina-H1	 E . . . D R E	
Medusina-PV1	<u>L L G I I P V A I S A L S A F S K L G *</u>	69
Medusina-PT	. . . M T . I . . L	
Medusin-S1	. . . M I . . L	
Medusina-H1	. . . M I . . L	

. : aminoácidos conservados - : gaps añadidos para maximizar la alineación

* : codón de parada.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

El péptido señal está subrayado, el espaciador ácido se encuentra en cursiva, el péptido maduro está resaltado de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR) está en negrita.

Dermaseptinas

Cinco secuencias precursoras de 270 a 360 nucleótidos que codifican a nuevas dermaseptinas fueron identificadas en la secreción cutánea de *P. vaillantii* mediante clonaje molecular. Las mismas fueron denominadas como dermaseptina-PV1 hasta dermaseptina-PV5, de acuerdo con las reglas de nomenclatura propuestas para los péptidos antimicrobianos de la familia Phyllomedusinae.

El marco de lectura abierto traducido consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 22 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR). En cambio, sus péptidos maduros variaron entre 27 a 33 aminoácidos. Además, las nuevas cinco Dermaseptinas contienen una glicina donante de amida dentro de la secuencia GEQ en el extremo C-terminal, véase figura 4E.

Por otro lado, al comparar las secuencias aminoacídicas de las preprodermaseptinas se obtuvo que, dermaseptina-PV1 y dermaseptina-PV2 compartieron entre el 68.35% al 70% de identidad con el precursor de dermaseptina-PC de *Phyllomedusa coelestis* con una cobertura del 100% y entre el 87,50% al 87.72% de identidad con dermaseptina-H4 de *Pithecopus azureus* con una cobertura del 72%, (números de acceso: QGU34109.1 y Q1EJP5.1). En cambio, sus péptidos maduros compartieron una identidad del 65.71% con dermaseptina-A5 de *Agalychnis annae* y entre 66.67% al 70.37% con dermaseptina-H5 de *Pithecopus azureus*, con coberturas del 84% al 100% (números de acceso: O93226.1 y Q1EJP4.1).

Con respecto a dermaseptina-PV3 y dermaseptina-PV4 compartieron una identidad del 63.10% al 65.48% con el precursor de dermaseptina-PC de *Phyllomedusa coelestis* con una cobertura del 100% y un porcentaje de identidad del 82.46% al 85.96% con dermaseptina-H4 de *Pithecopus azureus* con una cobertura del 70%, (números de acceso QGU34109.1 y Q1EJP5.1). Las secuencias peptídicas maduras de dermaseptina-PV3 y PV4 eran idénticas en un 66.67% con dermaseptina-A5 de *Agalychnis annae* con una cobertura del 100%, sin embargo, dermaseptina-PV3

compartió una similaridad del 61.29% con dermaseptina-H5 de *Pithecopus azureus* con una cobertura del 86% y un e-valué del 0.018 indicando que no es significativa la coincidencia, (números de acceso: O93226.1 y Q1EJP4.1).

En el caso de dermaseptina-PV5 obtuvo una identidad del 64.71% con el precursor de dermaseptina-PC *Phyllomedusa coelestis* con una cobertura del 94% y un 73.17% con dermaseptina-PT9 de *Phyllomedusa tarsius*, (números de acceso: QGU34109.1, A0A5P9NYS6.1). En cambio, la secuencia peptídica madura era idéntica en un 73.33% tanto con dermaseptina-L1 de *Agalychnis lémur* y dermaseptina-H2 de *Pithecopus azureus*, con una cobertura del 100%, (números de acceso: P0DTD6.1 y P84937.1).

A. Dermaseptina-PV1

```

M A F L K K S L F L V L F L G L V S L S
1  ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTCTTCTTGTACTATTCTTGGATTGGTGTCTCTTTCT
   I C E E E K R E Y E D E E E Q E D D E Q
61  ATCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAATATGAAGATGAGGAGGAACAAGAAGATGACGAACAA
   S E M K R G L W S K I K D V G K A A A K
121 AGTGAAATGAAGAGAGGGCTGTGGAGTAAAATAAAAGATGTAGGAAAAGCTGCAGCAAAA
   A A G K A A L N A V S E V V G E Q *
181 GCTGCAGGCAAAGCAGCTTTAAATGCAGTTTCTGAGGTGGTGGGAGAGCAATAAATTTAA
241 GAAAATGTAAAATCAAATTGCTCTTAACAGAGTAATTATCAATATTTGTGCCAACCTTT
301 ATTAAGCAAATTGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

B. Dermaseptina-PV2

```

M A F L K K S L F L V L F L G L V S L S
1  ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTCTTCTTGTACTATTCTTGGATTGGTGTCTCTTTCT
   I C E E E K R E Y E D E E E Q E D D E Q
61  ATCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAATATGAAGATGAGGAGGAACAAGAAGATGACGAACAA
   S E M K R G L W S K I K D V G K E A A K
121 AGTGAAATGAAGAGAGGGCTGTGGAGTAAAATAAAAGATGTAGGAAAAGAGCAGCAAAA
   A A G K A A L N A V S E V V G E Q *
181 GCTGCAGGCAAAGCAGCTTTAAATGCAGTTTCTGAGGTGGTGGGAGAGCAATAAATTTAA
241 CGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

C. Dermaseptina-PV3

```

M A F L K K S L F L V L F L G L A S L S
1  ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTCTTCTTGTATTATTCCTTGGATTGGCGTCTCTTTCT
   I C E E E K R E Y E D E E E Q E D D E Q
61  ATCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAATATGAAGATGAGGAGGAACAAGAAGATGACGAACAA
   S E M K R G L W S K I K D V G K E A A K
121 AGTGAAATGAAGAGAGGGCTGTGGAGTAAAATAAAAGATGTAGGAAAAGAGCAGCAAAA
   A A A K A A G K A A L N A V S E V V G E
181 GCTGCAGCAAAAGCTGCAGGCAAAGCAGCTTTAAATGCAGTTTCTGAGGTGGTGGGAGAG
   Q *
241 CAATAAATTTAAGAAAATGTAAAATCAAATTGCTCTTAACAGAGTAATTATCAATATTGT
301 GCCAACCTTTATTAAGCAATTGAACTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

D. Dermaseptina-PV4

```

M A F L K K S L F I V L F L G L F S L S
1  ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTTTTTTATTGTACTATTCTTGGATTGTTCTCTCTTTCT
   I C E E E K R E Y E D E E E Q E D D E Q
61  ATCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAATATGAAGATGAGGAGGAACAAGAAGATGACGAACAA
   S E M K R G P W S K I K D V G K E A A K

```

121	AGTGAAATGAAGAGAGGGCCGTGGAGTAAAATAAAAGATGTAGGAAAAGAAGCAGCAAAA
	<u>A A A K A A G K A A L N A V S E V V G E</u>
181	GCTGCAGCAAAAGCTGCAGGCAAAGCAGCTTTAAATGCAGTTTCTGAGGTGGTGGGAGAG
	<u>Q *</u>
241	CAATAAATTTAAGAAAATGTAAAGTCAAATTGCTCTTAACAGAGTAATTATCAATATTTG
301	TGCCAAACCTTTATTAAAGCAAATTGAACTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

E. Dermaseptina-PV5

	I R R <u>K R</u> E N E D E E E Q E D D E Q S E
1	ATCAGGAGGAAAAGAGAAAACGAAGATGAGGAGGAACAAGAAGATGACGAGCAAAGTGAA
	<u>M K R G L W S K I K E V A K A A G K A A</u>
61	ATGAAGCGAGGGCTGTGGAGTAAAATAAAAGAAGTAGCAAAAGCTGCAGGAAAAGCGGCT
	<u>F G A V T D A I S Q G E Q *</u>
121	TTCGGTGCAGTTACTGATGCAATAAGTCAAGGAGAGCAATAAAGTTAAGAAAATGTAAAT
181	CAAAGTCTCTGAGGAGTACAATTATCAATAATTGTTCCAAATCTATATTAACAAATT
241	GACGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

F.

	←-----1-----→	2	3	←-----4-----→	5
Dermaseptina-PV1	MAFLKKSLFLVLFLGLVLSLIC	EEE	KR	EYEDEEEQEDDEQSEM	KR
Dermaseptina-PV2	MAFLKKSLFLVLFLGLVLSLIC	EEE	KR	EYEDEEEQEDDEQSEM	KR
Dermaseptina-PV3	MAFLKKSLFLVLFLGLASLSIC	EEE	KR	EYEDEEEQEDDEQSEM	KR
Dermaseptina-PV4	MAFLKKSLFIVLFLGLFSLIC	EEE	KR	EYEDEEEQEDDEQSEM	KR
Dermaseptina-PV5		IRR	KR	ENEDEEEQEDDEQSEM	KR

	←-----6-----→	7
Dermaseptina-PV1	GLWSKIKDVGKAAAKAAGKAALNAVSEV	GEQ *
Dermaseptina-PV2	GLWSKIKDVGKEAAKAAGKAALNAVSEV	GEQ *
Dermaseptina-PV3	GLWSKIKDVGKEAAKAAAKAAGKAALNAVSEV	GEQ *
Dermaseptina-PV4	GPWSKIKDVGKEAAKAAAKAAGKAALNAVSEV	GEQ *
Dermaseptina-PV5	GLWSKIKEVAKAAGKAAFGAVTDAISQ	GEQ *

Figura 4. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de la s. cutánea de *P. vaillantii* y su traducción aas del marco abierto de lectura de Dermaseptina-PV1-5.
Realizado por: Nayeli Pineda, 2023.

A-E) Los péptidos señal están subrayados; los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, el péptido maduro está resaltado de color gris; el codón de terminación está marcado por un asterisco. F) Estructuras de dominio de los precursores Dermaseptina-PV1-5. Péptido señal putativa. 2, 4. Espaciadores ácidos. 3,5. Sitios de procesamiento de la propéptido convertasa dibásica. 6. Péptido maduro. 7. una glicina donante de amida.

Tabla 4. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de los péptidos Dermaseptinas-PV1 a PV5 identificados en la secreción cutánea de *P. vaillantii*.

Péptido	Secuencia
Dermaseptina-PV1	MAFLKKSLFLVLFLGLVLSI CEE EKREYED EEEQEDDEQSEM KR ⁴⁵
Dermaseptina-PV2	
Dermaseptina-A5	 N
Dermaseptina-H5	- - - - - M. N K
Dermaseptina-PV1	GLWSKI KDVGKAAAKAA- - - GKAA LNAVSEV VGEQ ⁸¹ *
Dermaseptina-PV2	 E. *
Dermaseptina-A5	. M. . T. RN. . . S. . . . NLPA. . . . G. I . . A *
Dermaseptina-H5	 T. . N. . . E. . I . . - - - . . V . G S L - - - - *
Dermaseptina-PV3	MAFLKKSLFLVLFLGLASLSI CEE EKREYED EEEQEDDEQSEM KR ⁴⁵
Dermaseptina-PV4	 I F.
Dermaseptina-A5	 V. N
Dermaseptina-PV3	GLWSKI KDVGKEAAKAAAKAAGKA ALNAVSEV VGEQ ⁸² *
Dermaseptina-PV4	. P. *
Dermaseptina-A5	. M. . T. RN. . . S. . . . NLP. - G. I . . A *
Dermaseptina-PV5	I RR KRENEDEEEQEDDEQSEM KR ²³
Dermaseptina-L1	- - - - -
Dermaseptina-H2	- - - - -
Dermaseptina-PV5	GLWSKI KEVAKAAGKA AFGAVTDA I SQGEQ - - * ⁵⁶
Dermaseptina-L1	 A. LN. . . GLVN. . D . P S *
Dermaseptina-H2	 D. . A. . . . L. . . NE. L - - . . - - *

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

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023.

Los péptidos señales 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) está en negrita.

Péptidos ricos en Tirosina

Una nueva secuencia precursora de 293 nucleótidos que codifica a un péptido rico en tirosina (TRP), fue clonada cinco veces a partir de la secreción cutánea de *P. vaillantii*. El marco de lectura abierto consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 27 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR); (3) un péptido maduro de 12 aminoácidos (Figura 5B).

La secuencia aminoacídica completa del péptido rico en tirosina, TRP-PV1, obtuvo un 67.35% de porcentaje de identidad con el precursor de caerina 1.1 de *Litoria splendida* con una cobertura del 80% y un 57,38% con el precursor de dermaseptina-PC de *Phyllomedusa coelestis* de una cobertura del 100%, (números de acceso: ACG50814.1 y QGU34109.1). Cabe indicar que estos porcentajes de similitud se evidenciaron especialmente en la parte del péptido señal y zona ácida. En cambio, cuando se sometió la secuencia del péptido maduro se obtuvo un 80.00% de identidad con TRP-J1 de *Phasmahyla jandaia* con una cobertura del 83% y un valor *e* de 0.003; un 88.89% de similaridad con TRP-HA1 de *Pithecopus azureus* con una cobertura del 75% y un valor *e* de 0.004, (números de acceso: P86709.1, P84960.1). Cabe mencionar que, hasta la fecha los péptidos ricos en tirosina no poseen registro del precursor en la base de datos de NCBI.

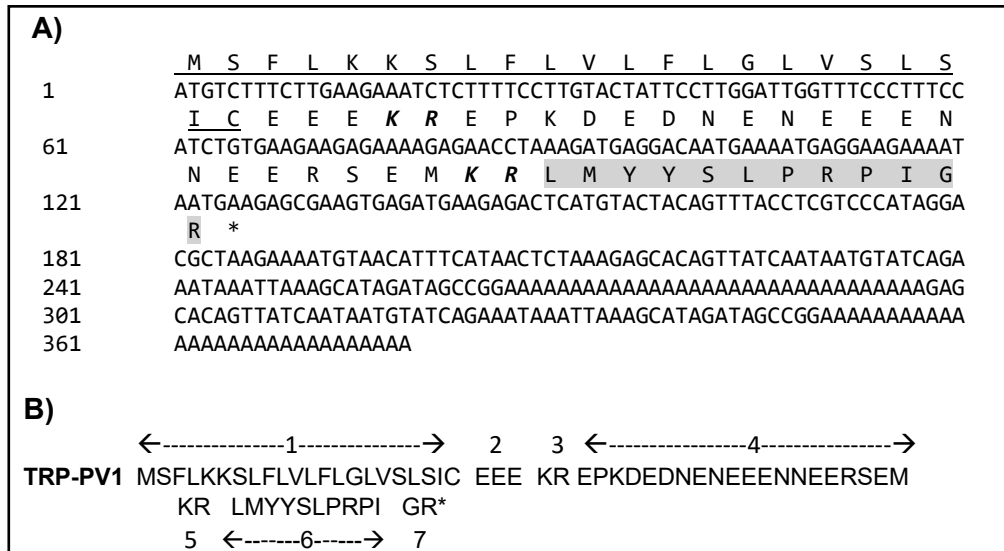


Figura 5. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de s. cutánea de *P. vaillantii* y su traducción a aas del marco abierto de lectura del péptido rico en tirosina.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

A) El péptido señal está subrayado, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, el péptido maduro está resaltado de color gris; el codón de terminación está marcado por un asterisco. B) Estructuras del precursor TRP-PV1: 1. Péptido señal putativa. 2, 4. Espaciadores ácidos. 3, 5. Sitios de procesamiento de la propéptido convertasa dibásica. 6. Péptido maduro. 7. una glicina donante de amida.

Tabla 5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de péptidos ricos en tirosina.

Péptido	Secuencia	
		22
TRP-PV1	<u>M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C</u>	
TRP-HA1	- - - - -	
TRP-J1	- - - - -	
		49
TRP-PV1	<i>E E E K R E P K D E D N E N E E E N N E E R S E M K R</i>	
TRP-HA1	- - - - -	
TRP-J1	- - - - -	
TRP-PV1	<u>L M Y Y S L P R P I G R</u> *	63
TRP-HA1	- V *	
TRP-J1	. . . T . . . V *	

. : aminoácidos conservados, - : gaps añadidos para maximizar la alineación, * : codón de parada. TRP-HA1, TRP-J1 tienen únicamente registro del péptido maduro en la base de datos del NCBI.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

El péptido señal está subrayado, el espaciador ácido se encuentra en cursiva, el péptido maduro está resaltado de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR) está en negrita.

Péptido huérfano

Se identificó una nueva secuencia precursora de 310 nucleótidos que codifica a un péptido huérfano en la secreción cutánea de *P. vaillantii*. El marco de lectura abierto consistió en: (1) un péptido señal putativo de 22 aminoácidos; (2) un espaciador ácido de 18 aminoácidos que contienen dos sitios de procesamiento de propéptidos (KR); (3) un péptido maduro de 25 aminoácidos.

La secuencia prepropeptídica compartió el 60% de identidad con triptofilina-1 de *Agalychnis dacnicolor*, y un 51.52% con Dermatoxin-S1 de *Phyllomedusa sauvagii* (números de acceso: P83455.2 y Q5DVA5.1) con una cobertura del 70 y 96% respectivamente, estos porcentajes de identidad se vieron reflejos en la zona del péptido señal y acídica. En cambio, la secuencia madura correspondió al 82% de identidad tanto con una proteína hipotética GDO81_013901 de *Engystomops pustulosus* (números de acceso: KAG8568144.1) con un valor e de 2, lo cual indica una identidad no significativa (Ver figura 5 y Tabla 6). Por lo cual resultó que péptido clonado es realmente divergente en su secuencia siendo asignado a la familia de péptidos huérfanos.

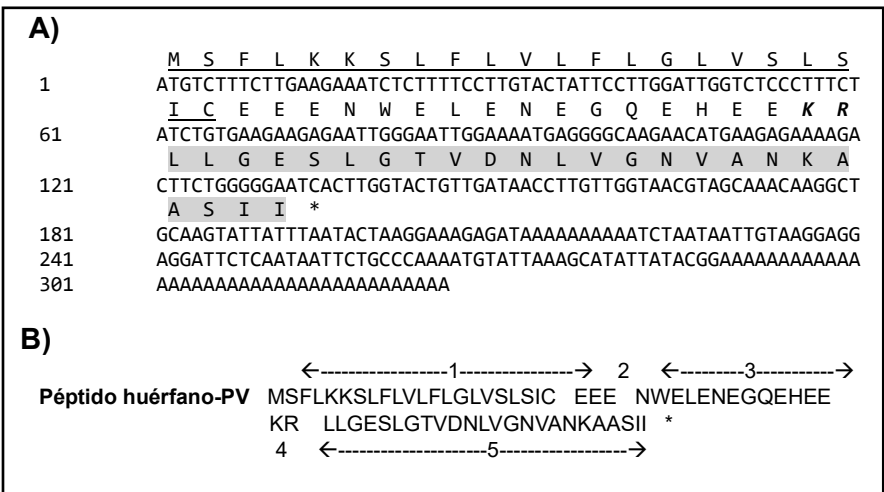


Figura 6. Secuencia nucleotídica ADNc clonado de la s. cutánea de *P. vaillantii* en aas del marco abierto de lectura de huérfano-PV.
Realizado por: Nayeli Pineda, 2023.

A) El péptido señal está subrayado, los espaciadores ácidos se encuentran en cursivas, el péptido maduro está resaltado de color gris; el codón de terminación está marcado por un

asterisco. B) Estructuras de dominio del precursor del péptido huérfano-PV: 1. Péptido señal putativa. 2, 3. Espaciadores ácidos. 4. Sitios de procesamiento de la proéptido convertasa dibásica. 5. Péptido maduro.

Tabla 6. Alineamiento múltiple de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del péptido Desconocido-PV identificado en la secreción cutánea de *P. vaillantii*.

Péptido	Secuencia
Huérfano-PV1	<u>M S F L K K S L F L V L F L G L V S L S I C</u>
Dermatoxina-S1	. A I P . . F .
Triptofilina-1	. N F . . I . F .
Proteína hipotética GDO81 013901	- M L S S S P P Y E H I R G E C T P G D V A
Huérfano-PV1	E E E N W E L E N E G Q E H - - - - E E K R
Dermatoxina-S1	. N D K R . G . . . E E Q D D D Q S
Triptofilina-1	D . . K R Q D D D . . N . R - - - - . . . K
Proteína hipotética GDO81 013901	S K A A S I I P . Y S R N . - - - - K F F L
Huérfano-PV1	L L G E S L G T V D N L - - - - V G N V A N K A A S I I - - *
Dermatoxina-S1	A . . T L . K G . G S A - - - - . A T . G K M V . D Q F G K *
Triptofilina-1	E I Q . D - - - - G . Q - - - - E E R R D K P P . W V P G K *
Proteína hipotética GDO81 013901	Q . S D F F W . S Y R S R F Y L P Y . T N G S E . M I M Q T L *

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

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

El péptido señal está subrayado, el espaciador ácido se encuentra en cursiva, el péptido maduro está resaltado de color gris y los codones de parada se muestran con un asterisco. El sitio de escisión de la tripsina (KR) está en negrita.

3.2. Características fisicoquímicas de los péptidos identificados

La carga neta, el momento hidrofóbico, hidroficidad y masa teórica de los péptidos identificados se determinaron *in sillico* mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Dichos resultados se predicen y se tabulan a continuación:

Tabla 7. Características fisicoquímicas de los péptidos identificados en la secreción cutánea de *P. vaillantii*.

Nombre	Secuencia(aa)	Tamaño	Hidroficidad <H>	Momento hidrofóbico <μH>	Carga a pH 7	Masa teórica (Da)
Filoquininógeno-PV1	RPPGFSPFRIY	11	-	-	2	1335.69
Filoquinina-PV1	RPPGFTPRIY	11	-	-	2	1349.71
Filoquinina-PV2	IPPGFTPRIY	11	-	-	1	1306.69
Medusina-PV1	LLGIIPVAISALSAFSKLa	18	0.875	0.369	1	1811.11
Filoseptina-PV	FLSLIPHIVSGVASIAKHFa	20	0.806	0.551	1	2034.16
Dermaseptina-PV1	GLWSKIKDVGKAAAKAA GKAALNAVSEVVa	29	0.268	0.305	3	2850.63
Dermaseptina-PV2	GLWSKIKDVGKAAAKAA GKAALNAVSEVVa	29	0.235	0.334	3	2908.63
Dermaseptina-PV3	GLWSKIKDVGKAAAKAA AKAAGKAALNAVSEVVa	33	0.205	0.228	3	3249.84
Dermaseptina-PV4	GPWSKIKDVGKAAAKAA AKAAGKAALNAVSEVVa	33	0.175	0.223	3	3233.81
Dermaseptina-PV5	GLWSKIKEVAKAAGKAA FGAVTDAISQa	27	0.316	0.337	2	2715.49
Huérfano-PV1	LLGESLGTVDNLVGNVANI	24	0.457	0.472	0	2367.29

a: péptido amidado en el extremo C-terminal

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

Por un lado, se comparó las propiedades físico-químicas de los péptidos identificados en *P. vaillantii* con los otros péptidos que compartieron identidad. En este caso se los agrupó por familias peptídicas, como se detalla a continuación:

Filoseptina

Tabla 8. Características fisicoquímicas del péptido filoseptina-PV identificado en las secreciones de *P. vaillantii*. 4.11*14.14

Nombre	Secuencia (aa)	Tamaño	Hidroficidad <H>	Momento hidrofóbico <μH>	Carga a pH 7	Masa teórica (Da)
Filoseptina-PV	FLSLIPHIVSGVASIAKHFa	20	0.806	0.551	2.18	2035.15
Filoseptina-B2	FLSLIPHIVSGVASIAKHFa	20	0.806	0.551	2.18	2035.15
Filoseptina-S1	FLSLIPHIVSGVASIAKHFa	20	0.806	0.551	2.18	2035.15

a: péptido amidado en el extremo C-terminal

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

Medusina

Tabla 9. Características fisicoquímicas del péptido medusina identificado en las secreciones de *P. vaillantii*.

Nombre	Secuencia(aa)	Tamaño	Hidrofobicidad <H>	Momento hidrofóbico <μH>	Carga a pH 7	Masa teórica (Da)
Medusina-PV1	LLGIIPVAISALSAFSLa	18	0.875	0.369	2	1811.11
Medusina-PT	LLGMIPVAITAISALSKLa	18	0.861	0.335	2	1809.10
Medusina-S1	LLGMIPVAISAISALSKLa	18	0.844	0.352	2	1795.09
Medusina-H1	LLGMIPVAISAISALSKLa	18	0.844	0.352	2	1795.09

a: péptido amidado en el extremo C-terminal

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

Dermaseptinas

Tabla 10. Características fisicoquímicas de los péptidos Dermaseptinas identificados en las secreciones de *P. vaillantii*.

Nombre	Secuencia(aa)	Tamaño	Hidrofobicidad <H>	Momento hidrofóbico <μH>	Carga a pH 7	Masa teórica (Da)
Dermaseptina-PV1	GLWSKIKDVGKAAAKAAGKAALNAVSEVa	29	0.268	0.305	4	2850.63
Dermaseptina-PV2	GLWSKIKDVGKEAAKAAGKAALNAVSEVa	29	0.235	0.334	3	2908.63
Dermaseptina-PV3	GLWSKIKDVGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEVa	33	0.205	0.228	4	3249.84
Dermaseptina-PV4	GPWSKIKDVGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEVa	33	0.175	0.223	4	3233.81
Dermaseptina-PV5	GLWSKIKEVAKAAGKAAFVAVTDAISQa	27	0.316	0.337	3	2715.49
Dermaseptina-A5	GMWSTIRNVGKSAKAANLPAKALGAISEAVa	32	0.336	0.333	4	3153.70
Dermaseptina-H5	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAVLGSLa	25	0.436	0.230	3	2605.10
Dermaseptina-PT9	GLWSKIDAAKTAGKAALGFVNEMVa	25	0.348	0.447	3	2605.10
Dermaseptina-L1	GLWSKIKEAAKAAGKAALNAVGLVNQGDQPSa	32	0.239	0.372	3	3193.65
Dermaseptina-9TR	GLWSKIDAGKAVLKAAGKAALGAVTDAVa	29	0.311	0.303	4	2809.35

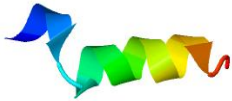
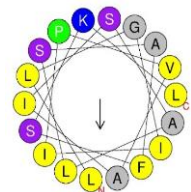
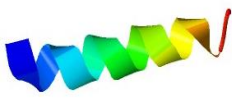
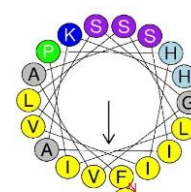
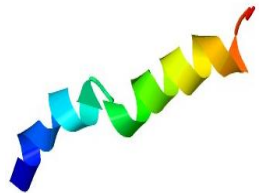
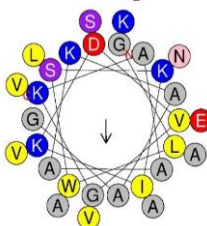
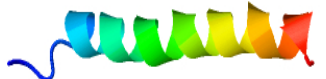
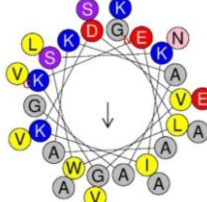
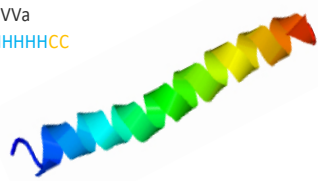
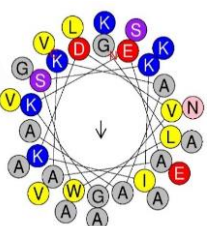
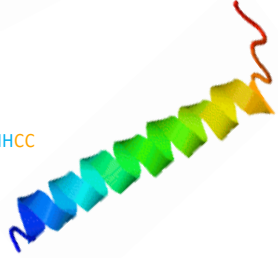
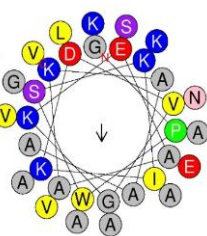
a: péptido amidado en el extremo C-terminal, el color rojo significa el cambio de aminoácido que diferencia una dermaseptina de otra.

Realizado por: Nayeli Pineda, 2023

3.3. Predicción de la estructura secundaria mediante SOPMA y predicción de la estructura 3D por I-TASSER

Los análisis bioinformáticos han revelado que los péptidos tienen una propensión significativa a adoptar una estructura en forma de hélice α . Filoseptina-PV tenía un 60% de hélice α siendo el más bajo, mientras Dermaseptina-PV1 presentó un 90 % de hélice α correspondiendo al más alto de los péptidos identificados en *P. vaillantii*. Además, los diagramas de ruedas helicoidales ilustran las características anfipáticas y las propiedades de las hélices alfa en los péptidos analizados, véase Tabla 11.

Tabla 11. Predicción de la estructura secundaria y 3D por I-TASSER y diagramas de rueda helicoidal de los péptidos identificados.

Péptido	Predicción de la estructura secundaria PHD [%]	Predicción de la estructura 3D	Proyección de rueda helicoidal
Medusina-PV1	LLGIIPVAISALSAFSLa CCCCHHHHHHHHHHHHCC Hélice (<i>Ile</i> ₄ – <i>Lys</i> ₁₇) [73,68 %]		
Filoseptina-PV1	FLSLIPHIVSGVASIAKHFa CccccchHHHHHHHHHHHC Hélice (<i>His</i> ₇ – <i>His</i> ₁₈) [60 %]		
Dermaseptina-PV1	GLWSKIDVGKAAAKAAGKAALNAVSEVva CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC Hélice (<i>Trp</i> ₃ – <i>Val</i> ₂₉) [90 %]		
Dermaseptina-PV2	GLWSKIDVGKEAAKAAGKAALNAVSEVva CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC Hélice (<i>Lys</i> ₅ – <i>Val</i> ₂₉) [78,12 %]		
Dermaseptina-PV3	GLWSKIDVGKEAAKAAGKAALNAVSEVva CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC Hélice (<i>Trp</i> ₃ – <i>Val</i> ₃₃) [88,11 %]		
Dermaseptina-PV4	GPWSKIDVGKEAAKAAGKAALNAVSEVva CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC Hélice (<i>Ile</i> ₆ – <i>Val</i> ₃₃) [77,78 %]		

La composición peptídica identificada en la secreción cutánea de *P. vaillantii* se analiza por grupos, como se detalla a continuación:

Filoquininas

Por medio de comparaciones en GenBank empleando Blast/p, se identificaron tres péptidos que mostraron un alto grado de similitud con los péptidos pertenecientes a la familia de las filoquininas. Filoquininogeno-PV1 es idéntico en un 100% al péptido Filoquininogeno-B1 de *P. bicolor*, filoquinina-PV1 y PV2 comparten una similitud del 93 % al 100 % con otras filoquininas de diferentes especies. Estos porcentajes permiten inferir que se han identificado filoquininas en la secreción cutánea de *P. vaillantii*. Para ratificar lo mencionado, al analizar la estructura primaria de los péptidos maduros, estos presentan una secuencia conservada XPPGFXPFRIY (donde, X: es un aminoácido no conservado), véase figura 1. De acuerdo a Thompson y colaboradores en 2022; Brand y colaboradores en 2002, las filoquininas son péptidos que poseen la estructura de una bradiquinina con dos residuos adicionales unidos a su arginina en su extremo C-terminal (IY) [44,45]. En virtud de ello, al compartir esta característica filoquininogeno-PV1, filoquinina-PV1, filoquinina-PV2 son consideradas dentro de esta familia peptídica.

Por un lado, en la figura 1, se observa que luego del sitio de escisión KR continúa un residuo de cuatro aminoácidos indicando que corresponde a una región extendida que contiene residuos de aminoácidos ácidos que son escindidos para generar los péptidos maduros. Por ende, se considera que la liberación de los péptidos maduros podría procesarse mediante la escisión en el sitio -KR- seguida de una interacción enzimática específica [45,70]. Expuesto lo anterior, se explica como una característica estructural que permite producir la modificación postraducciona de los péptidos relacionados a las bradiquininas como las filoquininas, no obstante, se requiere de una investigación a futuro para corroborar este argumento.

Las filoquininas son fuertemente vasoactivas, pueden producir la relajación del músculo liso arterial al actuar sobre los receptores de bradiquinina (BK) del depredador que los ingiere (incluyendo serpientes, aves y mamíferos) [70,71]. Hasta la fecha, los receptores de bradiquinina se dividen en dos tipos, denominados B_1 y B_2 que se basan en criterios farmacológicos de interacción fármaco-receptor [70]. El receptor B_2 se expresa de forma constitutiva en muchos tipos de células, incluidas las células musculares lisas, mientras que el receptor B_1 es inducible y se expresa de *ново* en varios tipos de células tras un

traumatismo o en zonas de inflamación crónica [72,73]. Cada receptor tiene diferentes requisitos de estructura/actividad del ligando, siendo el BK el que activa a ambos, pero siendo el des-(Arg⁹)-BK el ligando preferente para el subtipo B₁, lo cual podría ser una importante estrategia de defensa contra sus depredadores [70,72]. En resumen, se puede contrastar que los péptidos identificados en esta familia se alinean con diferentes especies de anuros que expresan el mismo péptido, por ende, existe una probabilidad de que se dirigen a los mismos receptores de la bradiquinina. Por ello, los péptidos similares a la bradiquinina distribuidos en la piel de los anfibios pueden desempeñar funciones defensivas solos o en sinergia con otros compuestos.

Filoseptina-PV1

Se identificó a una filoseptina ya reportada en *Phyllomedusa bicolor* (filoseptina-B2) y en *Phyllomedusa sauvagii* (filoseptina-1) y en esta ocasión en la secreción cutánea de *P. vaillantii*. Como se observa en la figura 2B, los aminoácidos conservados se concentran en la región del N-terminal, FLSLIP-, en la posición siete presenta una H y un residuo amidado en el C-terminal que se predijo a partir de la posición del donante de glicina amida. En este caso, la secuencia se denominó Filoseptina-PV1 de acuerdo con la nomenclatura propuesta para los péptidos antimicrobianos de esta familia [32].

La determinación de la actividad antimicrobiana de los péptidos filoseptinas permite comprender la relación estructura-actividad a partir de sus características físico-químicas. Como se observa en la tabla 8, Filoseptina-PV1 presenta propiedades idénticas a las otras especies mencionadas anteriormente. Correspondiendo a una carga neta de +2 y el porcentaje de hélice alfa del (60%) en su estructura. Por lo que se plantea que este péptido podría exhibir baja actividad antimicrobial, a pesar de ser un péptido helicoidal hidrofóbico y anfipático. Esta hipótesis encuentra sustento en los estudios experimentales de Leite (2005) y Resende (2008) quienes indicaron que las filoseptinas no poseen una concentración mínima inhibitoria (MIC) significativa para *S. aureus* y que únicamente tienen efectos débiles sobre el crecimiento de la levadura *C. albicans*. Sin embargo, en los estudios realizados por Zhang y colaboradores en 2010; König y colaboradores en 2012, identificaron un péptido similar al clonado en este estudio, filoseptina-1 y filoseptina-B2, respectivamente, los cuales demostraron una alta actividad antimicrobiana con un valor de MIC de 5µM y una hemólisis del 6.71% contra la bacteria Gram-positiva (*S. aureus*) y con la bacteria Gram-negativa (*E.coli*) obtuvieron un MIC de 80 µM, a pesar de sus propiedades físico-químicas, lograron demostrar ser

un AMP clásico que erradica biopelículas enteras [74,75]. Por otro lado, al clonar el mismo péptido que se ha identificado en otras especies demuestra que el intercambio entre familias de AMPs sigue siendo la excepción y no la regla, sobre todo es más frecuente de lo que se creía.

Medusina-PV1

La estructura primaria de medusina-PV1 comparte una identidad limitada con otras medusinas (84%). Para corroborar, si se trata de nueva medusina, se ha tomado en cuenta que esta secuencia presenta los siguientes aminoácidos conservados, LLGXIPVAIXAXSAXSKLG (donde, X: es un aminoácido no conservado), así como, presenta un residuo de Gly (G) en el extremo C- terminal, lo que sugiere la amidación del péptido en ese extremo. Sin embargo, Xi y colaboradores en 2013, indicaron que estos péptidos son realmente conservados con solo dos posiciones variables: L/V en la posición 7 y A/S en la posición 14. Poseen una secuencia N-terminal hexapéptida totalmente conservada, -LLGMIP- y una secuencia C-terminal tetrapéptida amidada -LSKL- [37]. Tomando en cuenta estas características, medusina-PV1 se considera como una variante de esta familia peptídica, contradiciendo lo mencionado por Xi y colaboradores. Por ende, este resultado permite plantear investigaciones a futuro sobre seguir explorando la composición peptídica en anuros.

Por otro lado, respecto a las características físico-químicas: la estructura secundaria, la carga neta, la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico, son quienes influyen en la interacción de los péptidos antimicrobianos con membranas modelo y células biológicas. Medusina-PV1 exhibe propiedades físicas similares a otras medusinas (Tabla 9). De acuerdo, a Xi y colaboradores en 2013; Gao y colaboradores en 2017, han demostrado que las medusinas, son parientes cercanos de las filoseptinas y difieren en su bioactividad. Por ende, las medusinas son inactivas contra Gram negativas (*E. coli*) y tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *C. albicans* y *Batrachochytrium dendrobatidis* [37,62]. Mencionado lo anterior, se confirma que al igual que otras medusinas, medusina-PV1 al presentar una carga positiva +2 se predice una interacción electrostática no significativa, por ende, se espera que presente baja actividad antimicrobiana. Este péptido presenta un momento hidrofóbico de 0.369 μ H, e hidroficidad de 0.875H, lo que indica que exhibe actividad antimicrobiana. La hidroficidad y el momento hidrofóbico indican la anfipaticidad del péptido, así como, la capacidad que tienen los péptidos para penetrar la membrana bacteriana. Además, se

observa la presencia de una Gly en el extremo C-terminal de medusina-Pv1, esto favorece la amidación en ese extremo, y aumenta la actividad antimicrobiana [76].

Dermaseptinas

Cinco prepro péptidos deducidos incluyen a nuevas dermaseptinas (DPS) identificadas en la secreción cutánea de *P. vaillantii*. La secuencia madura corresponde a una similitud del 61 % al 87 %, lo que indica que pertenece a esta nueva familia. Se identifica que las cinco nuevas dermaseptinas presentan un motivo consenso -AA(A/G)KAA- en el medio, contienen un residuo de triptófano (W) conservado en la posición 3 y una modificación postraduccional de amida en el extremo C-terminal [77]. Esta amidación C-terminal aumenta la carga positiva de DPS-PV1 a DPS-PV5 y evita la degradación en el entorno natural [78]. Los nuevos péptidos se denominaron dermaseptina-PV1 a PV5 de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Amiche, Ladram, Nicolas en 2008 [48].

Las propiedades fisicoquímicas de las nuevas dermaseptinas descritas en la tabla 10, predicen que tendrían actividad antimicrobiana. En este caso, se plantea que la cationicidad es directamente proporcional a la actividad antimicrobiana, al igual que la hidrofobicidad más no el contenido helicoidal. En otras palabras, se espera que DRS-PV1 a DRS-PV5 muestren actividad antimicrobiana, específicamente por su alta cationicidad e hidrofobicidad. Para comprobar esta predicción, Miorian, L y colaboradores en 2019 indicaron que la cationicidad es uno de los principales parámetros para optimizar la bioactividad de los péptidos antimicrobianos. Ellos diseñaron un análogo mejorado de DPS3 con cationicidad, de (+2 a +6), el cual mostró una potencia de 4 a 32 veces contra microorganismos [79]. Por un lado, se conoce que las dermaseptinas al unirse a la bicapa podrían iniciar la transformación a una estructura helicoidal α , que es esencial para su actividad antimicrobiana y la desestabilización de la membrana. Entonces, las dermaseptinas forman potencialmente una estructura helicoidal en el dominio N-terminal cuando interactúan con los lípidos, la anfipaticidad y las cargas, por ende, influyen en la actividad biológica con la hélice en conjunto [80]. Sin embargo, no están estrechamente relacionados con sus actividades. Aunque, en el estudio realizado por Cheng y colaboradores identificaron a un nuevo péptido denominado Dermaseptina-PS4. El cuál mostró actividades antimicrobianas más potentes que Dermaseptina-PH, debido a que el motivo consenso (-GKAAGKAA-) de Der-PS4 forma un mayor contenido helicoidal que (-GKAA-) de Dermaseptin-PH. Tomando en cuenta esto, el porcentaje helicoidal y la alta carga catiónica dan como

resultado la notable eficacia antimicrobiana de Der-PS4, así pues, confirmando la hipótesis planteada para respecto a esta familia peptídica [81].

Péptidos ricos en Tirosina

El repertorio molecular de la secreción cutánea de *P. vaillantii* incluye el péptido rico en tirosina TRP-PV1 que comparte un 80 % de similitud con TRP-J1 *P. sauvagii* y TRP-HA1 de *P. azurea*. El péptido TRP-HA1 posee dos únicas sustituciones: V/L en la posición 1 y S/T en la posición 14. En este caso, TRP-PV1 comparte las características mencionadas, a excepción de presentar un aminoácido variable en la posición 10. Además, los péptidos mencionados presentan amidación C-terminal y hasta el momento no se ha caracterizado la actividad biológica de estos péptidos [82].

Péptido huérfano

Se ha identificado un péptido que tiene similitud en sus precursores con dermaseptinas y precursores de dermatoxinas, pero sus secuencias maduras son altamente divergentes que no permiten una identificación precisa. Por tal razón, se ha designado temporalmente a la familia de péptidos huérfanos hasta que haya más información disponible en la base de datos de Uniprot. Dicho resultado, resalta la importancia de la exploración de la composición peptídica de las secreciones cutáneas de los anuros.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones y recomendaciones

La piel de los anuros representa un ejemplo adicional de defensa inmune basada en péptidos. En este estudio se ha caracterizado estructuralmente la composición peptídica de la secreción cutánea de *P. vaillantii*, identificándose doce familias peptídicas: tres filoquininas y una filoseptina que fueron reportadas previamente en otras especies. Las otras ocho secuencias de péptidos maduros son nuevas, incluida una variante de medusina, cinco dermaseptinas, un péptido rico en tirosina y un péptido huérfano. Además, se caracterizó la estructura primaria y se predijo la actividad biológica de los péptidos en *P. vaillantii*. Los nuevos péptidos dermaseptinas DRSPV1 a DRSPV5 presentaron una actividad antimicrobiana significativa en comparación de otras reportadas. No obstante, la familia dermaseptina se encuentra en una fase temprana de investigación. Por tal razón, es imprescindible continuar haciendo investigación para comprender el papel de otros péptidos bioactivos como los AMP de anfibios y entender su impacto en la inmunidad innata. Estos hallazgos permiten implementar estrategias novedosas frente al descubrimiento de fármacos naturales al proporcionar nuevas plantillas de la composición péptidos de anuros, y a su vez demuestra la importancia de conservar la biodiversidad de anfibios.

En el futuro, en lo que respecta a este estudio, es necesario e imperativo determinar la actividad biológica, hemolítica y sus mecanismos de acción de los péptidos identificados. Dado que, es esencial comprender el potencial como un posible enfoque en el diseño de fármacos a partir de las secreciones cutáneas de anuros. Aunque, se conoce que algunos péptidos antimicrobianos se encuentran en pruebas de laboratorio, una minoría ha llegado a ensayos clínicos. Debido a que, existen diferentes factores por considerar como: la toxicidad para las células sanas, la degradación por proteasas, el pH y los altos costos de producción. Para solucionar estos desafíos, se pueden emplear estrategias alternativas como modificar la longitud, el tamaño, la carga neta, la hidrofobicidad o la anfipaticidad con el fin de mejorar su bioactividad.

Sin duda alguna, en *P. vaillantii*, es necesario continuar en la búsqueda de péptidos bioactivos ya sea empleando otros primers específicos o nuevas técnicas de secuenciación.

REFERENCIAS

1. Clarke BT. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews*. 1997;72. doi:10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x
2. Kastin A. Handbook of Biologically Active Peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2013. doi:10.1016/C2010-0-66490-X
3. Patocka J, Nepovimova E, Klimova B, Wu Q, Kuca K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem*. 2018;26. doi:10.2174/0929867325666180713125314
4. McMahon TA, Sears BF, Venesky MD, Bessler SM, Brown JM, Deutsch K, et al. Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature*. 2014;511. doi:10.1038/nature13491
5. Hossack BR, Lowe WH, Ware JL, Corn PS. Disease in a dynamic landscape: Host behavior and wildfire reduce amphibian chytrid infection. *Biol Conserv*. 2013;157. doi:10.1016/j.biocon.2012.09.013
6. Wells KD. The Ecology and Behavior of Amphibians. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. 2013. doi:10.7208/chicago/9780226893334.001.0001
7. Lazarus LH, Attila M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Progress in Neurobiology*. 1993. doi:10.1016/0301-0082(93)90027-P
8. Rollins-Smith LA, Ramsey JP, Pask JD, Reinert LK, Woodhams DC. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments. *Integrative and Comparative Biology*. 2011. doi:10.1093/icb/ucr095
9. Rollins-Smith LA, Conlon JM. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental and Comparative Immunology*. 2005. doi:10.1016/j.dci.2004.11.004
10. Ramsey JP, Reinert LK, Harper LK, Woodhams DC, Rollins-Smith LA. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infect Immun*. 2010;78. doi:10.1128/IAI.00402-10
11. 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. doi:10.1016/j.ygeno.2009.09.004
12. Conceição K, Konno K, Richardson M, Antoniazzi MM, Jared C, Daffre S, et al. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides (NY)*. 2006;27. doi:10.1016/j.peptides.2006.08.005
13. Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, Vérièpe J, Goumon Y. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: History, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience*. 2013. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.013
14. Xu X, Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*. 2015. doi:10.1021/cr4006704

15. 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. doi:10.1074/jbc.M109.013276
16. Annunziato G, Costantino G. Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015–2020). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2020. doi:10.1080/13543776.2020.1851679
17. Lemes AC, Sala L, Ores JDC, Braga ARC, Egea MB, Fernandes KF. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. doi:10.3390/ijms17060950
18. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*. 2019.
19. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005
20. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30327-3
21. Ladram A, Nicolas P. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2016;21. doi:10.2741/4461
22. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*. 1995. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425
23. Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal*. 2009. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x
24. Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (NY)*. 2003;24. doi:10.1016/j.peptides.2003.08.023
25. König E, Bininda-Emonds ORP, Shaw C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*. 2015. doi:10.1016/j.peptides.2014.11.003
26. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*. 2003. doi:10.1124/pr.55.1.2
27. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016;44. doi:10.1093/nar/gkv1278
28. Bateman A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019;47. doi:10.1093/nar/gky1049
29. Leite JRSA, Silva LP, Rodrigues MIS, Prates M V., Brand GD, Lacava BM, et al. Phylloseptins: A novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides (NY)*. 2005;26. doi:10.1016/j.peptides.2004.11.002
30. Marenah L, McClean S, Flatt PR, Orr DF, Shaw C, Abdel-Wahab YHA. Novel insulin-releasing peptides in the skin of *Phyllomedusa trinitatis* frog include 28 amino acid peptide from dermaseptin BIV precursor. *Pancreas*. 2004;29. doi:10.1097/00006676-200408000-00005

31. Rivas L, Luque-Ortega JR, Andreu D. Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: Lessons from parasites. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009. doi:10.1016/j.bbamem.2008.11.002
32. Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily *Phyllomedusinae*. *Peptides (NY)*. 2008;29: 2074–2082. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.017
33. Bartels EJH, Dekker D, Amiche M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. *Front Pharmacol*. 2019;10. doi:10.3389/fphar.2019.01421
34. Chen T, Walker B, Zhou M, Shaw C. Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: Cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion. *Regul Pept*. 2005;129. doi:10.1016/j.regpep.2005.01.017
35. Conlon JM, Woodhams DC, Raza H, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, et al. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: *Phyllomedusinae*). *Toxicon*. 2007;50. doi:10.1016/j.toxicon.2007.04.017
36. Wieprecht T, Dathe M, Krause E, Beyermann M, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett*. 1997;417. doi:10.1016/S0014-5793(97)01266-0
37. Xi X, Li R, Jiang Y, Lin Y, Wu Y, Zhou M, et al. Medusins: A new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of *phyllomedusine* frogs. *Biochimie*. 2013;95. doi:10.1016/j.biochi.2013.02.005
38. Evaristo G, Pinkse M, Wang L, Zhou M, Wu Y, Wang H, et al. The chains of the heterodimeric amphibian skin antimicrobial peptide, distinctin, are encoded by separate messenger RNAs. *J Proteomics*. 2013;78. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.016
39. Dalla Serra M, Cirioni O, Vitale RM, Renzone G, Coraiola M, Giacometti A, et al. Structural features of distinctin affecting peptide biological and biochemical properties. *Biochemistry*. 2008;47. doi:10.1021/bi800616k
40. Wu D, Gao Y, Tan Y, Liu Y, Wang L, Zhou M, et al. Discovery of distinctin-like-peptide-PH (DLP-PH) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*, a prototype of a novel family of antimicrobial peptide. *Front Microbiol*. 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.00541
41. El Amri C, Nicolas P. Plasticins: Membrane-damaging peptides with “chameleon-like” properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. doi:10.1007/s00018-007-7445-8
42. El Amri C, Lacombe C, Zimmermann K, Ladram A, Amiche M, Nicolas P, et al. The plasticins: Membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry*. 2006;45. doi:10.1021/bi060999o
43. Bruston F, Lacombe C, Zimmermann K, Piesse C, Nicolas P, El Amri C. Structural malleability of plasticins: Preorganized conformations in solution and relevance for antimicrobial activity. *Biopolymers*. 2007;86. doi:10.1002/bip.20703

44. Thompson C, Williams ML. Review of the physiological effects of *Phyllomedusa bicolor* skin secretion peptides on humans receiving Kambô. *Toxicology Research and Application*. 2022;6. doi:10.1177/23978473221085746
45. Brand GD, Krause FC, Silva LP, Leite JRSA, Melo JAT, Prates M V., et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* (NY). 2006;27. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.020
46. Thompson AH, Bjourson AJ, Orr DF, Shaw C, McClean S. Amphibian skin secretomics: Application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis* azurea: Discovery of a novel peptide family, the hyposins. *J Proteome Res*. 2007;6. doi:10.1021/pr0702666
47. Erspamer V, Erspamer GF, Cei JM. Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Comparative*. 1986;85. doi:10.1016/0742-8413(86)90063-0
48. Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily *Phyllomedusinae*. *Peptides* (NY). 2008;29: 2074–2082. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.017
49. The Journal of Global Antimicrobial Resistance meets the World Health Organization (WHO). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019. doi:10.1016/j.jgar.2019.07.022
50. World Global Organization (WHO). "Antimicrobial resistance." In: World Global Organization (WHO), "Antimicrobial resistance." <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. 17 Nov 2021.
51. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Instituto nacional de investigación en salud pública reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en ecuador 2014-2018. Ministerio de Salud Publica. 2018;2.
52. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*. 2015. doi:10.2147/IDR.S55778
53. Singer RS. Antibiotic resistance - The interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infectious Diseases*. 2003. doi:10.1016/S1473-3099(03)00490-0
54. Mobarki N, Almerabi B, Hattan A. Antibiotic Resistance Crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries*. 2019. doi:10.24911/ijmdc.51-1549060699
55. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59. doi:10.1093/cid/ciu392
56. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*. 2016. doi:10.1080/21505594.2016.1159366
57. Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bolognetti C, di Scienze Biochimiche D, Rossi Fanelli A. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What Do They Tell Us? *Biopoly*. 1998.
58. Santiago R. Anfíbios del Ecuador. In: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>. 6 Jun 2023.

59. Liu Y, Shi D, Wang J, Chen X, Zhou M, Xi X, et al. A Novel Amphibian Antimicrobial Peptide, Phylloseptin-PV1, Exhibits Effective Anti-staphylococcal Activity Without Inducing Either Hepatic or Renal Toxicity in Mice. *Front Microbiol.* 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.565158
60. Vargas AP, Pérez Ó, Ortega Paredes D, Rivera M. Caracterización molecular de péptidos antimicrobianos a partir de muestras de piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). *Rev Ecuat Med Cienc Biol.* 2017;36. doi:10.26807/remcb.v36i1-2.265
61. Raja Z, André S, Piesse C, Sereno D, Nicolas P, Foulon T, et al. 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/journal.pone.0070782
62. 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
63. Rozenski. Peptide Mass Calculator v3.2. 1999. [cited 25 May 2023]. Available: <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.html>
64. Institute of Biology and Protein Chemistry. Sopma secondary structure prediction method. 2021. [cited 25 May 2023]. Available: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
65. Daniel Veltri. A Computational and Statistical Framework for Screening Novel Antimicrobial Peptides (Doctoral dissertation, George Mason University). 2015.
66. 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
67. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010;5: 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
68. Nicolas P, Vanhoye D, Amiche M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides (NY).* 2003;24. doi:10.1016/j.peptides.2003.08.017
69. Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, Amiche M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur J Biochem.* 2003;270. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03584.x
70. Xi X, Li B, Chen T, Kwok HF. A review on bradykinin-related peptides isolated from amphibian skin secretion. *Toxins.* 2015. doi:10.3390/toxins7030951
71. Conlon JM, Jouenne T, Cosette P, Cosquer D, Vaudry H, Taylor CK, et al. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;143. doi:10.1016/j.ygcen.2005.04.006
72. Hall JM. Bradykinin receptors: Pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther.* 1992;56. doi:10.1016/0163-7258(92)90016-S

73. Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*. 2005. doi:10.1124/pr.57.1.2
74. Zhang R, Zhou M, Wang L, McGrath S, Chen T, Chen X, et al. Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: A novel broad-spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity. *Mol Immunol*. 2010;47. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.010
75. König E, Clark VC, Shaw C, Bininda-Emonds ORP. Molecular cloning of skin peptide precursor-encoding cDNAs from tibial gland secretion of the Giant Monkey Frog, *Phyllomedusa bicolor* (Hylidae, Anura). *Peptides (NY)*. 2012;38. doi:10.1016/j.peptides.2012.09.010
76. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1999. doi:10.1016/S0005-2736(99)00201-1
77. Shi D, Hou X, Wang L, Gao Y, Wu D, Xi X, et al. Two novel dermaseptin-like antimicrobial peptides with anticancer activities from the skin secretion of *Pachymedusa dactylos*. *Toxins (Basel)*. 2016;8. doi:10.3390/toxins8050144
78. Gao Y, Wu D, Xi X, Wu Y, Ma C, Zhou M, et al. Identification and characterisation of the antimicrobial peptide, phylloseptin-PT, from the skin secretion of *Phyllomedusa tarsius*, and comparison of activity with designed, cationicity-enhanced analogues and diastereomers. *Molecules*. 2016;21. doi:10.3390/molecules21121667
79. Li M, Xi X, Ma C, Chen X, Zhou M, Burrows JF, et al. A novel dermaseptin isolated from the skin secretion of *phyllomedusa tarsius* and its cationicity- enhanced analogue exhibiting effective antimicrobial and anti-proliferative activities. *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9100628
80. Kustanovich I, Shalev DE, Mikhlin M, Gaidukov L, Mor A. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277. doi:10.1074/jbc.M111071200
81. Chen D, Zhou X, Chen X, Huang L, Xi X, Ma C, et al. Evaluating the Bioactivity of a Novel Antimicrobial and Anticancer Peptide, Dermaseptin-PS4(Der-PS4), from the Skin Secretion of *Phyllomedusa sauvagii*. *Molecules*. 2019;24. doi:10.3390/molecules24162974
82. Rates B, Silva LP, Ireno IC, Leite FSF, Borges MH, Bloch C, et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, *Phyllomedusinae*). *Toxicon*. 2011;57. doi:10.1016/j.toxicon.2010.09.010