



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica del
péptido sintético Cruzioseptina 11 (CZS-11): Enfoque *in vitro* e
in sílico.**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: LESLIE JOSSELYN TAIMAL LEMA

TUTORA: PHD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo- Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Leslie Josselyn Taimal Lema, con documento de identidad N° 1728905926, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería 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, 28 de febrero de 2024



Leslie Josselyn Taimal Lema

CI:1728905926

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Leslie Josselyn Taimal Lema, con documento de identidad N° 1728905926, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético Cruzioseptina 11 (CZS-11): Enfoque *in vitro* e *in sílico*” 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, 28 de febrero de 2024



Leslie Josselyn Taimal Lema

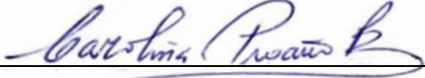
CI:1728905926

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACION

Certifico que el trabajo de titulación: “Evaluación de la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético Cruzioseptina 11 (CZS-11): Enfoque *in vitro* e *in silico*” en la modalidad de: tesis, fue realizado por Leslie Josselyn Taimal Lema, 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, 28 de febrero de 2024



Carolina Del Carmen Proaño Bolaños
CI: 1714818760

DEDICATORIA

*A mis padres Rocío Lema y Pablo Taimal.
Quiénes han sido mis héroes silenciosos
y me han inspirado a mejorar cada día.*

*A mi fiel mascota Charlotte por su
lealtad y apoyo incondicional.
Este logro también es vuestro.*

AGRADECIMIENTOS

En este espacio, deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a aquellas personas que han sido fundamentales en este trabajo de titulación.

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Carolina Proaño PhD. por brindarme el privilegio de ser su tesista, especialmente por su experta guía, paciencia infinita, esfuerzo y dedicación. Su orientación y conocimientos fueron cruciales para la culminación de este trabajo de titulación.

También quiero agradecer a la Universidad Regional Amazónica Ikiam donde he tenido el honor de estudiar y obtener conocimientos.

Además, mi gratitud se extiende a Giovanna Morán, técnica de investigación, por su constante apoyo, paciencia y enseñanza. Especialmente porque me hizo recordar cuanto significa para mí la Biotecnología.

Quiero reconocer el valioso aporte de mis compañeras de laboratorio Rosa y Nayeli por sus comentarios constructivos. Como también, agradezco a mis amigos Elian, Alejandro y Luis, por su apoyo incondicional en los momentos que más los necesitaba.

Finalmente, agradezco a mi familia por su amor incondicional. A mis padres Rocío Lema y Pablo Taimal por su comprensión y aliento constante. Su apoyo fue fundamental para superar los desafíos que se presentaban día a día.

A todos ustedes, mis más sinceros agradecimientos.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL ..	iii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACION.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGAR	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Péptidos antimicrobianos (PAMs).....	2
1.1.2 Mecanismos de acción	3
1.1.3 Péptidos antimicrobianos en anfibios.	4
1.1.4 Péptidos de la familia Cruzioseptina pertenecientes a <i>Cruziohyala calcarifer</i>	4
1.2 Planteamiento del problema a investigar	6
1.3 Justificación de la investigación.....	7
1.4 Objetivos de la investigación	9
1.4.1 General	9
1.4.2 Específicos.....	9
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	10
2.1 Síntesis del péptido sintético CZS-11	10
2.2 Determinación de la masa monoisotópica del péptido sintetizado [M+H ⁺] por MALDI-TOF MS.....	11
2.3 Purificación de CZS-11 por HPLC de fase reversa	11
2.4 Determinación de la masa monoisotópica del péptido purificado por MALDI-TOF MS.....	12
2.5 Verificación de pureza por HPLC.....	12
2.6 Liofilización.....	13
2.7 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y	

	concentración bactericida mínima (MBC)	13
2.8	Ensayo Hemolítico.....	14
2.9	Índice de selectividad	15
2.10	Análisis bioinformático	15
	CAPÍTULO III PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	16
3.1	Determinación de la pureza y masa monoisotópica [M+H ⁺] del péptido sintetizado	16
3.2	Determinación de la pureza y masa monoisotópica [M+H ⁺] del péptido purificado	17
3.3	Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)	19
3.4	Índice de selectividad	21
3.5	Análisis Bioinformáticos.....	21
	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	28
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
	REFERENCIAS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Bioactividad de Cruzioseptinas.	5
Tabla 1-2. Gradiente de elusión para la purificación del péptido mediante HPLC	12
Tabla 1-3. Resultados del índice de selectividad (ÍS)	21
Tabla 2-3. Propiedades físico-químicas del péptido sintético cruziaseptina-11 obtenidas de Peptide property calculator, Peptide Mass Calculator v3.2 y HeliQuest	21
Tabla 3-3. Predicción de la estructura secundaria del péptido CZS-11 mediante Porter 5.0.....	22
Tabla 4-3. Matriz de identidad obtenida a través de los datos de blast/p. (proteína-proteína) de NCBI	24
Tabla 5-3. Comparación de los resultados de CZS-11 con péptidos pertenecientes a la familia cruzioseptina.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Resumen de las actividades biológicas de los péptidos bioactivos derivados de anfibios (16–19). Especie <i>Cruziohyala calcarifer</i> . Ron, S. R. (2019).....	2
Figura 1-3.	Determinación de la pureza y masa monoisotópica [M+H ⁺] del péptido sintetizado CZS-11... ..	17
Figura 2-3.	Determinación de la pureza y masa monoisotópica [M+H ⁺] del péptido CZS-11 purificado.. ..	18
Figura 3-3.	CIM del péptido sintético cruzioseptina -11 (CZS-11) contra <i>E.coli</i> , <i>C.albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>P.aeruginosa</i>	19
Figura 4-3.	Actividad hemolítica del péptido sintético cruzioseptina -11 (CZS-11).....	20
Figura 5-3.	Predicción de la estructura secundaria del péptido CZS-11 mediante Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (CFSSP).....	22
Figura 6-3.	Predicción de rueda helicoidal de CZS-11.....	23
Figura 7-3.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de CZS-11 con péptidos de la familia cruzioseptina de acuerdo con BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos NCBI visualizada con Jalview	24
Figura 8-3.	Modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera.....	25
Figura 9-3.	Representación de la carga de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera.. ..	25
Figura 10-3.	Representación de la hidrofobicidad de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera.....	26
Figura 11-3.	Representación de la polaridad de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera.	26

RESUMEN

Los péptidos bioactivos son considerados los efectores más importantes del sistema inmune innato y la primera línea de defensa contra agentes endógenos y exógenos de los anfibios. Entre ellos se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs) que han demostrado un amplio espectro contra bacterias, virus y parásitos. Por esta razón, son considerados con potencial terapéutico debido al incremento de mortalidad en humanos por patógenos resistentes a fármacos antimicrobianos comunes. Hasta ahora se han reportado 1196 PAMs de anfibios. Entre los péptidos reportados, se encuentra la familia cruzioseptina perteneciente a la especie *Cruziohyla calcarifer*. En esta familia se han identificado 17 tipos diferentes de péptidos que comparten características comunes. En el presente estudio, se reporta por primera vez la caracterización funcional del péptido cruzioseptina-11 (CZS-11). Este péptido fue sintetizado químicamente, purificado mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y su masa monoisotópica fue determinada por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Se realizaron ensayos antimicrobianos y hemolíticos con CZS-11. Adicionalmente, se predijo mediante análisis bioinformáticos las propiedades físico-químicas, estructura secundaria, estructura en 3D y similitud de secuencia. Los resultados muestran que el péptido sintético CZS-11 tiene actividad contra (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*) siendo más potente contra *E. coli* con una concentración inhibitoria mínima de 11,52 μ M sin presentar hemólisis a dicha concentración. Adicionalmente, los análisis bioinformáticos muestran que el péptido CZS-11 tiene una conformación α -hélice anfipática con carga neta +1. Este estudio demuestra el potencial del péptido sintético CZS-11 como un buen candidato para desarrollar medicamentos enfocados en contrarrestar la resistencia bacteriana.

Palabras claves: *Cruziohyla calcarifer*, cruzioseptina, péptido, actividad antimicrobiana, actividad hemolítica, α -hélice.

ABSTRACT

Bioactive peptides are considered the most important effectors of the innate immune system and the first line of defense against endogenous and exogenous agents in amphibians. Among them are antimicrobial peptides (AMPs) that have demonstrated a broad spectrum against bacteria, viruses, and parasites. For this reason, they are considered to have therapeutic potential due to increased mortality in humans from pathogens resistant to common antimicrobial drugs. So far, 1196 amphibian MAPs have been reported. Among the peptides reported is the cruzioseptin family belonging to the species *Cruziohyla calcarifer*. Seventeen different types of peptides sharing common characteristics have been identified in this family. In the present study, we report for the first time the functional characterization of the cruzioseptin-11 (CZS-11) peptide. This peptide was chemically synthesized, purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and its molecular mass was determined by mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Antimicrobial and hemolytic assays were performed with CZS-11. Additionally, physicochemical properties, secondary structure, 3D structure, and sequence similarity were predicted by bioinformatics analysis. The results show that the synthetic peptide CZS-11 has activity against (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*) being more potent against *E. coli* with a minimum inhibitory concentration of 11.52 μ M without presenting hemolysis at that concentration. Additionally, bioinformatic analyses show that the CZS-11 peptide has an amphipathic α -helix conformation with net charge +1. This study demonstrates the potential of the synthetic CZS-11 peptide as a good candidate for drug development focused on counteracting bacterial resistance.

Key words: *Cruziohyla calcarifer*, cruzioseptin, peptide, antimicrobial activity, hemolytic activity, α -helix.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGAR

1.1 Antecedentes

La piel de los anfibios posee funciones físico-químicas esenciales como: la osmorregulación, respiración, termorregulación y protección frente a amenazas de su propio hábitat (1). En el transcurso de la transición de los anfibios del agua a la tierra evolucionaron adoptando estrategias para proteger la piel de agentes endógenos y exógenos (2). Una de las estrategias que adoptaron es la secreción de un cóctel químico a través de la piel que principalmente se produce por glándulas: mucosas y granulares (3). Las glándulas mucosas están distribuidas alrededor del tegumento teniendo como función mantener la piel húmeda y prevenir el daño mecánico. Mientras que, las glándulas granulares se hallan distribuidas en grupos en la piel, las cuales se encargan de la síntesis y almacenamiento de varias moléculas de defensa (3–5). Algunas de las moléculas actúan como antimicrobianos, irritantes, alucinógenos, convulsivos, vasoconstrictores e incluso pueden conferir un sabor u olor desagradable (6,7). Entre las moléculas de defensa se incluyen: alcaloides, aminas biogénicas, proteínas, mucinas, ácidos nucleicos y péptidos bioactivos (8,9).

Los péptidos bioactivos están formados por aminoácidos unidos mediante enlaces covalentes también conocidos como enlaces peptídicos (10). Estos péptidos son considerados como fragmentos proteicos específicos que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones corporales (11). Los cuales tiene varias aplicaciones a nivel farmacéutico como potenciales fármacos, debido a que cumplen funciones terapéuticas en los sistemas corporales. En el sistema inmunológico, los péptidos desempeñan un papel crucial al proporcionar una defensa efectiva contra una amplia variedad de agentes infecciosos y exhiben actividad inmunomoduladora (12). También, existen neuropéptidos que desempeñan un papel crucial en el sistema nervioso, especialmente en la modulación de la actividad sináptica. Más aún, estos compuestos pueden actuar como neurotransmisores primarios (13). Adicionalmente, hay péptidos que actúan en el sistema cardiovascular que se relacionan con la actividad antihipertensiva y antitrombótica (14). Asimismo, existen aquellos que intervienen en el sistema gastrointestinal como posibles relajantes de la mucosa gástrica (15).

Es importante destacar que las respuestas fisiológicas se determinan por el número, tipo, secuencia y propiedades de los aminoácidos presentes en el péptido (11). Las actividades biológicas son las expuestas en la (Figura 1-1).

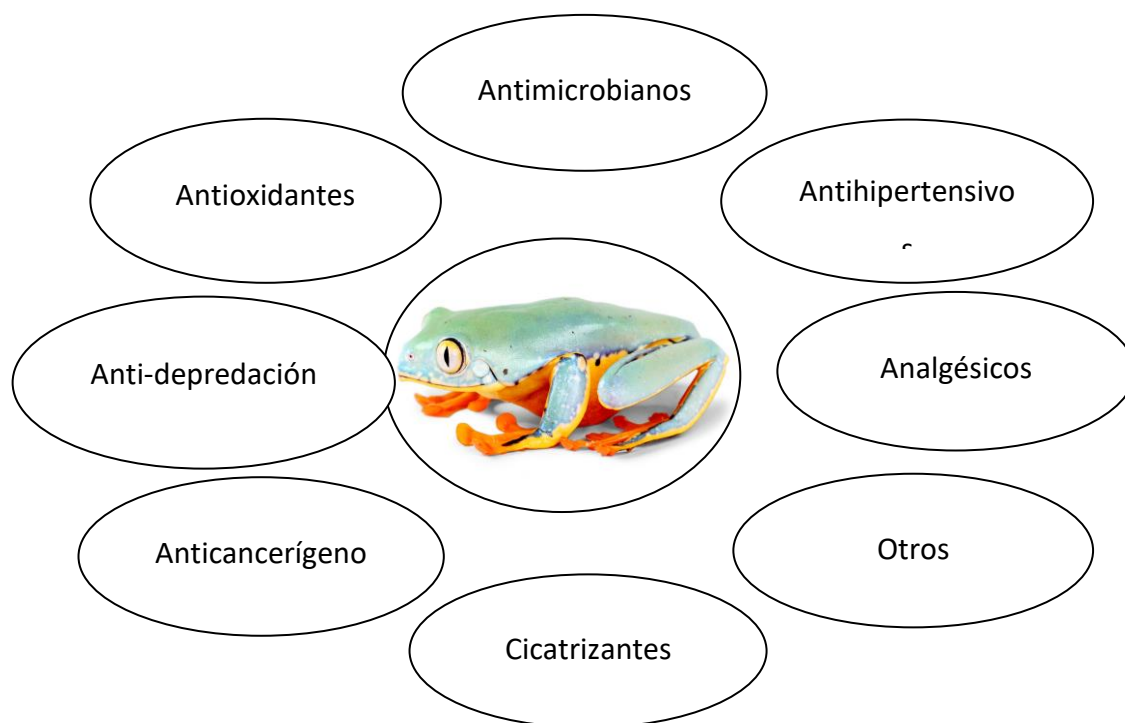


Figura 1-1. Resumen de las actividades biológicas de los péptidos bioactivos derivados de anfibios (16–19). Especie *Cruziohyala calcarifer*. Ron, S. R. (2019).
Realizado por: Taimal, 2024.

1.1.1 Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs se caracterizan por ser péptidos de cadenas relativamente cortas compuestas por 10-50 residuos de aminoácidos (20). En su mayoría, poseen carga neta positiva (que oscilan entre +2 a +13), son anfipáticos a pH fisiológico y tienen alto momento hidrofóbico (21). Los PAMs se clasifican según su estructura secundaria en (1) α -hélice, (2) hoja β estabilizados por puentes disulfuros, (3) estructuras extendidas mediante enlaces de hidrógeno e interacciones de Van Der Waals con lípidos de membrana y (4) en forma de lazo debido a la presencia de puentes disulfuro (22,23).

Según la Base de datos de péptidos antimicrobianos (APD, por sus siglas en inglés), (actualizado en enero 2023), se han identificado 3569 PAMs, de los cuáles el 72.84 % se derivan de animales, 10.39% de plantas, 0.7% pertenecen a hongos, 0.22 % a

protista y únicamente el 0.14% a arquea. Es importante destacar que existen 1196 péptidos activos de anfibios (24).

Los PAMs son candidatos a potentes medicamentos debido a su amplio espectro contra microorganismos como bacterias, hongos, parásitos y virus (25). Además, funcionan en el organismo por medio de varios mecanismos reduciendo la probabilidad de resistencia microbiana (26).

1.1.2 Mecanismos de acción

Los PAMs presentan diferentes mecanismos de acción que principalmente se centran en la actividad membranolítica. Sin embargo, también se han identificado algunos péptidos que se dirigen a la pared celular y otros que tienen blancos intracelulares. Por esta razón, los mecanismos de acción se han clasificado en 3 categorías: i) Aquellos dirigidos a la membrana, (ii) dirigidos a la pared celular, y a (iii) blancos intracelulares (27).

(i) Los PAMs al ser mayoritariamente catiónicos interactúan con las membranas bacterianas con carga negativa por medio de atracción electrostática (28). Los péptidos catiónicos causan alteraciones en la membrana debido a que interactúan con las bicapas lipídicas y pueden formar poros transmembrana hidrofílicos haciendo que las células sean permeables, produciendo la lisis o alteración de gradientes iónicos (29). Algunos péptidos también pueden actuar sin formar poro, de tal manera que cubren la membrana provocando la pérdida de su integridad por medio de la producción de micelas (30).

(ii) En cambio, los PAMs dirigidos a la pared celular tiene como blancos a los precursores altamente conservados (lípidos II), un ejemplo es el precursor del peptidoglicano (31).

(iii) Finalmente, existen PAMs que tienen blancos intracelulares. Los péptidos pueden penetrar las células bacterianas por medio de la unión a la superficie bacteriana seguido de su translocación al interior de la célula por medio de poros transitorios (32). Otra forma de translocación a través de la membrana es por procesos mediados por receptores sin la formación de poros (33). Una vez que los PAMs ya ingresaron a la célula pueden interferir en bioprocesos como: replicación, transcripción y traducción de

ácido nucleicos (34,35). Asimismo, en la síntesis de proteínas porque pueden inactivar las chaperonas bacterianas implicadas en el plegamiento de las proteínas (36).

1.1.3 Péptidos antimicrobianos en anfibios.

De la piel de los anfibios se han aislado una colección de varios PAMs que se pueden explorar desde un punto vista biotecnológico desde hace 40 años (37,38). Hasta el 2023 según la base de datos de péptidos antimicrobianos (APD, <https://aps.unmc.edu/>, consultada el 22 de noviembre de 2023) se han identificado 3569 PAMs de los cuales 1196 pertenecen a anfibios.

Cada anfibio produce su propio conjunto de péptidos que interactúan en sinergia (39). Los PAMs de la piel de anuros se agrupan en familias según similitudes de la secuencia de aminoácidos (40,41). Por ejemplo, en los géneros *Phyllomedusa*, *Agalychnis*, *Hylomantis* y *Pachymedusa* se han identificado a las familias dermaseptinas, filoseptinas, plasticinas, picturinas, philloxinas y cruzioseptinas. Los PAMs son muy diversos y es poco frecuente que se encuentre un mismo péptido en dos especies, a pesar de que estén estrechamente relacionadas (42,43).

1.1.4 Péptidos de la familia Cruzioseptina pertenecientes a *Cruziohyla calcarifer*

En estudios preliminares se caracterizó el peptidoma de la secreción cutánea de la especie *Cruziohyla calcarifer*. La familia más representativa es cruzioseptina, este nombre es otorgado por su origen en *Cruziohyla*. Hasta la actualidad, se han reportado 17 tipos diferentes de cruzioseptinas (43,44). Estos tienen las siguientes características: son catiónicos, anfipáticos, tienen una longitud de 20-32 residuos de aminoácidos, poseen un motivo de secuencia N-terminal, GFLD- y las secuencias -VALGAVSK- o -GKAAL(N/G/S) (V/A)V- en la mitad del péptido. Esta familia de péptidos parece ser multifuncionales teniendo un amplio espectro de actividad. Las cruzioseptinas han presentado efecto antibacteriano, antifúngicos y antileishmania (43-45).

Tabla 1-1. Bioactividad de Cruzioseptinas.

Péptido	Secuencia	Actividad antimicrobiana	Referencias
CZS-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF-NH2	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Leishmania spp.</i>	(44–46)
CZS-2	GFLDVIKHVGKAALGVVTHLINQ-NH2		
CZS-3	GFLDVVKHIGKAALGAVTHLING-NH2		
CZS-4	GFLDVIKHVGKAALSVVSHLINE-NH2		
CZS-16	GFLDVLKGVGKAALGAVTHLINQ-NH2	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> .	(43)
CZS-17	GFLDVVKGVGKAALGAVTHLINQ-NH2		

Realizado por: Taimal, 2024

En investigaciones previas se demostró que CZS-1 es uno de los péptidos más potentes de la familia, sin embargo; presenta una toxicidad moderada debido a que mostró una lisis del 20 % de glóbulos rojos en la concentración de 32 (mg/L) contra *Escherichia coli* (44).

1.2 Planteamiento del problema a investigar

En la década de 1950 aparecieron una gama importante de antimicrobianos, disminuyendo la tasa de mortalidad a causa de enfermedades infecciosas (47,48). Sin embargo, desde los primeros años del uso de antimicrobianos empezaron a aparecer microorganismos resistentes a los mismos. En algunos casos, la resistencia antimicrobiana (RA) es una característica inherente al microorganismo y en otros es una capacidad adquirida (49). Sin embargo, el uso irracional de antimicrobianos ha incrementado el apareamiento de los microorganismos resistentes a estos fármacos. Dando lugar a que los microorganismos logren neutralizar o resistir el efecto de los medicamentos antibacterianos, antiparasitarios, antivirales y fungicidas (50).

La RA ha reducido las posibilidades de tratamientos eficaces de enfermedades infecciosas aumentando el riesgo de mortalidad, morbilidad, hospitalización prolongada y elevados costos económicos (51). Según la Organización Mundial de la Salud, las infecciones provocadas por la RA representan alrededor de 700 mil muertes por año y se estima que podrían ocasionar alrededor de 10 millones de muertes para el 2050 (52). Esto constituye un grave problema de salud y económico que afecta al funcionamiento de los sistemas de salud. Por esta razón, la Organización Mundial de la salud (OMS), Organización mundial de la sanidad animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han considerado a las infecciones causadas por la RA como emergencia mundial y se requiere la implementación de un plan de acción global para contrarrestar la RA de forma urgente (53).

En el caso de Ecuador, se ha evidenciado el incremento de microorganismos resistentes a antibióticos. En el reporte del Ministerio de Salud Pública, de aislados hospitalarios con vigilancia a la RA desde 2014-2018 se evidenció que *E. coli* presentó el 50% de resistencia a cefalosporinas. En cambio, *K. pneumoniae* mostró un 20-35 % de resistencia a carbapenémicos como imipenen y meropenen. Mientras que *P. aeruginosa* se identificó que tiene un 30% de resistencia a carbapenémicos como imipenen y meropenen. A diferencia de *S. aureus* que presentó el 87% de resistencia a penicilina y un 60% a cefazolina (50). En cambio, según un estudio en el Hospital del día IESS de 132 casos *C albicans* presentó un 23% de resistencia a fluconazol (54).

Los datos publicados en el 2015 en el Ecuador del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) evidenciaron que aislados de *S. aureus* de origen comunitario mostraron resistencia a cefoxitina con un 49,40 %. En cambio, *E. coli* mostró 83,10 % de resistencia contra ampicilina, *P. aeruginosa* con un 33,20 % a ciprofloxacina y *K. pneumoniae* presentó un 85,1% de resistencia a cefoxitina en muestras de sangre (55).

La emergencia causada por el aumento de número de casos de resistencia antimicrobiana ha orillado a la industria farmacéutica a buscar nuevas estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos pero las iniciativas son cada vez más escasas (56). Por lo que, en los últimos años, investigadores se enfrentan a una carrera contra el tiempo, enfocándose en la búsqueda de nuevas moléculas y estructuras químicas como potenciales tratamientos de infecciones causadas por microorganismos resistentes (MR) (57). De manera que se considera como alternativas importantes a los antimicrobianos de uso común a la utilización de péptidos con potentes actividades antimicrobianas y diversos mecanismos de acción (58).

1.3 Justificación de la investigación

Los PAMs tienen un gran potencial, por su amplio espectro de actividad contra hongos, bacterias, parásitos y virus. Estos péptidos tienen características como buena estabilidad térmica, solubilidad en agua, bajo peso molecular, relación estructura-actividad sencilla y sensibilidad baja (59).

Existen varias ventajas de los PAMs frente a fármacos comunes, para tratar infecciones provocadas por microorganismos. Entre las ventajas, se encuentra la capacidad de algunos péptidos para modular respuestas inmunes. Es decir, pueden proteger al huésped a través de la actividad química, atrayendo leucocitos, estimulando la angiogénesis, modulando la expresión de citocinas proinflamatoria, mejorando la activación y diferenciación de monocitos. Debido a esto, los PAMs pueden matar a patógenos, iniciar el reclutamiento/ activación de inmunocitos y a la vez neutralizar una respuesta inflamatoria excesiva en el lugar de la infección (59).

Otra de las ventajas es que al ser los PAMs moléculas pequeñas biológicamente activas compuestas por menos de 100 residuos de aminoácidos, pueden sintetizarse fácilmente y a un bajo costo. Además, que el uso de estos péptidos como medicamentos tienen como beneficio su hidrólisis por peptidasas presentes en el organismo. Esto evita que

haya acumulación en órganos específicos, minimizando efectos secundarios (60). Además, los PAMs son relativamente selectivos. Esto implica que tienen actividad contra bacterias a una concentración que usualmente ocasiona una baja toxicidad para las células huésped. Esto se da debido a que las membranas bacterianas tienen en la superficie fosfolípidos cargados negativamente, mientras que las membranas de células eucariotas los lípidos aniónicos se encuentran segregados en la cara citoplasmática de la bicapa lipídica. Debido a esto, los PAMs interactúan con membranas aniónicas y no con neutras por su naturaleza catiónica (61).

Adicionalmente, los PAMs evitan que se genere la resistencia antimicrobiana provocada por antibióticos comunes debido a que interactúan con las membranas bacterianas por la neutralización de la carga, ya que pueden ingresar al interior y producir la muerte bacteriana. Los PAMs funcionan a una baja concentración incluyendo contra cepas resistentes a antibióticos tradicionales (59).

Hasta el 2018, alrededor de 60 medicamentos basados en péptidos han sido aprobados y están siendo comercializados en Estados Unidos, Japón, Europa y países asiáticos. Más de 150 se encuentran en desarrollo clínico activo y otros 260 se han probado para ensayos clínicos en humanos (62).

El descubrimiento de nuevos péptidos como cruzioseptinas es un elemento clave para el desarrollo de fármacos nuevos que se basan en moléculas naturales (44). Las cruzioseptinas son una familia de péptidos que se identificó como *Cruziohyla calcarifer*. Esta familia está conformada por 17 péptidos. Según estudios se ha demostrado que tienen un amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, existen pocas investigaciones que se dedican a identificar la actividad de cruzioseptinas contra microorganismos patógenos generando una necesidad de estudiarlas por sus propiedades físico-químicas (63).

Los péptidos cruzioseptinas se caracterizan por ser catiónicos, anfipáticos, que tienen una longitud de 20-32 residuos de aminoácidos con un amplio espectro antimicrobiano. Un estudio da a conocer que tres de las versiones semi-sintéticas cruzioseptina-1 (CZS-1), 4 (CZS-4) y 16 (CZS-16) tuvieron una potente actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (44).

En este estudio nos enfocaremos en el péptido sintético Cruzioseptina 11 que es derivado de la secreción cutánea de *Cruziophyla calcarifer* con el fin de estudiar la actividad antimicrobiana y tóxica.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 General

- Evaluar la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido sintético cruzioseptina 11 (CZS-11) proveniente de la secreción de la piel de *Cruziophyla calcarifer*.

1.4.2 Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del péptido sintético cruzioseptina 11 (CZS-11) contra las cepas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* y las cepas aisladas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.
- Caracterizar la toxicidad del péptido sintético por medio de un ensayo hemolítico.
- Predecir las propiedades físico-químicas, estructura y mecanismo de acción mediante bioinformática

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Síntesis del péptido sintético CZS-11

El péptido CZS-11 (GFLDIVKHHVGKAAGKAALNAVTEMVNQ-amida) fue sintetizado por medio de síntesis en fase sólida con el grupo protector Fmoc. Se utilizó un sintetizador automático de péptidos (Liberty Blue, CEM). Para ello se tomaron 0.526 mg de resina Fmoc Rink Amide LL (ProTide), N, N -dimetilformamida (DMF) como solvente principal y piperidina al 20% como solvente de desprotección con el fin de obtener 0.1 mmol del péptido. Después, en el acoplamiento se usaron 1.0 M de N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1.0 M de Oxima como activadores y una concentración de 0.2 M de cada aminoácido.

Finalizada la síntesis se realizó el clivaje del péptido sintético para separar la resina de la cadena peptídica. Este proceso consistió en recuperar la resina y un lavado con diclorometano. A continuación, se eliminó el diclorometano por medio de accent cleavage system, después se recuperó la resina y se colocaron 5 mL de una solución compuesta por: ácido trifluoroacético (TFA) (92.5 %), 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (DODT) (2.5 %), triisopropilsilano (TIPS) (2.5 %), y agua (2.5 %). Luego, la resina más la solución del clivaje se colocaron en el módulo de microondas por 30 min. Seguidamente, se eliminó la solución de clivaje por filtrado y se recuperó el péptido.

Una vez finalizado el clivaje, se colocaron 20 mL de dietil éter frío y se precipitó el péptido durante 24 h a 4 °C. A continuación, se realizó el lavado, para esto se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se añadieron 15 mL de dietil éter frío y se homogeneizó. El lavado se realizó por triplicado.

Concluido el proceso de lavado, el péptido se dejó secar durante la noche. Posteriormente se diluyó en ácido acético al 10% y una vez diluido se colocó agua tipo I. Después el péptido fue liofilizado y se conservó a -20°C.

2.2 Determinación de la masa monoisotópica del péptido sintetizado [M+H⁺] por MALDI-TOF MS

La masa monoisotópica [M+H⁺] del péptido se verificó por espectrometría de masas MALDI-TOF. El péptido sintético fue diluido empleando 1 mg de péptido más 500 µl del solvente A (Agua tipo I y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA)). Luego, se colocó 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) 10 mg/mL en una placa de 48 pocillos y se dejó secar. Seguidamente, se adicionó 1 µl de péptido diluido y se dejó secar nuevamente. La placa se colocó en el espectrómetro de masas MALDI-TOF y se analizó en un rango de 2200 a 3000 Da. en modo reflectrón, con la siguiente configuración: profile = 200, power = 40, y shots = 2.

2.3 Purificación de CZS-11 por HPLC de fase reversa

Se disolvieron 10 mg de péptido sintetizado en 1 mL de solvente A (descrito en la sección 2.2). Luego, se realizó un vórtex y espín para homogeneizar. Después, la muestra se filtró a través de una membrana con un poro de 0.45 µm y un diámetro de 15mm.

La técnica que se utilizó para la purificación fue cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa empleando un equipo Waters HPLC equipado con Detector UV/Visible 2489, Bomba Binaria 1525. El software EmpowerTM 3 fue utilizado para realizar el análisis de los datos.

Se inyectaron 100 µl del péptido en el HPLC empleando la columna XBridge[®] Peptide BEH C18 OBDTM Prep ColumnN, 300Å, (10mm x 250 mm), y un tamaño de partícula de 5 µm. Se emplearon como fases móviles el solvente A (Agua tipo I y 0.1% TFA) y solvente B (99.9 mL de acetonitrilo más 0.1 % de TFA). El gradiente que se utilizó se describe en la (Tabla 1-2).

Tabla 1-2. Gradiente de elusión para la purificación del péptido mediante HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
	1.00	90.0	10.0
1.00	1.00	90.0	10.0
40.00	1.00	30.0	70.0
45.00	1.00	20.0	80.0
50.00	1.00	0.0	100.0

Realizado por: Taimal, 2024.

El tiempo de corrida fue de 50 minutos, con un flujo de 1mL/min. La detección se realizó a una absorbancia de 214 nm. Se recolectó manualmente fracciones del pico perteneciente al péptido en tubos de vidrio de 5mL.

2.4 Determinación de la masa monoisotópica del péptido purificado por MALDI-TOF MS

Para la identificación de la masa monoisotópica $[M+H^+]$ de cada fracción obtenida en la sección previa, se aplicó el procedimiento detallado de la sección 2.2. Se unieron las fracciones en un tubo de 50 mL que se visualizaba la masa monoisotópica $[M+H^+]$ del péptido, como también sus aductos con sodio (Na) y potasio (K).

Para el análisis de los resultados se realizó las siguientes configuraciones en Peak prossesing: Scenario: Advanced Peak width: 5, Smoothing method: Off, Smoothing filter width: 20, Peak detection method: Threshold - 25% Centroid y Threshold offset: 0.2 mV.

2.5 Verificación de pureza por HPLC

La pureza del conjunto de fracciones unidas se analizó mediante HPLC con la columna analítica Jupiter C18 300^Å LC Columna 250 x 4.6 que tiene un tamaño de partícula de 5 μ m. El volumen de inyección fue de 80 μ L de la muestra purificada, con un flujo de 1mL/min y el gradiente fue de 10-100 % del solvente B (99.9 mL de acetonitrilo más 0.1 % de TFA) en 60 min. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 nm.

2.6 Liofilización

El tubo que contenía el péptido purificado se congeló en un ultracongelador a -80°C por 12 horas. Posteriormente, la muestra se colocó en el liofilizador (BenchTop Pro Omnitronics de 9 litros). El equipo se configuró para la cámara de refrigeración -80°C y 0.09 mbar por 5 días. Después, el péptido sintético se conservó a -20°C.

2.7 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (MBC)

Se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213, *Candida albicans* 10231 y los aislados clínicos resistentes a ampicilina de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los microorganismos se reactivaron colocando 50 µL de cultivo stock en 20 mL de caldo Mueller Hinton (MHB) y se incubaron con agitación por 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se transfirieron 500 µL de cada cultivo previamente obtenido a 20 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB) y se incubaron nuevamente en agitación a 37°C durante 1 h 30 (*E. coli*), 2 h (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) y 6 h (*C. albicans*). Para alcanzar una concentración de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL). Una vez que los microorganismos ingresaron en la fase exponencial de crecimiento, se diluyeron 200 µL de cada subcultivo en 19,8 mL de MHB, obteniendo así una concentración final de 1×10^6 UFC/mL.

Para comprobar que el conteo de UFC/mL sea 1×10^6 , se colocaron 900 µL de Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) 1X en 4 tubos de 1,5 mL, luego se realizó diluciones seriadas (1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4}) partiendo de añadir 100 µL del subcultivo de cada microorganismo en uno de los tubos con PBS 1X. A continuación, se sembraron 20 µL de las diluciones 1×10^{-3} y 1×10^{-4} en una caja Petri con agar Mueller-Hinton Agar (MHA) por triplicado. Se dejó secar y se incubó durante 24h a 37°C. Al siguiente día se contaron las colonias y se aplicó la siguiente formula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{\#colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de inoculación}}$$

Para evaluar la CIM se realizaron diluciones seriadas del péptido en dimetil sulfóxido (DMSO) hasta obtener las siguientes concentraciones: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4,

2, 1×10^2 mg/L. Seguidamente en una placa estéril de 96 pocillos se colocaron 2 μ L de cada dilución del péptido en conjunto con 198 μ L de cada suspensión bacteriana. Como control negativo se utilizaron 2 μ L de DMSO con 19,8 μ L de microorganismo, en cambio para el blanco se colocaron 200 μ L de MHB. Se realizaron 5 réplicas por cada concentración del péptido diluido y el ensayo se hizo por duplicado. Luego, se incubó cada placa de 96 pocillos durante 16 horas a 37°C. Después, se leyó la absorbancia de cada placa a una longitud de onda de 560 nm en un lector de microplacas ELISA GloMax® Discover (Promega).

Para evaluar la concentración bactericida mínima (CBM) se transfirió una gota de 10 μ L de cada pocillo que no presentó crecimiento del microorganismo en el ensayo de CIM a placas con agar Mueller Hinton (MHA), se dejó secar y se incubó a 37°C durante 16 h. Al día siguiente se registró en que concentración se inhibió el crecimiento microbiano.

2.8 Ensayo Hemolítico

Se emplearon eritrocitos humanos para determinar la actividad hemolítica de CZS-11. Para el ensayo se colocaron aproximadamente 3-4 mL de sangre total en un tubo de 50 mL y se extrajo el suero por medio de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS. Para ello, se colocaron 10 mL de PBS 1X suavemente en el tubo con glóbulos rojos y se centrifugó a 1000 rpm por 5 min. Después se realizó una solución de glóbulos rojos al 4% en PBS 1x.

Por otro lado, se realizaron diluciones seriadas en DMSO del péptido con las siguientes concentraciones: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1×10^2 mg/L. En tubos de 1.5 se colocaron 200 μ L de suspensión de glóbulos rojos al 4 % más 200 μ L de las diluciones del péptido. Se tomó como control negativo 200 μ L de PBS 1X estéril + 200 μ L de suspensión al 4% de eritrocitos. Como control positivo se colocaron 200 μ L de suspensión de eritrocitos al 4% en conjunto con 195 μ L de PBS 1X estéril y 5 μ L Tritón X-100. A continuación, se incubaron los tubos por 2 h a 37°C. Después, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Se realizaron 3 réplicas para cada concentración.

Consecuentemente se transfirieron 200 μ L de sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se analizó la placa en un lector de microplacas (GloMax® Discover, Promega) a una longitud de onda de 560 nm. El porcentaje de la hemólisis se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{(A-A_0)}{(A_x-A_0)} \times 100$$

Donde:

A = Concentración del péptido

A₀ = Control negativo

A_x = Control positivo

2.9 Índice de selectividad

El índice de selectividad es la relación entre la toxicidad (hemólisis) y el efecto biológico (CIM). Este parámetro es obligatorio durante la investigación preclínica.

Para realizar el cálculo del índice de selectividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$ÍS = \frac{HC_{10}}{CIM_{90}}$$

Donde:

HC₁₀ = Concentración del péptido que causa el 10% de hemólisis.

CIM = Concentración mínima del péptido que causa una inhibición del 90% de cada microorganismo que tuvo actividad el péptido (64).

2.10 Análisis bioinformático

La secuencia del péptido cruzioseptina CZS-11 fue comparada con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante las herramientas Blast/p. La visualización de los datos se llevó a cabo por Jalview. Por medio de programas bioinformáticos, también se llevó a cabo el análisis de la secuencia de nucleótidos y la predicción de la estructura secundaria utilizando Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (CFSSP) y Porter 5.0. Además, se calcularon las propiedades físico-químicas a través de Peptide propertie calculator v.3.1, Peptide mass calculator v3.2 y Heliquist. El Modelo tridimensional de CZS-11 se obtuvo por medio de I-Tasser y se visualizó con UCSF Chymera.

CAPÍTULO III PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Determinación de la pureza y masa monoisotópica $[M+H^+]$ del péptido sintetizado

En la síntesis en fase sólida con el grupo protector Fmoc se obtuvieron 146,6 mg del péptido sintético CZS-11 con una pureza del 28,91%, la cual fue determinada a través de HPLC en fase reversa. La masa monoisotópica del péptido es de $[M+H^+] = 2780,154$ Da., determinada por el espectrómetro de masas MALDI-TOF con un error de 130,191 ppm con respecto a la masa teórica monoisotópica de 2779,516 Da. a la cual se le añade un $H^+ = 2780,516$ Da., el protón se otorga por la matriz CHCA (Figura 1-3).

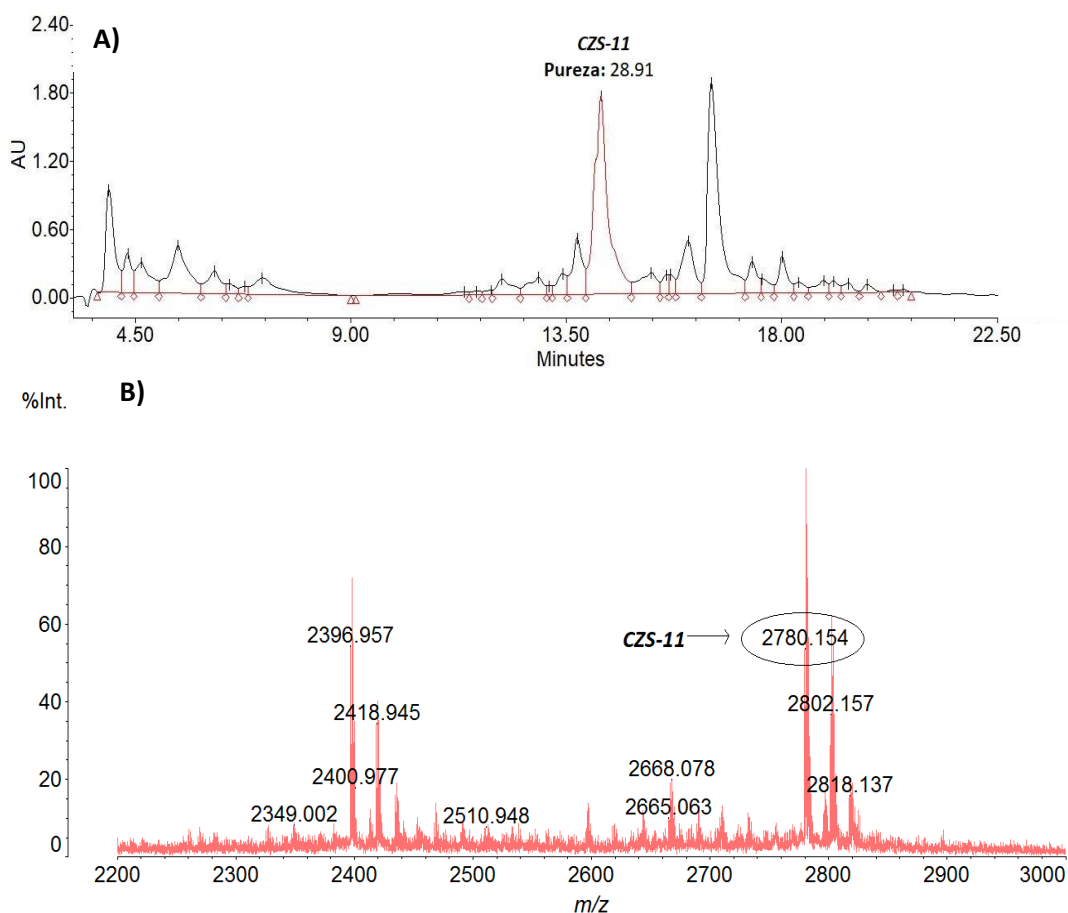


Figura 1-3. Determinación de la pureza y masa monoisotópica $[M+H^+]$ del péptido CZS-11 sintetizado CZS-11. **A)** Pureza del péptido sintético CZS-11 evaluado mediante HPLC fase reversa. El eje X representa el tiempo de retención del péptido en minutos y en el eje Y se encuentra la absorbancia relativa (AU) a una longitud de onda de 214 nm. **B)** Análisis de masas del producto sintético CZS-11 obtenido mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF. La masa monoisotópica $[M+H^+]$ de 2780,154 Da. representa la masa del péptido.

Realizado por: Taimal, 2024.

3.2 Determinación de la pureza y masa monoisotópica $[M+H^+]$ del péptido purificado

Mediante la purificación del péptido a través de la técnica HPLC fase reversa se obtuvieron 14.33 mg con una pureza de 87,19 % evaluada por HPLC y una masa monoisotópica de $[M+H^+] = 2780,425$ Da. determinada por espectrómetro de masas MALDI-TOF, presentando un error de 32,727 ppm en relación con la masa monoisotópica que es de 2779,516 Da. a la cual se le añade $H^+ = 2780,516$ Da., el protón se otorga por la matriz CHCA. La formación de aductos presentó un error de 744,425 ppm para sodio (Na) con relación a la masa monoisotópica de 2803,505 Da. y 86,536 ppm para potasio (K) con relación a la masa monoisotópica de 2819,614 Da.

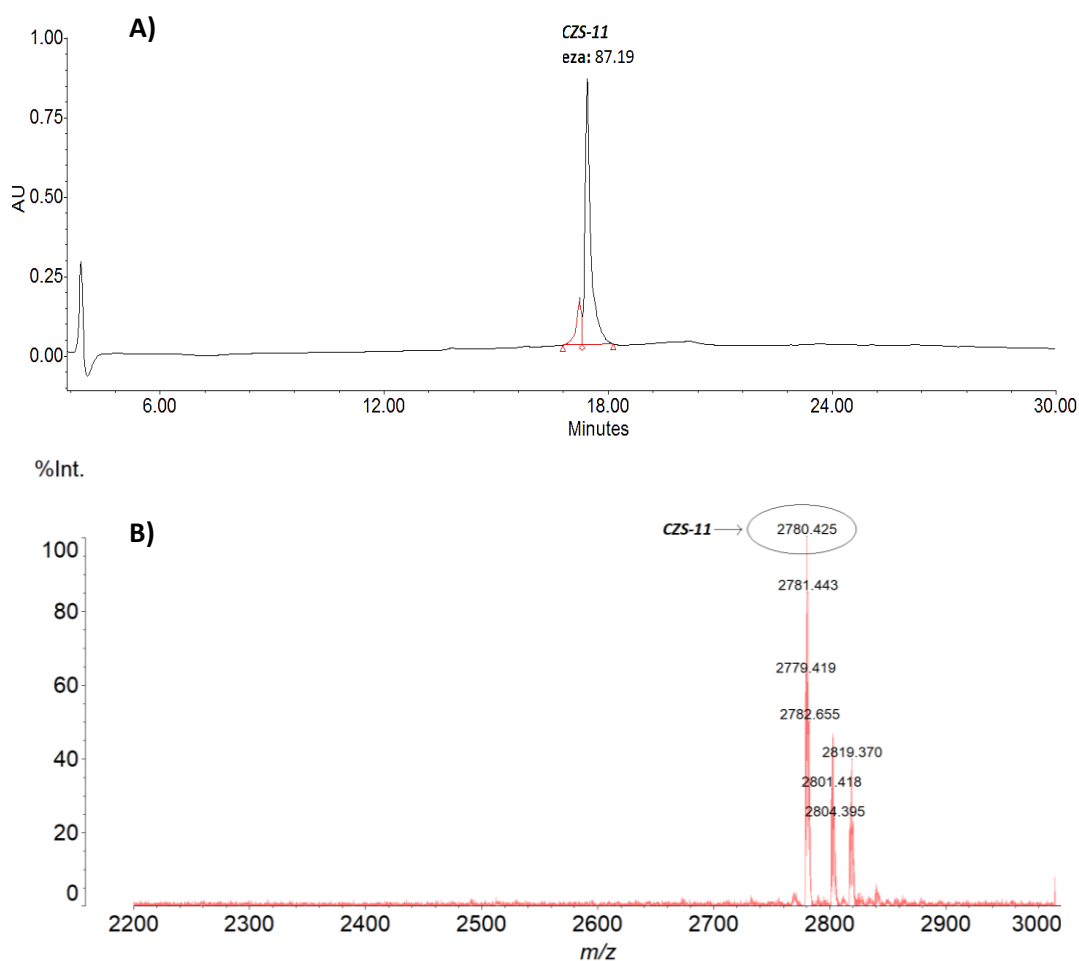


Figura 2-2. Determinación de la pureza y masa monoisotópica $[M+H]^+$ del péptido CZS-11 purificado. **A)** Pureza del péptido CSZ-11 purificado mediante cromatografía de alta eficiencia HPLC. El eje X corresponde al tiempo de retención en minutos. En cambio, el eje Y representa la absorbancia relativa (AU) a una longitud de onda de 214 nm. **B)** Análisis de masas del péptido sintético purificado CZS-11 obtenido mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF. La $[M+H]^+$ monoisotópica de 2780,425 Da. corresponde al péptido CZS-11. La $[M+H]^+$ monoisotópica de 2801,418 Da. representa a la formación del aducto con Na. La $[M+H]^+$ monoisotópica 2819,370 Da. representa a la formación del aducto con K.

Realizado por: Taimal, 2024.

3.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)

El péptido sintético cruzioseptina 11 (CZS-11) con 87,19% de pureza presentó actividad antimicrobiana contra *E. coli* a una CIM de 11,52 (32) μ M (mg/L). También tuvo actividad contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* siendo la CIM 46,07 (128) μ M (mg/L). En cuanto a *C. albicans* y *P. aeruginosa* el péptido no presentó ningún tipo de actividad inhibitoria (Figura 3-3).

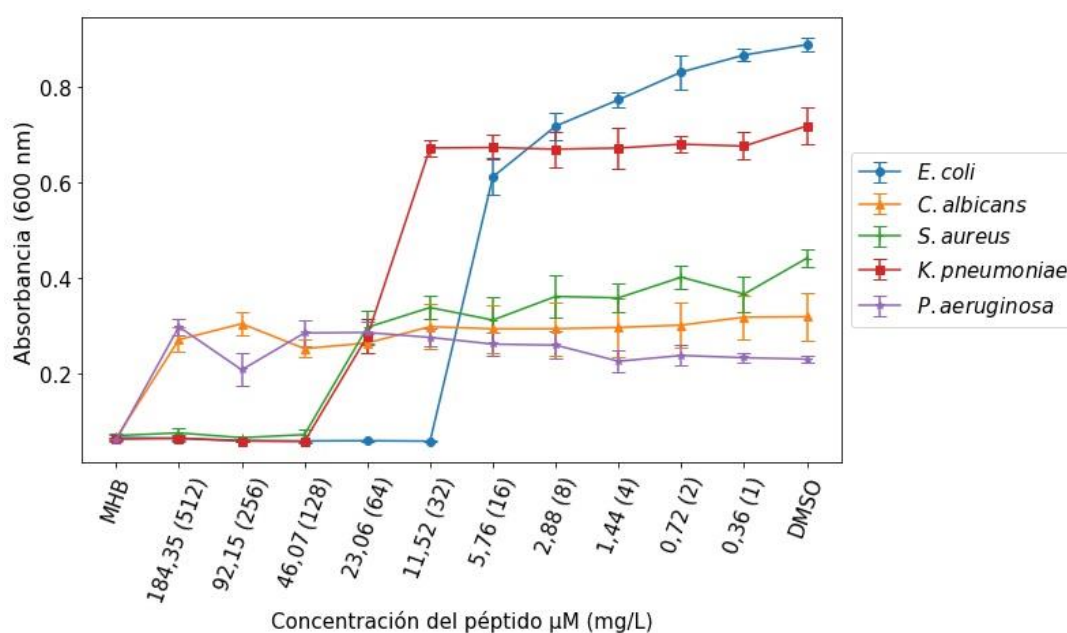


Figura 3-3. CIM del péptido sintético cruzioseptina -11 (CZS-11) contra *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. MHB corresponde al blanco y DMSO al control negativo C(-).

Realizado por: Taimal, 2024.

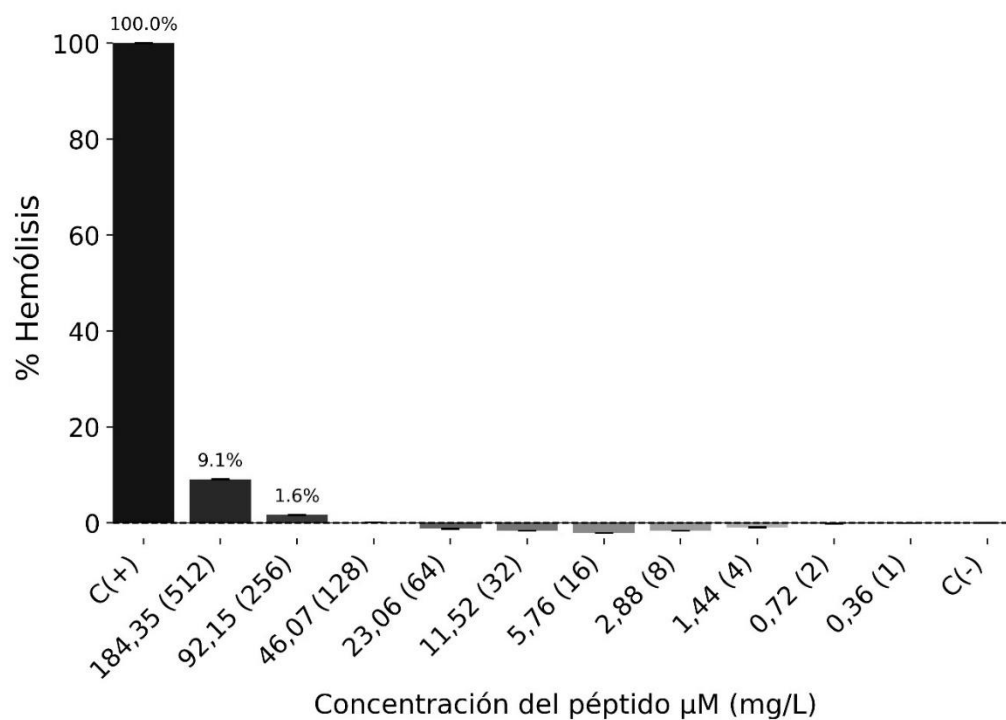


Figura 4-3. Actividad hemolítica del péptido sintético cruzioseptina -11 (CZS-11). Control positivo C (+) suspensión de eritrocitos + PBS + 5 μL Tritón X-100 y control negativo C (-) suspensión de eritrocitos + PBS 1X.

Realizado por: Taimal, 2024.

3.4 Índice de selectividad

El índice de selectividad más alto es el de 19,59, perteneciente a *E. coli*. Mientras que, el ÍS es de 4,89 para *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

Tabla 1-3. Resultados del índice de selectividad (ÍS)

	HC ₁₀ (mg/L)	CIM (mg/L)	IS
<i>S. aureus</i>	564,45	115,2	4,89
<i>E. coli</i>	564,45	28,2	19,59
<i>K. pneumoniae</i>	564,45	115,2	4,89

Realizado por: Taimal, 2024.

3.5 Análisis Bioinformáticos

Las propiedades físico-químicas de CZS-11 se predijeron a través de Peptide Property Calculator v.3.1, Peptide Mass Calculator v3.2 y HeliQuest. Los valores de hidrofobicidad obtenidos mediante HeliQuest fueron de 0.34 con un momento hidrofóbico de 0.31 y una carga neta z de 1 (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Propiedades físico-químicas del péptido sintético cruzioseptina-11 obtenidas de Peptide property calculator, Peptide Mass Calculator v3.2 y HeliQuest

Propiedades físico-químicas del péptido sintético CZS-11	
Número de residuos:	27
Masa monoisotópica :	2779,516 g/mol
% aminoácidos ácidos:	7,41
% aminoácidos básicos:	14,81
% aminoácidos neutros:	25,93
% aminoácidos hidrofóbicos:	51,85
Carga neta z:	1
% hélice alfa:	96.30%
Hidrofobicidad:	0,34222
Momento hidrofóbico:	0,31

Realizado por: Taimal, 2024.

En cambio, la estructura secundaria se predijo mediante el software Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (CFSSP) (Figura 5-3), Porter 5.0 (Tabla 3-3) y a través de SOPMA. Por medio de SOPMA se obtuvo que el 96,30 % de los residuos de aminoácidos del péptido conforman una α -hélice. En cuanto, a la predicción de la rueda helicoidal se realizó mediante HeliQuest donde se observa características anfipáticas (Figura 6-3).



Figura 5-3. Predicción de la estructura secundaria del péptido CZS-11 mediante Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (CFSSP). Residuos con coloración roja presentan la conformación α -hélice. Aminoácidos con coloración verde representan la conformación hoja plegada β . En cambio, los residuos con coloración azul representan giros y bucles cortos. Por último, los aminoácidos con coloración amarilla no tienen una conformación definida.

Realizado por: Taimal, 2024.

Tabla 3-3. Predicción de la estructura secundaria del péptido CZS-11 mediante Porter 5.0

Péptido	Estructura secundaria
CZS-11	CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH CC

Realizado por: Taimal, 2024.

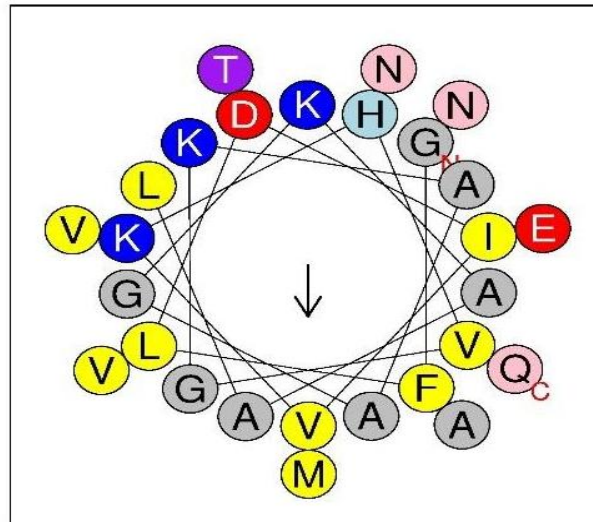


Figura 6-3. Predicción de rueda helicoidal de CZS-11. Los residuos que se encuentran en amarillo son hidrofóbicos/ no polares. Los aminoácidos que se encuentran en azul son básicos y los que se encuentran en rojo son ácidos. La flecha indica el momento hidrofóbico neto.

Realizado por: Taimal, 2024.

También se llevó a cabo la comparación de la secuencia del péptido CZS-11 utilizando la base de datos NCBI a través de la herramienta BLAST/p (proteína-proteína). Este análisis identificó un total de 100 secuencias de péptidos con similitudes. De estas, se seleccionaron las primeras 5 secuencias (Figura 7-3). De la cuáles, cruzioseptina 8 (CZS-8) proveniente de la especie *Cruziohyla calcarifer* obtuvo el valor e-value más bajo de $7e-16$ y un porcentaje de identidad de 92.59 %.

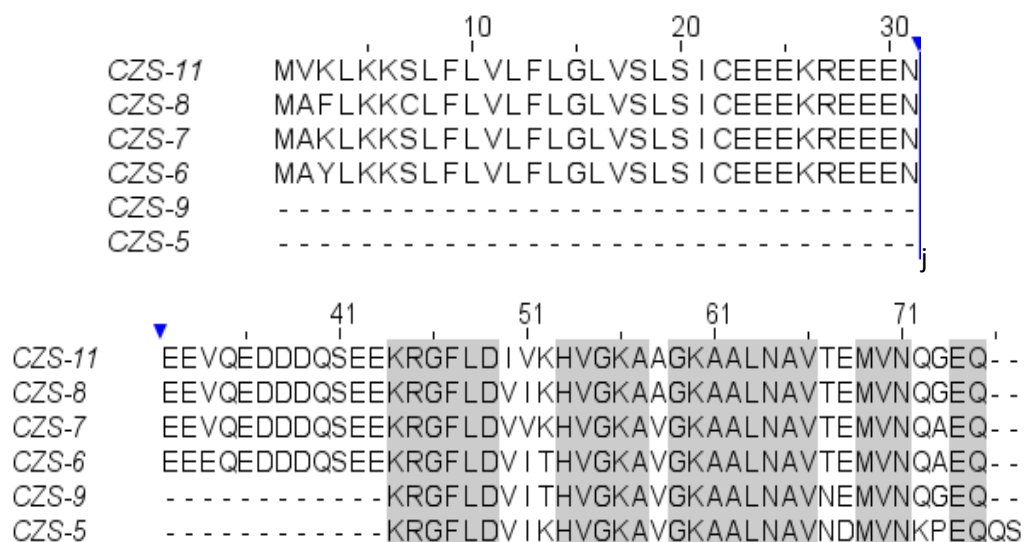


Figura 7-3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de CZS-11 con péptidos de la familia cruzioseptina de acuerdo con BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos NCBI visualizada con Jalview

Realizado por: Taimal, 2024.

Tabla 4-3. Matriz de identidad obtenida a través de los datos de blast/p. (proteína-proteína) de NCBI

	CZS-11	CZS-8	CZS-7	CZS-6	CZS-9	CZS-5
CZS-11	100.00 %	92.86 %	89.29 %	82.14 %	82.14 %	75.00 %

Realizado por: Taimal, 2024.

La predicción de la estructura tridimensional de los péptidos se realizó por medio de I-TASSER, de esta forma se determinó que el péptido sintético CZS-11 tiene una estructura α -helicoidal. El software predijo 5 modelos, para elegir el modelo con mejor predicción se tomó en cuenta el parámetro C-score que se encontró en -0.63 frente a -2,71, -5, -2.12 y -5. Este parámetro demuestra una puntuación de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. Donde un puntaje C de mayor valor significa un modelo con una alta confianza. Para visualizar el modelo se utilizó Chimera 1. 17. Asimismo, mediante este software se observaron los aminoácidos positivos, negativos, neutros, hidrofóbicos y polares.

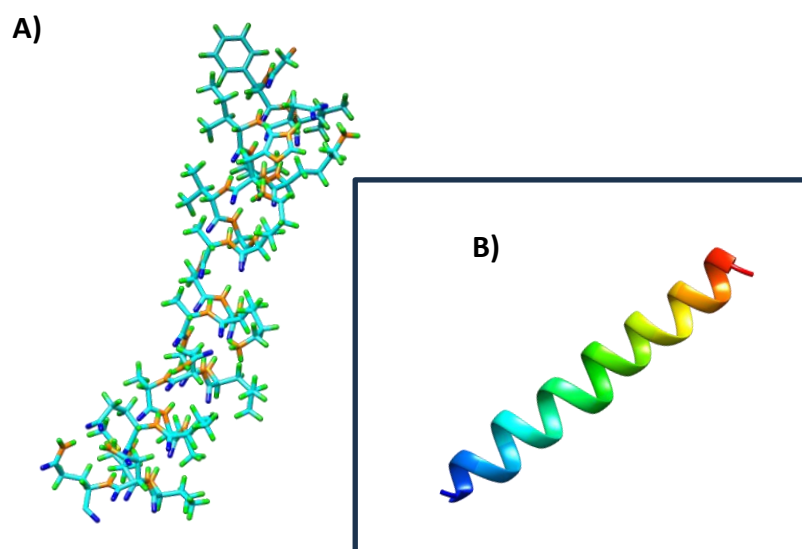


Figura 8-3. Modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera. A) Representación de interacciones entre átomos. B) Representación entre cintas.

Realizado por: Taimal, 2024.

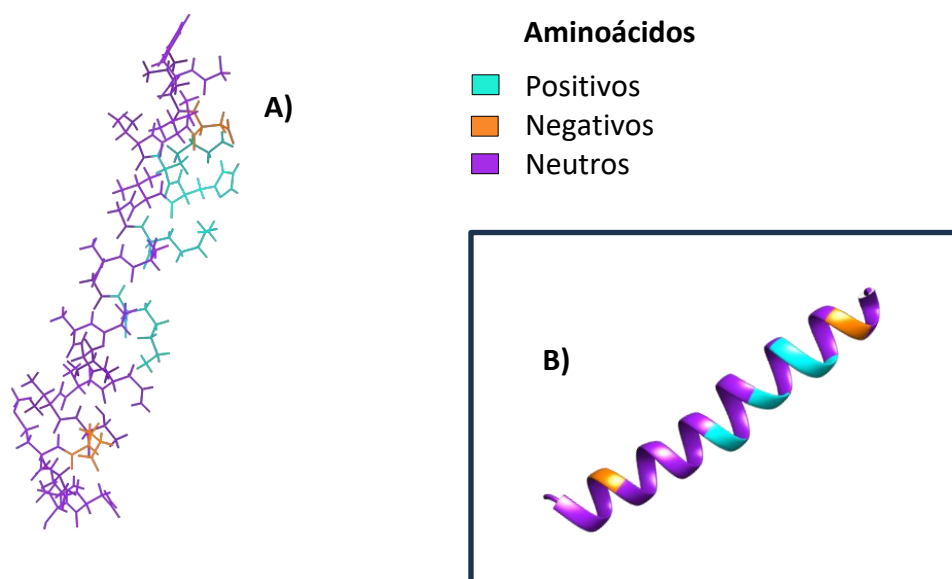


Figura 9-3. Representación de la carga de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera. **A)** Representación de interacciones entre átomos. **B)** Representación entre cintas.

Realizado por: Taimal, 2024.

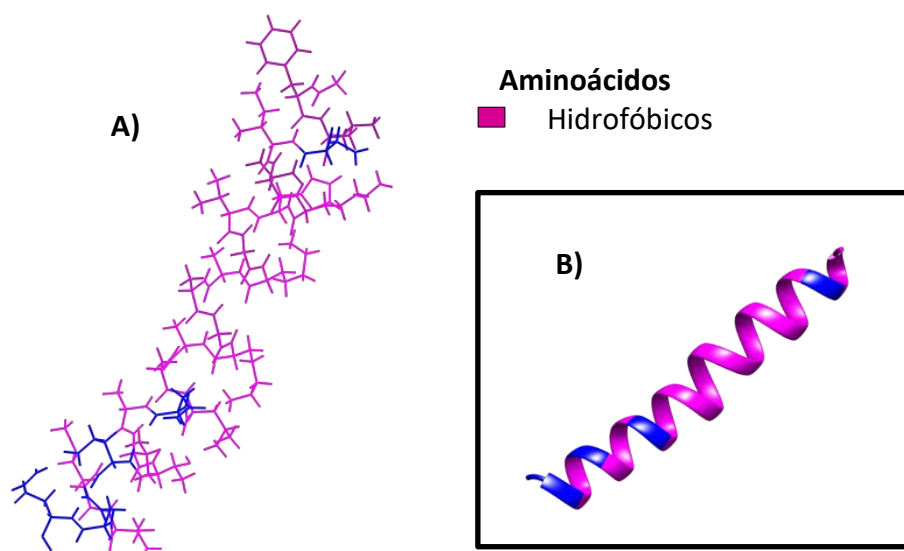


Figura 10-3. Representación de la hidrofobicidad de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera. **A)** Representación de interacciones entre átomos. **B)** Representación entre cintas.

Realizado por: Taimal, 2024.

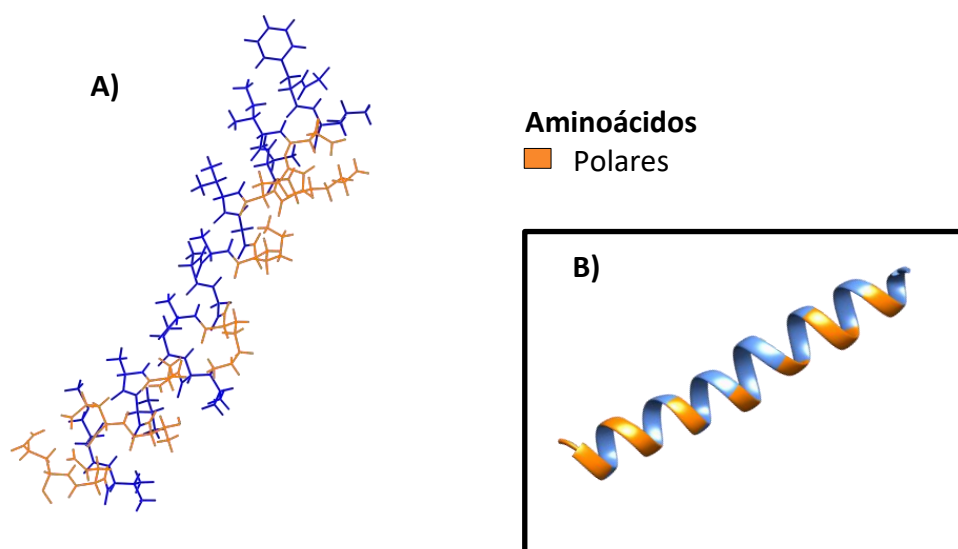


Figura 11-3. Representación de la polaridad de los aminoácidos en el modelo tridimensional de CZS-11 obtenida por medio de I-TASSER visualizada con UCSF Chymera. **A)** Representación de interacciones entre átomos. **B)** Representación entre cintas.

Realizado por: Taimal, 2024.

Tabla 5-3. Comparación de los resultados de CZS-11 con péptidos pertenecientes a la familia cruzioseptina.

Péptido	Secuencia	AAs	CIM μM(mg/L)		% Hemólisis en CIM (mg/L)	Referencias
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		
CZS-11	GFLDIVKHVGKA AGKAALNAVTE MVNQ-NH ₂	27	11,52 (32)	46,07 (128)	(32) -> 0 (128) -> 0	Este Estudio
CZS-16	GFLDVLKGVGK AALGAVTHLIN Q-NH ₂	23	27,5 (64)	27,5 (64)	(64) -> 6.3%	(43)
CZS-17	GFLDVVKGVG KAALGAVTHLI NQ-NH ₂	23	55,5 (128)	111,0 (256)	(128) -> 0.7% (256) -> 4.3%	(43)
CZS-1	GFLDIVKGVGK VALGAVSKLF- NH ₂	21	15,11 (32)	3,77 (8)	(32) -> 20% (8) -> 1%	(44)
CZS-2	GFLVIKHVGKA ALGVVTHLINQ- NH ₂	22	26,35 (64)	6,59 (16)	(64) -> 54% (16) -> 6%	(44)
CZS-3	GFLDVVKHIGK AALGAVTHLLIN Q- NH ₂	24	13,32 (32)	13,32 (32)	(32) -> 6%	(44)

Realizado por: Taimal, 2024.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La hemólisis se define como un proceso de ruptura y destrucción de eritrocitos. La actividad hemolítica es empleada para evaluar la toxicidad de los péptidos antimicrobianos sobre las células eucariotas (65). Se utilizan los eritrocitos porque son un tipo simple de células que no poseen orgánulos subcelulares. Estos son fáciles de obtener de forma pura y se los puede utilizar como índice de daño a la membrana celular por los péptidos (66) .

Para que un PAMs sea candidato a ser un fármaco sistémico tiene como requisito tener una actividad baja contra eritrocitos (67). Caso contrario, los eritrocitos se destruirían liberando la hemoglobina causando daño a los tejidos. Además, se podría comprometer su función principal de transporte de oxígeno, provocando problemas de oxigenación a los tejidos (68). Por esta razón, el péptido debe tener un equilibrio entre la hemólisis y actividad terapéutica (69). Usualmente la toxicidad ha impedido que varios de los posibles medicamentos no sean aprobados (70). Por esta razón, el péptido sintético CZS-11 de 23 residuos de aminoácidos podría tener potencial terapéutico porque no presentó hemólisis, en la CIM que mostró actividad contra *S. aureus* ATCC 29213 (46,07 μ M) y contra *E. coli* ATCC 25922 (11,52 μ M), y el aislado clínico resistente a ampicilina de *Klebsiella pneumoniae* con un valor de CIM de 46,07 μ M (Figura 3-3).

Los resultados obtenidos del péptido CZS-11 se compararon con algunos péptidos de la familia de cruzioseptinas mencionadas anteriormente. Para la comparación se tomó en cuenta la actividad presentada por los péptidos para *E. coli* y *S. aureus* debido a que CZS-11 no presentó actividad para *C. albicans*. Tampoco se hizo relación a la actividad contra las bacterias resistentes *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* porque hasta la actualidad no se han realizado ensayos en todos los péptidos de la familia mencionada anteriormente. Pues el péptido CZS-16 presentó un valor de CIM de 27,5 μ M contra *E. coli* y *S. aureus*. Además, mostró una actividad hemolítica de 6,3 % según la (Tabla 5-3). En cambio, CZS-17 exhibió valores de CIM de 55,5 μ M para *E. coli* y 110 μ M contra *S. aureus*, teniendo una hemólisis de 0,7 al 4,3 % (71) . Mientras que, la CZS-1 presentó una CIM de 15,11 μ M para *E. coli* y 3.77 μ M para *S. aureus*, con una hemólisis del 1-20%. La CZS-2 exhibió valores de CIM de 26,35 μ M para *E. coli* y 66,59 para *S. aureus*, presentando una actividad hemolítica del 6-54%. En cambio, CZS-3 mostró un valor de CIM de 13,32 para *E. coli* y *S. aureus*, presentando una actividad hemolítica de 6% (44).

Como se puede identificar, algunos de los péptidos de la familia son muy buenos candidatos como potenciales terapéuticos porque presentan baja hemólisis y presentan actividad contra *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo; de los péptidos mencionados anteriormente ninguno posee un porcentaje de hemólisis nula o de 0% como es el caso del péptido sintético CZS-11, por esta razón se puede inferir que tiene un alto valor como potencial terapéutico.

La nula hemólisis que presentó el péptido sintético CZS-11 en las concentraciones donde se encuentra la CIM de las cepas mencionadas, puede deberse a la hidrofobicidad relativamente baja que es de 0.34 (Tabla 2-3). Se infiere que es baja, debido a que el programa HeliQuest utiliza la escala de Fauchere y Pliska que va de -1.01 a 2.25 (72). Impidiendo que las moléculas ingresen en la membrana citoplasmática de los glóbulos rojos para provocar la hemólisis (73).

Como se mencionó anteriormente, el péptido tuvo actividad contra *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*. La actividad antimicrobiana puede atribuirse al hecho de que los péptidos únicamente requieren posicionarse en la interfaz, alineándose de manera paralela a la superficie de la membrana. Esto posibilita que su superficie hidrófoba (orientada hacia el interior) pueda interactuar con la posición hidrófoba del lípido. Mientras que los residuos cargados positivamente (dirigidos hacia el exterior) pueden interactuar con los grupos de cabeza cargados negativamente de los fosfolípidos (74,75).

Las bacterias (*E. coli* y *K. pneumoniae*) se clasifican como Gram negativas, a diferencia de *S. aureus*, que es Gram positiva. Esto ayuda a la explicación de la actividad del péptido CZS-11 ya que podría atribuirse a su naturaleza catiónica, como se refleja en la (Tabla 2-3), donde se observa que posee una carga neta de +1. Debido a que los péptidos catiónicos en gran medida reemplazan al Mg^{2+} o Ca^{2+} que funciona como estabilizador del lipopolisacárido que se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Causando así, la alteración de la membrana externa provocando que las moléculas peptídicas puedan acceder y penetrar en la membrana citoplasmática (76). En cambio, según estudios de otros péptidos. El mecanismo de acción contra bacterias Gram positivas puede ser por la carga positiva que interactúa con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Los mecanismos también incluyen formación de poros en la membrana celular provocando la pérdida del contenido celular e inhibición de precursores en la síntesis de la pared celular (77).

Además, su actividad puede atribuirse a su anfipaticidad (propiedad de tener regiones hidrofílicas e hidrofóbicas). La exposición de una superficie hidrofóbica es un patrón frecuente y constituye la fuerza principal que impulsa la introducción de un péptido en la interfaz altamente anisotrópica de una bicapa lipídica, desplazando las cadenas laterales hidrofóbicas del agua para estar en contacto con la región hidrocarbonada de la bicapa (78).

Es importante destacar que, de acuerdo con la predicción de la estructura secundaria (Figura 5-3) el 96.2 % de residuos de aminoácidos tienen una conformación α -hélice. Este predominio de α -hélice suele conferir al péptido una mayor actividad contra membranas microbianas (59,79). Debido a que, la conformación α -hélice del péptido presenta un extremo hidrofóbico y otro hidrofílico. La presencia de un extremo hidrofílico facilita la interacción del péptido con la superficie acuosa de la membrana bacteriana, un aspecto relevante para su actividad antimicrobiana (80).

El índice de selectividad es el indicador más adecuado para evidenciar la seguridad de los péptidos a potenciales terapéuticos. El ÍS refleja la ventana terapéutica entre la toxicidad y el efecto biológico. Los valores altos impulsan los siguientes pasos en la evaluación del péptido de prueba como posible fármaco (69,81). El criterio de aceptación con respecto a la muestra bioactiva selectiva es de $\text{ÍS} \geq 10$. Mientras que, si el ÍS se encuentra entre 1-10, es recomendable volver a evaluar el péptido utilizando otro biosistema para confirmarlo. Por otro lado, si la muestra bioactiva presenta un $\text{ÍS} < 1$ puede contener componentes tóxicos y no son aptos como potenciales terapéuticos (82). Con el criterio mencionado, el péptido CZS-11 es selectivo como potencial terapéutico para *Escherichia coli* con un ÍS de 19,59. Sin embargo, su ÍS de 4,89 frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* indica la necesidad de una reevaluación utilizando otro biosistema para confirmar el índice de selectividad. Es importante destacar que el péptido CZS-11 no presenta un ÍS inferior a 1, lo que sugiere que no es tóxico.

La afinidad por *E. coli* se puede identificar, con los valores de MBC. Ya que, presento valores MBC de 11,52 μM para *E. coli*; 92,15 μM para *S. aureus* y 46,07 μM para *K. pneumoniae*. Como se puede identificar, el valor más bajo de concentración es de *E. coli*. Mientras más baja sea la concentración es mejor y más potente es el péptido contra el microorganismo.

Como se visualiza en la (Figura 3-3) el péptido CZS-11 no posee actividad *contra P. aeruginosa*. Esto podría estar relacionada a la permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* debido a que es extremadamente restringida; es entre 12 a 100 veces menor que la de *E. coli*. Una de las razones de que podría ocurrir esto, es debido a una proteína de la membrana externa denominada OprF siendo la porina predominante en esta bacteria. La OprF es encargada de la captación inespecífica de iones y sacáridos (83). Esta proteína tiene la capacidad de adoptar dos configuraciones distintas: i) configuración cerrada de dos dominios que comprende un β -barril transmembrana en el extremo N-terminal y un dominio globular periplásmico en el extremo C-terminal. ii) configuración de canal abierto con un solo dominio transmembrana. Por lo que, la prevalencia de canales OprF mayoritariamente cerrados puede explicar la notable reducción de la permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* en comparación con otras bacterias (76).

En la (Figura 3-3) también se observa que no tuvo actividad contra *C. albicans*. Esto puede deberse a la complejidad de la membrana plasmática en comparación con las bacterias debido a que *C. albicans* posee esfingolípidos y esteroides (84). Los esfingolípidos ejercen un fuerte impacto en la fluidez, hidratación, permeabilidad pasiva, difusión lateral de componentes, curvatura de membrana y grosor, contribuyendo a la estabilidad y la dinámica de la compartimentación de la membrana (85). En cambio, los esteroides proporcionan estabilidad y resistencia a las tensiones físicas de la membrana (86).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo de titulación se reporta la actividad del péptido sintético cruzioseptina 11 (CZS-11) con 87,19% de pureza. Este presentó actividad antimicrobiana contra *E. coli* a un valor de CIM de 11,52 μ M. Como también a una CIM de 46,07 μ M para *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Además el péptido presentó una MBC de 11,52 μ M en *E.coli* 92,15 μ M para *S. aureus* y 46,07 μ M en *K. pneumoniae*. En cuanto a la toxicidad, el péptido no mostró hemólisis en las mismas concentraciones de inhibición.

Los resultados de las propiedades fisicoquímicas muestran que el péptido posee una estructura secundaria α -hélice anfipática, con un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos de 51,85%, la carga neta del péptido es de +1. Estas características del péptido indican una estrecha relación con mecanismos de acción de péptidos con similares características.

El péptido mostró alentadores resultados como potencial terapéutico contra *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumonie*, Demostrando que el péptido cruzioseptina-11 tiene un potencial biomédico, dentro del problema emergente a nivel mundial de la resistencia bacteriana a antibióticos.

Finalmente, en base a la información proporcionada en este estudio sería necesario ampliar la investigación en la evaluación de la actividad de CZS-11 con bacterias con diferentes perfiles de resistencia. Como también, evaluar la actividad de CZS-11 por medio de otros ensayos e identificar el mecanismo de acción específico del péptido.

REFERENCIAS

1. Duellman W, Trueb L. Biology of amphibians. 1994 [cited 2023 Nov 20]; Available from: https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=CzxVvKmrItgC&oi=fnd&pg=PP11&ots=A-G1ldtqmV&sig=9ex_1M7HHWnMbNhqm8DHnnpbnYY
2. Demori I, Rashed Z, Corradino V, Catalano A, Rovegno L, Queirolo L, et al. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. *Molecules* 2019, Vol 24, Page 347 [Internet]. 2019 Jan 18 [cited 2023 Nov 20];24(2):347. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/2/347/htm>
3. Chen T, Farragher S, Bjourson AJ, Orr DF, Rao P, Shaw C. Granular gland transcriptomes in stimulated amphibian skin secretions. *Biochemical Journal* [Internet]. 2003 Apr 4 [cited 2023 Nov 20];371(Pt 1):125. Available from: [/pmc/articles/PMC1223249/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/125125125/)
4. Lazarus L, neurobiology MAP in, 1993 undefined. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Elsevier* [Internet]. [cited 2023 Nov 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030100829390027P>
5. Simmaco M, Mignogna G. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?. 1998•Wiley Online Library [Internet]. 1999 [cited 2023 Nov 20]; Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6%3C435::AID-BIP3%3E3.0.CO;2-8](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6%3C435::AID-BIP3%3E3.0.CO;2-8)
6. Brandon A, Labanick G, Huheey J. Relative Palatability, Defensive Behavior, and Mimetic Relationships of Red Salamanders (*Pseudotriton ruber*), Mud Salamanders (*Pseudotriton montanus*), and Red Efts (*Notophthalmus viridescens*). *Herpetologica*. 1979;35(4).
7. Rinaldi A. Antimicrobial peptides from amphibian skin: An expanding scenario: Commentary. Vol. 6, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002.
8. Mans D, Pawirodihardjo J, Djotaroeno M, Friperon P. Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs -Amphibians. *J Transl Sci*. 2021;7(3).
9. Daly J, Spande T, products HGJ of natural, 2005 undefined. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *ACS Publications* [Internet]. 2005 Oct [cited 2023 Nov 20];68(10):1556–75. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0580560>
10. Kitts D, Weiler K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. *Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. Curr Pharm Des*. 2005;9(16).
11. Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: A review. Vol. 1, *Food Quality and Safety*. 2017.
12. Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. Vol. 39, *Medicinal Research Reviews*. 2019.
13. Li C, Kim K. Neuropeptides. *WormBook* [Internet]. 2008 [cited 2023 Dec 18];1. Available from: [/pmc/articles/PMC2749236/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/125125125/)
14. Martínez O, Martínez E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Vol. 21, *Nutricion Hospitalaria*. 2006.
15. Segura M, Chel L, Betancur D. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Vol. 37, *Revista Chilena de Nutricion*. 2010.
16. Yang R, Zhang Z, Pei X, Han X, Wang J, Wang L, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. *Food Chem*. 2009;113(2).
17. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. Vol. 16, *International Dairy*

- Journal. 2006.
18. Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Funct Foods*. 2009;1(2).
 19. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Vol. 18, *Current Opinion in Biotechnology*. 2007.
 20. Agyei D, Danquah M. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. Vol. 29, *Biotechnology Advances*. 2011.
 21. Hancock R, biotechnology H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *nature.com* [Internet]. 2006 [cited 2023 Jul 9];24. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt1267>
 22. Lee H, Lee C, Yang J, Lai J, Chang K, Ray O. A large-scale structural classification of Antimicrobial peptides. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
 23. Nguyen L, Haney E, Vogel H. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Vol. 29, *Trends in Biotechnology*. 2011.
 24. Antimicrobial Peptide Database [Internet]. [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://aps.unmc.edu/>
 25. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2004;75(1).
 26. Kim S, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Vol. 2, *Journal of Functional Foods*. 2010.
 27. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. Vol. 32, *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012.
 28. Zhang Q, Yan Z, Meng Y, Hong X, Shao G, Ma J, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. Vol. 8, *Military Medical Research*. 2021.
 29. da Costa J, Cova M, Ferreira R, Vitorino R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? Vol. 99, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015.
 30. Kumar P, Kizhakkedathu J, Straus S. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. Vol. 8, *Biomolecules*. 2018.
 31. Shagaghi N, Palombo E, Clayton A, Bhawe M. Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. Vol. 34, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018.
 32. Scocchi M, Tossi A, Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: Converging to a non-lytic mechanism of action. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011.
 33. Ulmschneider JP. Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate across Membranes without Forming Channel-like Pores. *Biophys J*. 2017;113(1).
 34. Ulvatne H, Samuelsen Ø, Haukland H, Krämer M, Vorland LH. Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;237(2).
 35. Friedrich C, Rozek A, Patrzykat A, Hancock REW. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(26).
 36. Graf M, Wilson D. Intracellular antimicrobial peptides targeting the protein synthesis machinery. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019.
 37. Wang G. Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length-dependent correlations for peptide design and prediction. *Antibiotics*. 2020;9(8).
 38. Pierre T, Seon A, Amiche M, Nicolas P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. *Eur J Biochem*. 2000;267(2).

39. Patocka J, Nepovimova E, Klimova B, Wu Q, Kuca K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem*. 2018;26(32).
40. Conlon J, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. Vol. 1696, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2004.
41. Nicolas P, El Amri C. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. Vol. 1788, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009.
42. Tennessen J, Woodhams D, Chaurand P, Reinert L, Billheimer D, Shyr Y, et al. Variations in the expressed antimicrobial peptide repertoire of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations suggest intraspecies differences in resistance to pathogens. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(12).
43. Cuesta S, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán G, Proaño C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53(6).
44. Proaño C, Zhou M, Wang L, Coloma L, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016;146.
45. Mendes B, Proaño C, Gadelha F, Almeida J, Miguel D. Cruzioseptins, antibacterial peptides from *Cruziohyla calcarifer* skin, as promising leishmanicidal agents. *Pathogens and disease*, 2020•academic.oup.com [Internet]. [cited 2023 Oct 2];78:53. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-abstract/78/6/ftaa053/5905406>
46. Carolina J, Tabares M, Rojas P, Académico: T. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ COLEGIO DE POSGRADOS HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN Evaluación in vitro de la actividad leishmanicida de cuatro péptidos sintéticos derivados de la piel de anfibios del Ecuador. [cited 2023 Oct 2]; Available from: <http://bit.ly/COPETheses>.
47. Becerra G, Plascencia A, Luévanos A, Domínguez M, Hernández I. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Vol. 29, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2009.
48. Martín G, Carmona O. Prevención de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. aspectos farmacológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2003;
49. Giono S, Santos J, Morfín M, Torres F, Alcántar M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gac Med Mex*. 2020;156(2).
50. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. Ministerio de Salud Pública. 2018;2(1).
51. Fariña N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2016;14(1).
52. O'Neill J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. 2016;(December).
53. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *REVISTA MEDICA DEL URUGUAY*. 2017;33(4).
54. David J, Icaza L. Cepas de *Candida albicans*, aisladas en pacientes con diabetes Mellitus y su resistencia a los antifúngicos en el Hospital del día IESS. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, ISSN-e 2588-073X, Vol 3, N° 1, 2019, págs 329-344 [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 17];3(1):329–44. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6796759&info=resumen&idioma=SPA>
55. DATOS RESISTENCIA BACTERIANA ECUADOR-2015.
56. Falcon N, Ortega C, Gorniak S, Villamil L, Rios C, Simón M. El problema de la resistencia a

- antibióticos en salud pública. *Una Salud Revista Sapuvet de Salud Pública*. 2010;1(1).
57. Almeida J, Palacios A, Patiño R, Mendes B, Teixeira C, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A 2 to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. Vol. 80, *Drug Development Research*. 2019.
 58. Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang Z. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. Vol. 40, *Zoological research*. 2019.
 59. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Vol. 11, *American Journal of Translational Research*. 2019.
 60. Agarwal G, Gabrani R. Antiviral Peptides: Identification and Validation. Vol. 27, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021.
 61. Bobone S, Stella L. Selectivity of antimicrobial peptides: A complex interplay of multiple equilibria. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019.
 62. Lau J, Dunn M. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*. 2018;26(10).
 63. Valdivieso F, Bermúdez S, Proaño C, Almeida J. Deciphering the Limitations and Antibacterial Mechanism of Cruzioseptins. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(2).
 64. Casanova M, Maresca M, Poncin I, Point V, Olleik H, Boidin C, et al. Promising antibacterial efficacy of arenicin peptides against the emerging opportunistic pathogen *Mycobacterium abscessus*. *J Biomed Sci [Internet]*. 2024 Dec 1 [cited 2024 Feb 5];31(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38287360/>
 65. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel B, Watts JL, et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep*. 2020;10(1).
 66. Akanji M, Ojewuyi O, Yakubu M. Assessment of Erythrocytes as a Model for In Vitro Drug Toxicity. *Fountain Journal of Natural and Applied Sciences [Internet]*. 2013 Jun 28 [cited 2023 Nov 29];2(1):6–10. Available from: <http://fountainjournals.com/index.php/FUJNAS/article/view/41>
 67. Oddo A, Hansen P. Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides. *Methods Mol Biol [Internet]*. 2017 [cited 2023 Nov 28];1548:427–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28013523/>
 68. Chumakovo S, Urazova O, Zima A, Novifskiy V V. Features of the physiology of erythrocytes. hemolysis and eryptosis. *Gematologiya i Transfusiologiya*. 2018;63(4).
 69. Robles A, Pinos E, Mendes B, Ortega J, Proaño C, Plisson F, et al. Traditional and Computational Screening of Non-Toxic Peptides and Approaches to Improving Selectivity. *Pharmaceuticals [Internet]*. 2022 Mar 1 [cited 2023 Nov 28];15(3):323. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/3/323/htm>
 70. Cardoso M, Ribeiro S, Nolasco D, De La Fuente C, Felício M, Gonçalves S, et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 Feb 26 [cited 2023 Nov 28];6(1):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep21385>
 71. Cuesta S, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán G, Proaño C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53(6).
 72. Fauchere J, Pliska V. Hydrophobic parameters π of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides. *Eur J Med Chem*. 1983;18(4).
 73. Chen Y, Guarnieri M, Vasil A, Vasil M, Mant C, Hodges RS. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother [Internet]*.

- 2007 Apr [cited 2023 Nov 28];51(4):1398. Available from: [/pmc/articles/PMC1855469/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1855469/)
74. Salgado J, Grage S, Kondejewski L, Hodges R, McElhaney RN, Ulrich AS. Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial β -sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state ^{19}F -NMR. *J Biomol NMR*. 2001;21(3).
 75. Marassi F, Opella S, Juvvadi P, Merrifield R. Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J*. 1999;77(6).
 76. Mai X, Huang J, Tan J, Huang Y, Chen Y. Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*. 2015;21(7).
 77. Mexicana A, México A, Ochoa J, Santoyo A, Anaya G, Luis J, et al. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jan 30];39:49–57. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911110007>
 78. Mahalka A, Kinnunen P. Binding of amphipathic α -helical antimicrobial peptides to lipid membranes: Lessons from temporins B and L. Vol. 1788, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009.
 79. Stark M, Liu L, Deber C. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11).
 80. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, reports HJS, 2020 undefined. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *nature.com* Greco, N Molchanova, E Holmedal, H Jenssen, BD Hummel, JL Watts, J HåkanssonScientific reports, 2020•nature.com [Internet]. [cited 2023 Nov 29]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69995-9>
 81. Indrayanto G, Putra G, Suhud F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2021.
 82. McGaw L, Elgorashi E, Eloff J. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. 2014 Jun 6;181–233.
 83. Pang Z, Raudonis R, Glick B, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Vol. 37, *Biotechnology Advances*. 2019.
 84. Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, Pucadyil T, Chattopadhyay A, Prasad R. Membrane Sphingolipid-Ergosterol Interactions Are Important Determinants of Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 May [cited 2023 Dec 18];48(5):1778. Available from: [/pmc/articles/PMC400589/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1400589/)
 85. Santos F, Marquês J, Bento- A, de Almeida R. Sphingolipid-enriched domains in fungi. Vol. 594, *FEBS Letters*. 2020.
 86. Parks L, Casey W. Physiological implication of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49.