



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN FUNCIONAL DE DOS CRUZIOSEPTINAS
DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE LA RANA ESPLÉNDIDA
CRUZIOHYLA CALCARIFER”**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: EMILY DAYANA MONTESDEOCA BENALCÁZAR

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Emily Dayana Montesdeoca Benalcázar con documento de identidad N° 1751556547, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera 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.

Atentamente,

Tena, 23 de febrero de 2024.



Emily Dayana Montesdeoca Benalcázar

CI: 1751556547

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, EMILY DAYANA MONTESDEOCA BENALCAZAR, con documento de identidad N° 1751556547, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Evaluación funcional de dos cruzioseptinas de la secreción cutánea de la rana espléndida *Cruziohyla calcarifer*” 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, 23 de febrero de 2024.



Emily Dayana Montesdeoca Benalcázar

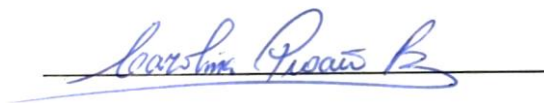
CI: 1751556547

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación: “Evaluación funcional de dos cruzioseptinas de la secreción cutánea de la rana espléndida *Cruziohyla calcarifer*” en la modalidad de proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Emily Dayana Montesdeoca Benalcázar, 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, 23 de febrero de 2024.



Carolina Del Carmen Proaño Bolaño
CI: 1714818760

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Universidad Regional Amazónica IKIAM y en especial al Laboratorio de Biología molecular y Bioquímica, que contribuyeron para que este trabajo de investigación se pueda llevar a cabo. Primordialmente quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Carolina Proaño que gracias a sus conocimientos me orientó en todo el proceso de mi trabajo y además me brindó la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación, en el que pude fortalecer mis conocimientos prácticos.

Agradezco sinceramente a los técnicos de laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica por su dedicación hasta altas horas del día, en especial a la Ingeniera Giovanna Morán que me guió con paciencia y dedicación en cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo en mi trabajo de investigación.

Además, quiero agradecer a mis amigos más cercanos de la universidad como Joshué, Naye, Areliz, Henry, Daniel, Roy, Marco y Lenin, que gracias a su apoyo en mis malos momentos y sus consejos pude mejorar en el ámbito personal y académico. Por último, agradecer enormemente a mi familia en especial a mi madre que ha sido un pilar importante en mi formación académica y a mí misma por mi perseverancia en cada paso de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi madre y a mi abuela,
quienes son mi ejemplo a seguir
por su constancia y sacrificio.
Gracias a ellas todo esto fue posible.

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Péptidos antimicrobianos y sus fuentes naturales	1
1.1.2 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	2
1.1.3 Péptidos provenientes de la secreción cutánea de anuros	3
1.1.4 Cruzioseptinas	4
1.2 Planteamiento del problema	5
1.3 Justificación de la investigación	6
1.4 Objetivos	7
1.4.1 General	7
1.4.2 Específicos	7
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	8
2.1 Análisis bioinformáticos de las dos cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13	8
2.2 Síntesis y evaluación de la pureza de los péptidos sintéticos por HPLC	8
2.3 Purificación de los péptidos sintéticos por HPLC preparativa	9
2.4 Análisis de las fracciones por MALDI-TOF MS	9
2.5 Ensayos antimicrobianos y hemolíticos de los péptidos purificados	9
2.5.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima	9
2.5.2 Ensayo de hemólisis	10
2.6 Calculo del índice de selectividad	11
CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	12
3.1 Análisis bioinformáticos de las dos cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.	12

3.1.1	Propiedades fisicoquímicas y estructurales	12
3.1.2	Análisis de la secuencia nucleotídica de CZS-8 y peptídica de CZS-8 y CZS-13	14
3.1.2.1	Secuencia nucleotídica de Cruzioseptina-8 (CZS- 8).....	14
3.1.2.2	Secuencias peptídicas de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.....	16
3.2	Síntesis, purificación y análisis de masas mediante MALDI-TOF MS de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.	16
3.2.1	Evaluación de la pureza de cruzioseptina-8 (CZS-8) sintético	16
3.2.2	Evaluación de la pureza de cruzioseptina-13 (CZS-13) sintético	17
3.3	Purificación de las cruzioseptinas CZS-8 y CSZ13 por medio HPLC preparativa y análisis de las fracciones por MALDI-TOF MS.....	18
3.3.1	Purificación de Cruzioseptina-8 (CZS-8).....	18
3.3.2	Purificación de Cruzioseptina-13 (CZS13).....	19
3.4	Ensayos antimicrobianos y hemolíticos de los péptidos purificados	20
3.4.1	Cruzioseptina-8	20
3.4.2	Cruzioseptina-13	21
3.5	Índice de selectividad de los péptidos CZS-8 y CZS-13	24
CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS		25
4.1	Análisis de las secuencias de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.....	25
4.1.1	Secuencia nucleotídica CZS-8.....	25
4.1.2	Secuencias peptídicas de CZS-8 y CZS-13.....	25
4.2	Propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana	26
4.3	Actividad hemolítica e Índice de selectividad.....	28
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		31
6. Referencias		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1:	Propiedades fisicoquímicas de siete cruzioseptinas.....	13
Tabla 3-2:	Comparación de la secuencia nucleotídica de la cruzioseptina-8 con otras cruzioseptinas de acuerdo al BLAST/n	15
Tabla 3-3:	Análisis de la secuencia peptídica de cruzioseptina-8 y cruzioseptina-13 con otras cruzioseptinas de acuerdo al BLAST/p	16
Tabla 3-4:	Índice de selectividad de CZS-8 y CZS-13 de cada microorganismo. ...	24
Tabla 4-5:	Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de las cruzioseptinas provenientes de <i>Cruziohyla</i> <i>calcarifer</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3-1:	Ruedas helicoidales.	14
Figura 3-2:	Síntesis de cruzioseptina-8 (CZS-8).....	17
Figura 3-3:	Síntesis de cruzioseptina-13 (CZS-13)	18
Figura 3-4:	Purificación de cruzioseptina-8 (CZS-8)	19
Figura 3-5:	Purificación de cruzioseptina-13 (CZS-13)	20
Figura 3-6:	Concentración inhibitoria minima(CIM).....	22
Figura 3-7:	Actividad hemolítica de las dos cruzioseptinas.....	23

RESUMEN

El descubrimiento de nuevas moléculas como los péptidos antimicrobianos (AMPs) son de suma importancia para combatir el uso excesivo de antibióticos. Una de las fuentes más abundantes y estudiadas es la secreción cutánea de los anfibios con más de 1169 AMPs identificados. La especie *Cruziohyla calcarifer* forma parte de la familia Phyllomedusidae, de la cual se logró identificar 17 péptidos antimicrobianos denominados cruzioseptinas, que han demostrado una notable actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y parásitos. El objetivo de este trabajo de investigación es caracterizar funcionalmente a las cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) considerando sus propiedades fisicoquímicas y cómo afectan a su mecanismo de acción y selectividad. Los péptidos CZS-8 y CZS-13 fueron sintetizados químicamente y purificados por medio de cromatografía de alta eficiencia (HPLC). Las fracciones purificadas fueron identificadas por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF mediante la determinación de la masa molecular de cada uno de los péptidos. Se evaluó su actividad antimicrobiana por medio del ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM) y su actividad hemolítica. El péptido cruzioseptina-8 presentó una actividad inhibitoria significativa contra microorganismos como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a una concentración de 11,52 μM y contra *Staphylococcus aureus* a 23,02 μM y una actividad hemolítica en concentraciones $> 23,02 \mu\text{M}$, por otra parte, el péptido cruzioseptina-13 no presentó actividad antimicrobiana, pero si actividad hemolítica en concentraciones $> 25,40 \mu\text{M}$. Las propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad y cationicidad reflejaron mayor relevancia en la selectividad y actividad antibacteriana en comparación con la actividad hemolítica en la que influyen más la anfipaticidad e hidrofobicidad.

Palabras claves: Péptidos antimicrobianos, cruzioseptinas, caracterización, actividad hemolítica y antibacteriana

ABSTRACT

The discovery of new molecules such as the antimicrobial peptides (AMPs) are of utmost importance to combat the overuse of antibiotics. One of the most abundant and studied sources is the skin secretion of amphibians with more than 1169 AMPs identified so far. The *Cruziohyla calcarifer* species is part of the Phyllomedusidae family, from which 17 antimicrobial peptides named cruzioseptins were identified and have demonstrated remarkable antimicrobial activity against bacteria, fungi and parasites. The objective of this study is to functionally characterize two cruzioseptins (CZS-8 and CZS-113) considering their physicochemical properties and how they affect their mechanism of action and selectivity. The peptides CZS-8 and CZS-13 were chemically synthesized and purified by means of high performance liquid chromatography (HPLC). The purified fractions were identified by MALDI-TOF mass spectrometry determining the molecular mass of each one of the peptides. The minimal inhibitory concentration (MIC) and hemolytic activity of both peptides were evaluated. The CZS-8 showed inhibitory activity against *E. coli* and *K. pneumonia* at 11.52uM and at 23.02uM against *S. aureus*. On the other hand, CZS-8 was hemolytic at >23.02uM. On the contrary, CZS-13 did not have antimicrobial activity but was hemolytic at >25.40 µM. Physicochemical properties such as hydrophobicity and cationicity reflected greater relevance in selectivity and antibacterial activity compared to hemolytic activity, which is more influenced by amphipathicity and hydrophobicity.

Keywords: Antimicrobial peptides, cruzioseptins, characterization, hemolytic and antibacterial activity

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Péptidos antimicrobianos y sus fuentes naturales

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son biomoléculas que presentan una amplia gama de actividades biológicas, entre ellas antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral. Además, presenta otras actividades biológicas como la cicatrización de heridas y actividades antitumorales [1,2]. Estas biomoléculas poseen ciertas características fisicoquímicas comunes. Por ejemplo: constan de una extensión de 12 a 50 aminoácidos, tienen carga neta positiva a un pH neutro debido a su contenido de aminoácidos (Arg - Lys) y poseen un 50% de aminoácidos hidrofóbicos [3–5]. Estructuralmente los AMPs tienen la capacidad de formar una hélice α anfipática conformada por una cara de residuos hidrofóbicos y otra de residuos hidrofílicos y catiónicos [3].

Estas biomoléculas son generadas por el sistema de defensa de organismos que van desde bacterias, hongos, especies de invertebrados y hasta los humanos como una respuesta humoral [6,7]. Los AMPs son de suma importancia para aquellos organismos que no poseen un sistema inmune adaptativo como plantas e insectos, que se encuentran expuestos a infecciones la mayor parte del tiempo [2]. Según el repositorio de datos de péptidos antimicrobianos (DRAMP 2.0), se han reportado alrededor de 3791 AMPs provenientes de fuentes como: bacterias (431), arqueas (4), protozoos (7), hongos (6), plantas (824) y animales (2519) [8].

Algunos ejemplos de AMPs de origen natural son las bacteriocinas, un grupo grande de AMPs que proviene del sistema inmunológico de células bacterianas a las cuales les proporciona protección al momento de competir por nutrientes [9]. Otros ejemplos son las cecropinas que se encuentran en la hemolinfa de insectos como la polilla gigante de seda y presentan actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [10]. Las tioninas también conocidas como fitotóxicas son derivadas de plantas, desempeñan actividades en el crecimiento de las plantas y además presentan un alto espectro contra bacterias, hongos, larvas y células animales [11]. La magainina2 es uno de los primeros péptidos descubiertos en la secreción cutánea de anfibios, presenta actividad contra

Gram positivas y Gram negativas [12]. Y por último, las defensinas y catelicidinas que provienen de mamíferos como los humanos y se encuentran distribuidas en la piel, ojos, tracto respiratorio, pulmones, intestino y uretra; estos AMPs se relacionan con la apoptosis celular y la cicatrización de heridas [13,14].

1.1.2 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

Los mecanismos de acción de los AMPs se pueden clasificar en : AMPs que interactúan con la membrana, y los que intervienen en procesos celulares e inhibición de la biosíntesis de componentes celulares [15].

La interacción con la membrana es el mecanismo de acción más estudiado de los AMPs. Este proceso se basa en la interacción electrostática entre los residuos catiónicos del péptido y la membrana aniónica de los microorganismos [16]. Existen diferentes modelos reportados como: alfombra, duela barril, toroidal y poro toroidal desordenado [13,15].

El modelo alfombra se basa en la acumulación de AMPs en la superficie de la membrana bacteriana hasta un umbral de concentración, produciendo cuerpos micelares que desintegran la membrana [2,3]. El modelo barril-duela y toroidal son mecanismos que producen poros en la membrana y en ambos se da un ingreso perpendicular del péptido. Por un lado, el modelo barril-duela genera interacciones de los residuos hidrofóbicos del péptido con los lípidos de la membrana y los residuos hidrofílicos forman el lumen del poro. En cambio en el modo toroidal, el péptido se inserta en la membrana desencadenando una reestructuración de los lípidos, a diferencia del toroidal desordenado en el que no hay una orientación definida del péptido [2,15,17].

Los AMPs suelen exhibir otros mecanismos de acción como el de dirigirse a objetivos intracelulares. Un ejemplo claro de este mecanismo es el AMP buforina II proveniente del tejido estomacal del sapo *Bufo bufo gargarizans*, el cual tiene la capacidad de matar a los microorganismos sin necesidad de permeabilizar la membrana celular, uniéndose al ADN y ARN interrumpiendo procesos vitales de las células [17,18].

Adicionalmente, los AMPs también son capaces de inhibir la síntesis de compuestos celulares como las proteínas. Este es el caso de los AMPs ricos en prolina que tiene la capacidad de interferir en la unión a los ribosomas. Un caso específico es el péptido

derivado de la Apidaecina Api137, cuyo mecanismo se centra en afectar los factores de liberación (RF1 o RF2) con la finalidad de liberar la cadena polipeptídica y por ende generar la finalización de la traducción [2,17].

1.1.3 Péptidos provenientes de la secreción cutánea de anuros

La piel de los anfibios se encuentra expuesta a una amplia variedad de patógenos por lo que depende directamente de la secreción cutánea para su defensa [19]. Esta secreción desempeña un rol crucial al producir biomoléculas con actividades antibacterianas y antifúngicas como los péptidos antimicrobianos [20]. Por esta razón la secreción cutánea se ha convertido en una de las fuentes de AMPs más abundantes y estudiadas con más de 1169 AMPs identificados en anfibios según la base de datos de péptidos antimicrobianos (APD) [21].

La secreción cutánea de los anfibios es secretada por las glándulas cutáneas que se encuentran dispersas homogéneamente en el cuerpo del animal y en partes localizadas como en el dorso o en la superficie ventral del animal [22,23]. En los anfibios existen varios tipos de glándulas cutáneas como son: las glándulas mucosas, granulares serosas y granulares venenosas [24]. Las glándulas mucosas son las encargadas de funciones como la respiración cutánea y termorregulación [23]. Las glándulas granulares serosas son las encargadas de secretar sustancias repelentes como los AMPs por medio de la estimulación adrenérgica de los alveolos granulares que se encuentran formados por células serosas y miocitos. Y las glándulas granulares venenosas son las encargadas de liberar biomoléculas como alcaloides venenosos [20,22,25].

Los péptidos antimicrobianos de anfibios se han clasificado en 40 a 100 familias de péptidos, según sus similitudes estructurales [22,26]. Entre algunas de las familias de AMPs descritos en anfibios se encuentran: dermaseptinas, dermatoxinas, filoseptinas y filoxinas [27]. Las dermaseptinas se caracterizan estructuralmente por el residuo de triptófano en la tercera posición del N terminal [19]. Estos AMPs tienen una alta actividad lítica contra bacterias, levaduras y protozoos. Las dermatoxinas a diferencia de las dermaseptinas presentan un residuo de glicina en lugar de triptófano, presentan un espectro de actividad contra Gram positivas y Gram negativas [27]. Las filoseptinas cuentan con una secuencia común FLSLI[L]P altamente conservadas en la región N-terminal, tienen un espectro de actividad contra bacterias, hongos y parásitos [28]. Por último, las filoxinas son altamente conservadas, solo exhiben una sustitución de un

residuo en la posición 17 y presentan actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [27,29].

1.1.4 Cruzioseptinas

En la especie *Cruziohyla calcarifer* se identificaron 17 péptidos antimicrobianos por Proaño-Bolaños en 2016, estos AMPs fueron clasificados como un nuevo grupo de péptidos llamados cruzioseptinas (CZS) por sus diferencias estructurales. Su región N-terminal contiene un motivo inicial de GFLD y en la región media del péptido maduro se encuentran secuencias como: –VALGAVSK– o –GKAAL (N/ G/S) (V/A) V [30].

Las cruzioseptinas (CZS) caracterizadas hasta el momento han presentado una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos con un porcentaje hemolítico bajo. Las CZS-1 y CZS-2 presentaron mayor actividad contra *Staphylococcus aureus* a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3,77 μ M y 6,59 μ M respectivamente con una actividad hemolítica del 1 al 6%. Además, CZS-1 también exhibió actividad contra la levadura *Candida albicans* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3,77 μ M. En cambio, CZS-3 presentó la misma concentración inhibitoria de 13,32 μ M contra *Escherichia coli*, *S. aureus* y *C. albicans* con un porcentaje de hemólisis del 6% [30]. Posteriormente, en 2021 se caracterizaron la cruzioseptinas 16 y 17 por Cuesta y colaboradores, las mismas presentaron actividad contra los mismos microorganismos antes mencionadas, pero a concentraciones más altas desde 27,5 μ M a 222,0 μ M y porcentaje de hemólisis desde 0,7 al 11,6% [31].

Adicionalmente en el 2020 se investigó la actividad antiparasitaria de las cruzioseptinas (CZS 1-3), las cuales presentaron una reducción de la carga parasitaria de forma dependiente de su concentración. Además, se evaluó el índice de selectividad para analizar la eficiencia y seguridad de cada cruzioseptina, el mismo que se calcula dividiendo la concentración efectiva media (CE₅₀) del parásito con la CE₅₀ de las células huésped. Como resultado se obtuvo que la cruzioseptina-1 (CSZ -1) fue el más activo y selectivo con un índice de 10 y CE₅₀ que oscilaba entre 9.17 y 74.82 μ M contra las formas intracelulares y extracelulares de *Leishmania spp* [32].

1.2 Planteamiento del problema

El abuso y mal uso de medicamentos como los antibióticos han potenciado la aparición de microorganismos multirresistentes, el mismo que es considerado como uno de los principales problemas de salud pública [33]. Además, estos medicamentos no solo son usados en el ámbito médico, sino también en áreas como la ganadería y la agricultura provocando la liberación de grandes cantidades de antibióticos al medio ambiente generando condiciones propicias para el desarrollo de microorganismo resistentes [34].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que se producen alrededor de 700 mil muertes cada año en el mundo debido a las infecciones bacterianas y se estima que para 2050 las muertes alcanzarían a los 10 millones de muertes por año [35]. Se han registrado más casos de resistencia microbiana que los de cáncer, cólera y diabetes, los mismos que generan una inversión del 2 al 3,5% del producto interno bruto de cada país [35]. Debido a su gran impacto, en el 2015 la OMS llevó a cabo un plan de acción global con el fin de concientizar y educar a la población para emplear de manera adecuada los antibióticos y así reducir la aparición de infecciones hospitalarias. En el 2017 la misma organización emitió un programa de vigilancia global de la Resistencia Antimicrobiana y además promovió el desarrollo e investigación de antibióticos [35,36].

Los microorganismos con prioridad crítica que causan infecciones con elevada morbilidad y mortalidad son *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Por medio de los datos del Sistema Mundial de Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos y de su Uso (GLASS), se ha reportado resistencia a antibióticos como la ciprofloxacina que oscilaba desde el 8,4 al 92,9% en *E. coli* y un 4,1 al 79,4% para *K. pneumoniae* [36]. Por otro lado, en Ecuador se ha reportado resistencia a los antibióticos como los carbapenémicos en *E. coli* de hasta 50% entre los años 2014 al 2017, para el caso de *P. aeruginosa* se reportó una resistencia de hasta el 30% y un 33 a 59% de resistencia a la cefoxitina en *S. aureus* [37].

En el caso de los microorganismos fúngicos a nivel mundial la organización mundial de la salud (OMS), desarrollo la primera lista de los patógenos fúngicos prioritarios (LPFP). Esta lista describe tres grupos de prioridad: críticos, alta y baja. En el grupo en estado crítico se encuentra *Candida auris* con un rango de resistente al fluconazol del 87 al 100%. En el del grupo de alta prioridad esta *C. tropicalis* con una resistencia a los azoles del 40 al 80%. Por último, en el grupo de prioridad media se encuentra *C. krusei* con

una resistencia baja a los azoles y equinocandinas del 0 al 5% [38]. En cambio, en Ecuador se ha calculado que el 3% de la población a sufrido por una infección fúngica, de las cuales la principal infección fúngica es la vaginitis recurrente por *Candida* que se ha presentado en el 6% de la población de mujeres de entre 15 a 50 años [39].

1.3 Justificación de la investigación

El aumento en la aparición de microorganismos multirresistentes y la escasez de nuevos antibióticos que facilitan su tratamiento se ha convertido en una amenaza global. La alta inversión de millones de dólares que conlleva el desarrollo y descubrimiento de nuevos antibióticos ha frenado por completo el interés de las farmacéuticas [27,40]. Una de las alternativas que se ha propuesto es implementar programas con el uso de fondos públicos para el desarrollo y descubrimiento de nuevos antibióticos como la Unión Europea (UE) a través de programas como: la Iniciativa para el desarrollo de medicamentos innovadores y la Iniciativa de acción conjunta sobre la resistencia antimicrobiana [40].

Es primordial incrementar la inversión en la identificación y caracterización de nuevas biomoléculas como los péptidos antimicrobianos para combatir no solo los microorganismos multirresistentes si no también dar una solución a largo plazo y salvar vidas disminuyendo la tasa de mortalidad para un futuro [6]. Los AMPs son idóneos por su mecanismo de acción el cual se basa en interacciones electrostáticas con la membrana plasmática del microorganismo provocando una desestabilización y por ende la generación de poros, provocan que las bacterias desarrollen poca o ninguna resistencia [41,42].

En este contexto el estudio de los péptidos cruzioseptinas es de alto interés debido a su amplio espectro de actividad contra microorganismo resistentes como bacterias, hongos y hasta parásitos con un porcentaje hemolítico bajo, lo que las convierte en biomoléculas sumamente importantes a ser estudiadas. Además, la falta de información acerca de las demás cruzioseptinas identificadas representa una oportunidad valiosa para ampliar el conocimiento de las características fisicoquímicas y funciones biológicas relacionadas a esta familia de péptidos antimicrobianos. [30,31].

1.4 Objetivos

1.4.3 General

- Caracterizar funcionalmente a las cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) considerando sus propiedades fisicoquímicas y cómo afectan a su mecanismo de acción y selectividad.

1.4.4 Específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana de dos cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) provenientes de la secreción cutánea de la rana espléndida *Cruziohyla calcarifer*.
- Evaluar la toxicidad de dos cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) en glóbulos rojos, provenientes de la secreción cutánea de la rana espléndida *Cruziohyla calcarifer*.
- Analizar la secuencia nucleotídica de CZS8 y peptídica de ambas cruzioseptinas CZS8 y CZS-13 empleando herramientas bioinformáticas.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Análisis bioinformáticos de las dos cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las dos cruzioseptinas (CZS 8 y CZS 13) fueron adquiridas mediante las plataformas Batchem Peptide Calculator y Peptide 2.0 Inc para el cálculo de la masa teórica [43,44]. La hidrofobicidad y momento hidrofóbico se determinó por medio de Heliquist y la predicción de la estructura secundaria se empleó el software SOPMA. Así mismo por medio del software Heliquist se obtuvo la rueda Helicoidal de ambos péptidos [45,46].

Además, ambas secuencias de cruzioseptinas fueron analizados por medio de la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) por medio de la herramienta como Blast/n (nucleótidos) y Blast/p (proteína) para posteriormente ser alineadas con la ayuda del software MEGA X [47,48].

2.2 Síntesis y evaluación de la pureza de los péptidos sintéticos por HPLC

Los péptidos CZS-8 (GFLDVIKHVGKAAGKAALNAVTEMVNQ-NH₂) y CZS -13 (GFLDVVHVGKAVGKAALNAVNDLVN-NH₂) fueron sintetizados en la Universidad Regional Amazónica IKIAM, mediante la técnica de síntesis en fase sólida con un grupo protector de Fmoc por medio de un sintetizador automático de péptidos (Liberty Blue 909410, CEM). Se utilizó una resina Fmoc Rink Amide (HL), en el caso de la desprotección de los grupos amidas se usó piperidina al 20% (v/v) y en el acoplamiento de aminoácidos se empleó 1.0 M de Oxima y 1.0 M de diisopropilcarbodiimida (DIC). Después de cada etapa de desprotección y acoplamiento se realizó un lavado con Dimetilformamida (DMF). Una vez finalizada la síntesis se procedió a la fase de clivaje en donde se separa la cadena peptídica de la resina con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) (92.5 %), triisopropil silano (TIPS) (2.5 %), 3,6-dioxa-1,8-octanediol (DODT) (2.5 %) y agua (2.5%). Luego, el péptido fue precipitado utilizando éter dietílico frío.

Posteriormente, la pureza del péptido sintético se analizó mediante cromatografía de alta eficiencia (HPLC). Para ello se disolvió 0.5 mg de péptido liofilizado en 500 µl de buffer A: H₂O/ácido trifluoroacético (TFA) (99.9%/0,1%, v/v) luego se filtró la muestra por

medio de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Se inyectó manualmente 80 µl al HPLC en fase reversa (Detector UV/Vis 2489, Bombas e inyector 2545). La separación se realizó por medio de una columna analítica (C18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm; Júpiter; USA), con un gradiente lineal de 10% -100% de Buffer B: Acetonitrilo (ACN) /ácido trifluoroacético (TFA) (99.9%/0,1, v/v) en 60 min a un flujo de 1 ml /min y la detección a una longitud de onda de 214 nm [30,49].

2.3 Purificación de los péptidos sintéticos por HPLC preparativa

Se disolvieron 10 mg de péptido sintético en 1 ml de buffer A: H₂O/ácido trifluoroacético (TFA) (99.9%/0.1%, v/v) luego se filtró la muestra por medio de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Se inyectaron manualmente 120 µl de sobrenadante al HPLC de fase reversa (Detector UV/Vis 2489, Bombas Binarias 1525). La purificación se la realizó por medio de una columna preparativa (C18; 10 mm x 250 mm; 5 µm; XBridge Peptide BEH), con un gradiente lineal de 10% a 100% de Buffer B: ACN/ácido trifluoroacético (TFA) (99.9%/0,1, v/v) en 70 min a un flujo de 1 ml /min y la detección a una longitud de onda de 214 nm. Las fracciones fueron recogidas de forma manual [30,49].

2.4 Análisis de las fracciones por MALDI-TOF MS

La masa molecular de cada péptido se evaluó por espectrometría de masa de ionización-desorción láser asistida por matriz y detección de tiempo de vuelo MALDI-TOF (Axima Confidence, Shimadzu), por medio de la matriz compuesta de ácido α-Cyano-4-hydroxycinnámico (CHCA) en dH₂O/acetonitrilo/TFA (50%/50%/0.1%, v/v) a una concentración de 10 mg/ml. En la placa de lectura se colocó 1 µl de matriz que se dejó secar al aire para luego agregar 1 µl de las fracciones recogidas anteriormente. La lectura se dio en las siguientes condiciones: modo reflectron a un rango de lectura de m/z de 1000 a 3000 Dalton (Da.) a una potencia de laser de 40 a 45 Watts con 200 Profiles y 2 Shots [30,49,50].

2.5 Ensayos antimicrobianos y hemolíticos de los péptidos purificados

2.5.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Se emplearon microorganismos como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 29213 y *K. pneumoniae* aislado clínico resistente a

carbapenémicos. Como primer paso se inocularon 50 o 100 µl de cada microorganismo crioconservado en 20 ml medio de cultivo Mueller Hinton (MHB) con agitación a una temperatura de 37°C por 24 horas. Posteriormente se transfirió 500 µl del cultivo anterior en un nuevo medio de MHB para incubar con agitación a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento 0,4; 0,26 y 0.18 DO (Densidad óptica). Cada subcultivo se diluyó con MHB estéril para obtener 1x10⁶ UFC/ml, se realizaron diluciones seriadas (1x10⁻¹, 1x10⁻², 1x10⁻³, 1x10⁻⁴), las mismas que fueron sembradas por triplicado para verificar la concentración de trabajo (1x10⁶ UFC/ml). Además, se prepararon diluciones seriadas del péptido (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 × 10²mg/L), para posteriormente distribuir 2µl de cada disolución en una placa de 96 pocillos con 198 µl de cultivo bacteriano. Además, se colocaron 200 µl medio de cultivo Mueller Hilton (MHB) estéril en una columna como blanco y en otra 2 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) con 198 µl de cultivo bacteriano como control negativo. El crecimiento de los microorganismos se observó por medio de la absorbancia a 560 nm un lector de microplacas (GloMax® Discover System, Promega) [30,49]. Se realizaron 7 réplicas por tratamiento y el experimento se repitió 3 veces.

2.5.2 Ensayo de hemólisis

La toxicidad de los péptidos en glóbulos rojos se evaluó a partir de 2 ml de sangre. Posteriormente los glóbulos rojos fueron diluidos con solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) a una concentración de 4% (v/v). Se realizaron diluciones seriadas del péptido con PBS 1X (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 × 10²mg/L). Como control positivo en lugar de péptido se colocaron 5 µl de triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) con 195 µl de PBS 1X y como control negativo se colocaron 200 µl de PBS 1X sin péptido. Se realizaron 5 réplicas de cada concentración y se incubaron a 37°C por 2 horas. Luego los tubos se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos, para posteriormente colocar 200 µl del sobrenadante en la placa de 96 pocillos. La lectura de la placa fue a una longitud de 560 nm y el porcentaje de hemólisis fue calculado con la siguiente fórmula [30,49].

$$\% \text{hemólisis} = \left[\frac{(A-AO)}{(AX-AO)} \right] \times 100$$

Donde:

A: lectura de las disoluciones del péptido

AO: Lectura del control negativo

AX: Lectura del control positivo

2.6 Cálculo del índice de selectividad.

El cálculo del índice de selectividad tiene como objetivo evaluar la seguridad del péptido en la fase preclínica. Se analizó la relación entre la toxicidad (hemólisis) y el efecto biológico (CIM)

Para el cálculo del índice de selectividad (IS) se empleó la siguiente fórmula:

$$IS: \frac{HC_{10}}{CIM_{90}}$$

Donde:

HC₁₀: Concentración del péptido que presenta el 10% de hemólisis

CIM₉₀ Concentración mínima del péptido que causa una inhibición del 90% de cada microorganismo en el que hubo actividad [51,52].

CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Análisis bioinformáticos de las dos cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.

3.1.1. *Propiedades fisicoquímicas y estructurales.*

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) fueron comparadas con las demás cruzioseptinas caracterizadas, como se detalla en la Tabla 3-1. Se observó que tanto CZS-8 y CZS-13 exhibieron masas moleculares más elevadas a comparación de las otras cruzioseptinas, alcanzando valores de 2779,5 (Da.) y 2817,4 (Da.), respectivamente. Además, ambas cruzioseptinas presentaron valores inferiores en cuanto a la hidrofobicidad y anfipaticidad en comparación a otras cruzioseptinas analizadas (ver Tabla 3-1). En cuanto a las cargas, CZS-8 es catiónico con carga +2 y CZS-13 exhibe la carga más baja de +1. Estructuralmente CZS-8 presentó estructura 100% hélice alfa y CZS-13 una combinación estructural entre cadena extendida y hélice alfa. Con respecto a la rueda helicoidal, CZS-8 a diferencia de CZS-13 tiene un residuo ácido adicional como la glutamina (Q), ambos presentan los mismos residuos básico y aromáticos. En cuanto a las caras hidrofóbicas, la composición es la siguiente: CZS-8: FAAIMAGLV y CZS-13: VVLAFVGVVL (Figura - 3-1).

Tabla 3-1: Propiedades fisicoquímicas de siete cruzioseptinas.

Péptido /Secuencia	Masa teórica <Da>	Hidrofobicidad <H>(aa%)	Momento hidrofóbico <μH>	Carga	α-Helice(%)	Referencias
CZS-8 G F L D V I K H V G K A A G K A A L N A V T E M V N Q a H	2779,51	0,342 (51,85)	0,342	(+2)	100	
CZS-13 G F L D V V H V G K A V G K A A L N A V N D L V N a C E E E E E E H H H H H H H H H H H H H H H H H	2518,4	0,410 (56)	0,379	(+1)	72	
CZS-1 G F L D I V K G V G K V A L G A V S K L F a T E E E E E H T E E E E H H H H H H H H H	2118,56	0,581(57,14)	0,472	(+3)	47,62	[30,31].
CZS-2 G F L D V I K H V G K A A L G V V T H L I N Q a T H H H H H H H T T H H H H H E E H H H H H T	2429,89	0,563(52,17)	0,464	(+2)	73,91	[30,31].
CZS-3 G F L D V V K H I G K A A L G A V T H L I N Q a T H T	2401,84	0,523(52,17)	0,441	(+2)	91,3	[30,31].
CZS-16 G F L D V L K G V G K A A L G A V T H L I N Q a T H H H H H H H C C H H H H H H H H H H H H T	2321,75	0,513 (52,17)	0,449	(+2)	82,61	[31].
CZS-17 G F L D V V K G V G K A A L G A V T H L I N Q a T H H H H H H H C C H H H H H H H H H H H H T	2307,69	0,492 (52,17)	0,429	(+2)	82,61	[31].

a:amidacion; H: Hélice Alfa; E: Cadena Extendida C:Bobina aleatoria; T:Giros β

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

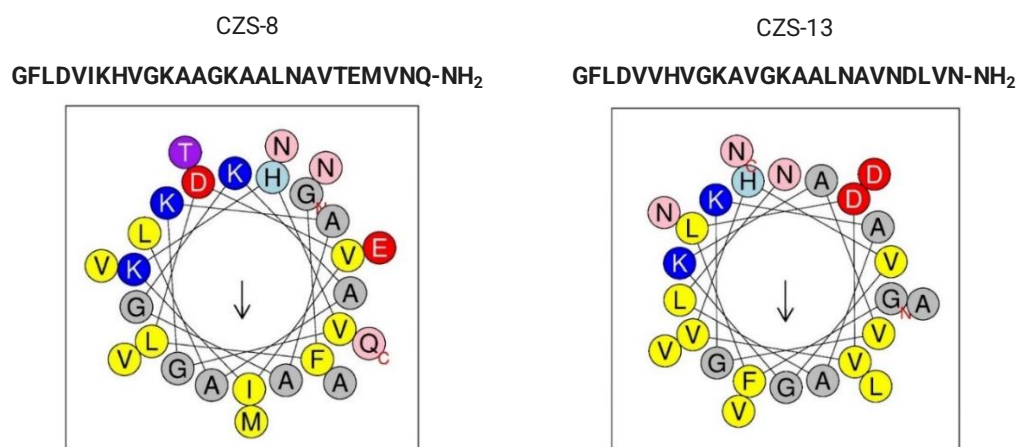


Figura 3-1: Ruedas helicoidales. Los residuos hidrofóbicos se representan con el color amarillo, residuos básicos color azul y los ácidos con rojo. La flecha representa la cara hidrofóbica.
Fuente: Heliquist

3.1.2. Análisis de la secuencia nucleotídica de CZS-8 y peptídica de CZS-8 y CZS-13

3.1.2.1 Secuencia nucleotídica de Cruzioseptina-8 (CZS-8).

La secuencia de CZS-8 compuesta de 344 nucleótidos (número de acceso: KX065085.1) fue analizada mediante la herramienta BLAST/N de la base de datos NCBI. Se encontraron similitudes con 65 secuencias, de las más relevantes fueron cruzioseptinas de la especie *Cruziohyla calcarifer* como CZS-11, CZS-2 y CZS-12 que contaban con un valor E de $2e^{-116}$ a $6e^{-151}$, cobertura de 79 al 96% e identidad del 90% al 96% (números de acceso: KX065087.1, KX065079.1 y KX065088.1). Seguidas de las Cruzioseptinas CZS-7 y CZS-6 las mismas que contaban con valor E de $6e^{-106}$ a $5e^{-107}$, cobertura del 97,06 al 96,65% e identidad del 69% (número de acceso: KX065084.1 y KX065083.1). Para evaluar los cambios nucleotídicos se realizó un alineamiento por medio del software MEGAX, resaltando las sustituciones sinónimas y no sinónimas como se muestra en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Comparación de la secuencia nucleotídica de la cruzioseptina-8 con otras cruzioseptinas de acuerdo al BLAST/n

[illegible]

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

3.1.2.2 Secuencias peptídicas de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.

Las secuencias peptídicas de CZS-8 con una extensión de 27 aminoácidos (número de acceso: A0A193H329.1 y CZS-13 con 25 aminoácidos (número de acceso: C0HK09.1) fueron analizadas por la plataforma Blast/p de la base de datos NCBI. Se obtuvieron un total de 100 secuencias para ambas secuencias peptídicas, de las cuales se seleccionaron las cruzioseptinas que concordaban entre ambas. Las secuencias fueron cruzioseptinas provenientes de la especie *Cruziohyla calcarifer* como CZS-11,12,7,5,6,9 números de acceso (A0A193H361.1, A0A193H397.1, A0A193H365.1, A0A193H356.1, A0A193H396.1, A0A193H327.1) con valores E de $8e^{-08}$ a $7e^{-16}$, cobertura del 100% e identidad del 76,92 al 96,15%. Las secuencias fueron alineadas con la ayuda del software MEGA X, resaltando las regiones variables como se muestra en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Análisis de la secuencia peptídica de cruzioseptina-8 y cruzioseptina-13 con otras cruzioseptinas de acuerdo al BLAST/p.

Alineamiento de las secuencias peptídicas de CZS-8 y CZS-13			
Péptido	#Acceso	Especie	
Cruzioseptin-8 (CZS-8)	A0A193H329.1	Cruziohyla calcarife	G F L D V I K H V G K A A G K A A L N A V T E M V N Q G E Q - -
Cruzioseptin-13 (CZS-13)	C0HK09.1	Cruziohyla calcarife	G F L D V V - H V G K A V G K A A L N A V N D L V N - - - -
Cruzioseptin-11 (CZS-11)	A0A193H361.1	Cruziohyla calcarife	 I V V N D L
Cruzioseptin-12 (CZS-12)	A0A193H397.1	Cruziohyla calcarife	 V V N D L
Cruzioseptin-7 (CZS-7)	A0A193H365.1	Cruziohyla calcarife	 V V N D L
Cruzioseptin-5 (CZS-5)	A0A193H356.1	Cruziohyla calcarife	 V N D K P Q S
Cruzioseptin-6 (CZS-6)	A0A193H396.1	Cruziohyla calcarife	 T V N A
Cruzioseptin-9 (CZS-9)	A0A193H327.1	Cruziohyla calcarife	 T V N

. Aminoácidos conservados ■ Regiones variables

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

3.2 Síntesis, purificación y análisis de masas mediante MALDI-TOF MS de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13.

3.2.1 Evaluación de la pureza de cruzioseptina-8 (CZS-8) sintético

Se obtuvieron alrededor de 80,2 mg de péptido CZS-8 sintético empleando la técnica de síntesis en fase sólida con una pureza del 39,75% (Figura 3-2A). La masa monoisotópica del péptido sintético CZS-8 $[M+H]^+$ = 2780,560 (Error: 12,947 ppm), la cual se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Figura 3-2B).

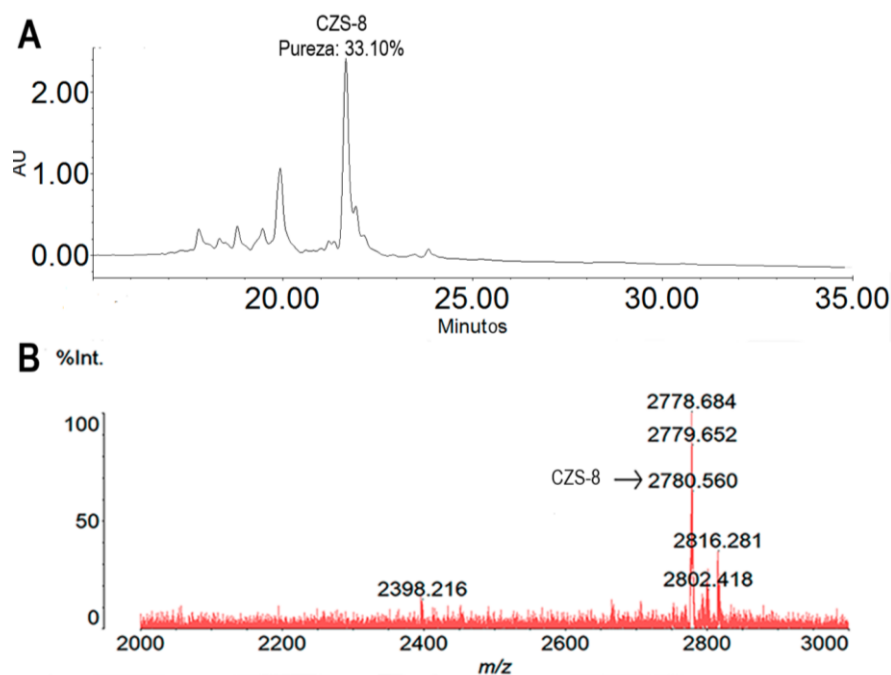


Figura 3-2: Síntesis de cruzioseptina-8 (CZS-8) (A). Cromatograma de CZS-8 sintético (B). Análisis de masas del péptido CZS-8 sintético mediante MADI-TOF MS ($[M+H^+]$ = 2780,560 Da).

3.2.2 Evaluación de la pureza de cruzioseptina-13 (CZS-13) sintético

Para el caso de cruzioseptina-13 se obtuvieron aproximadamente 96.5 mg de péptido sintetizado usando la técnica de síntesis en fase sólida con una pureza del 44.43% (Figura 3-3A) y masa monoisotópica $[M+H^+] = 2520,234$ (Error: -279,26 ppm) analizada por espectrometría de masa MALDI-TOF MS (Figura 3-3B).

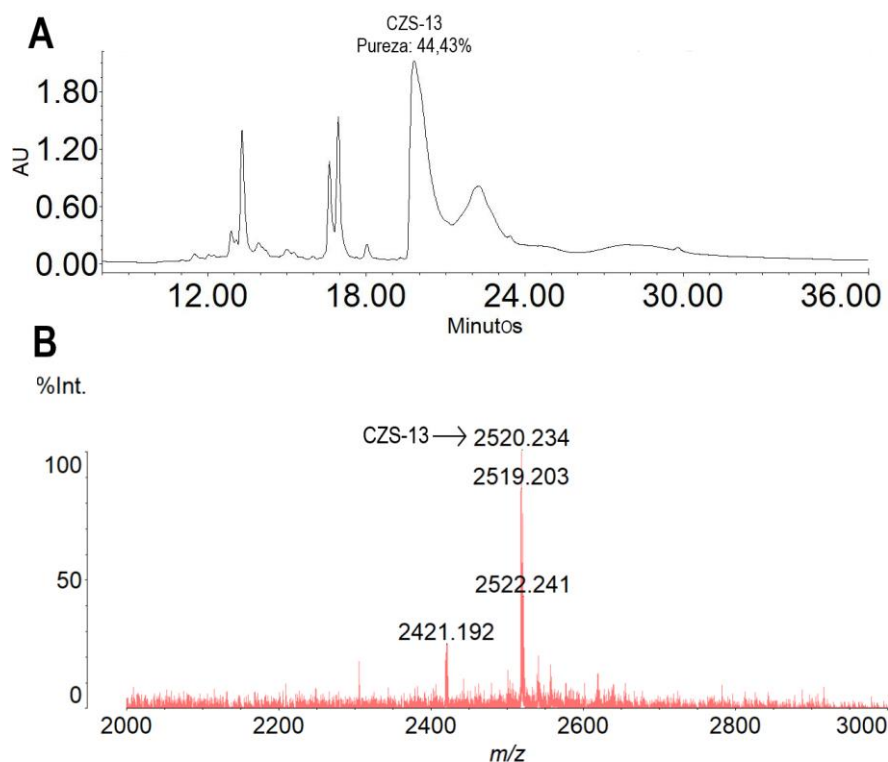


Figura 3-3: Síntesis de cruzioseptina-13 (CZS-13) **(A)**. Cromatograma CZS-13 sintético **(B)**. Análisis de masas del péptido CZS-13 sintético mediante MALDI-TOF MS ($[M+H]^+$ = 2520,234 Da).

3.3 Purificación de las cruzioseptinas CZS-8 y CSZ13 por medio HPLC preparativa y análisis de las fracciones por MALDI-TOF MS

3.3.1 Purificación de Cruzioseptina-8 (CZS-8)

Tras el proceso de purificación se logró obtener 10,1 mg de péptido CZS-8 con una pureza del 85,4% (Figura 3-4A). La masa monoisotópica del péptido CZS-8 puro $[M+H]^+$ = 2780,542 (Error: 6,473 ppm), fue determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Figura 3-4B)

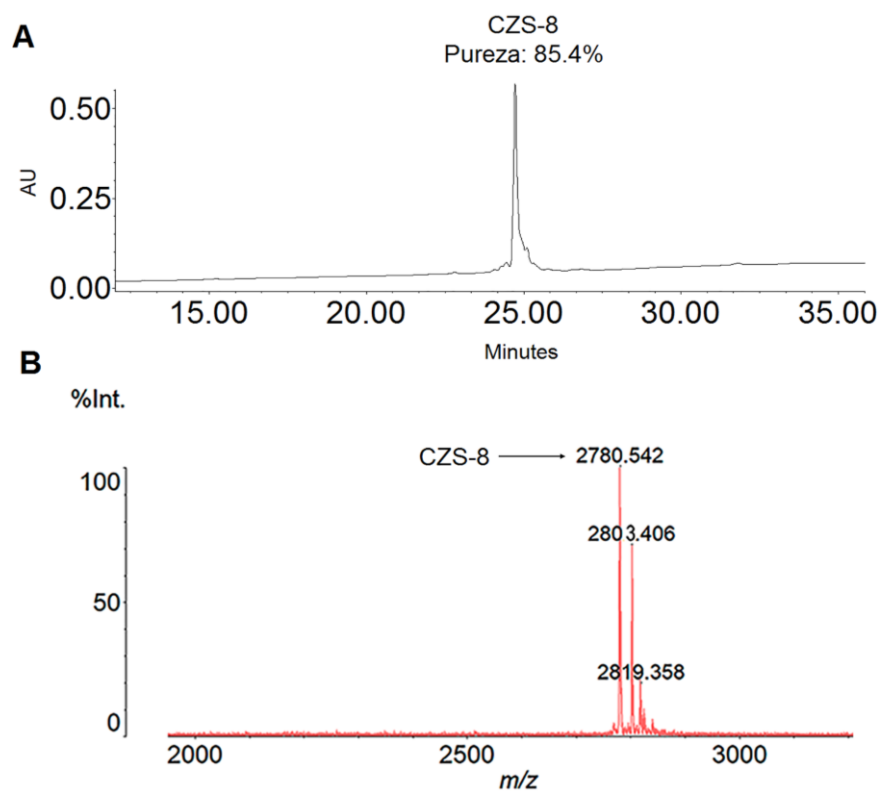


Figura 3-4: Purificación de cruzioseptina-8 (CZS-8) **(A)**. Cromatograma de CZS-8 purificado. **(B)**. Análisis de masas del péptido CZS-8 puro mediante MALDI TOF MS ($[M+H]^+$ = 2780,542 Da). La masa de 2803,406 Da que representa al aducto de Na^+ y 2819.358 Da la masa del aducto K^+ .

3.3.2 Purificación de Cruzioseptina-13 (CZS-13)

Con respecto a CZS-13 se obtuvo un total de 18,1 mg de CZS-13 con una pureza de 92.14 % (Figura 3-5A). Además, la masa monoisotópica del péptido CZS-13 puro $[M+H]^+$ = 2520,043 (Error: -355,026 ppm), fue analizada por espectrometría de masa MALDI-TOF MS (Figura 3-5B).

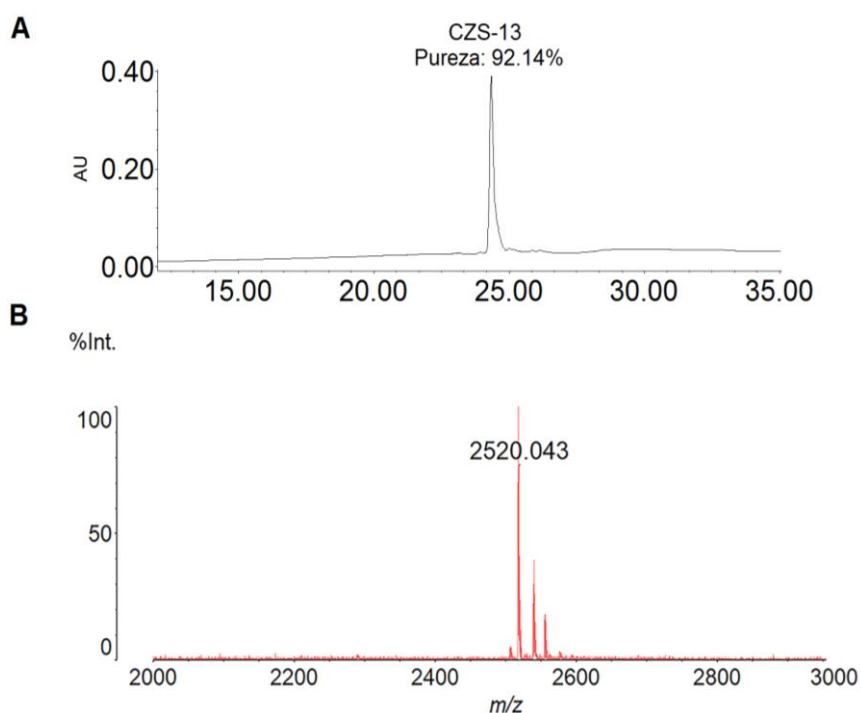


Figura 3-5: Purificación de cruzioseptina-13 (CZS-13) (A). Cromatograma de CZS-13 purificado. (B). Análisis de masas del péptido CZS-13 puro mediante MALDI-TOF MS ($[M+H^+]$ = 2520,043 Da).

3.4 Ensayos antimicrobianos y hemolíticos de los péptidos purificados

3.4.1 Cruzioseptina-8

El péptido cruzioseptina-8 (CZS-8) con una pureza de 85,4% presenta una concentración inhibitoria mínima de 11,51 μM contra *E. coli* y *K. pneumoniae* y contra *S. aureus* de 23,02 μM . Por otro lado, no se registró actividad contra *C. albicans* (Figura 3-6A). La concentración mínima bactericida (CMB) de CZS-8 fue > 184,20 μM para los tres microorganismos.

En cuanto a la actividad hemolítica de cruzioseptina-8 (CZS-8) presentó hemólisis en concentraciones > 23,02 μM en las que se presentó actividad antimicrobiana (Figura 3-7A).

3.4.2 Cruzioseptina-13

Con respecto a cruzioseptina-13 (CZS-13) con una pureza del 92,14% no presentó concentración mínima inhibitoria ni bactericida contra ninguno de los microorganismos probados, incluido a: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *C. albicans* (Figura 3-6B). Por otro parte, la cruzioseptina-13 (CZS-13) presentó actividad hemolítica en concentraciones > 25,40 μ M (Figura 3-7B).

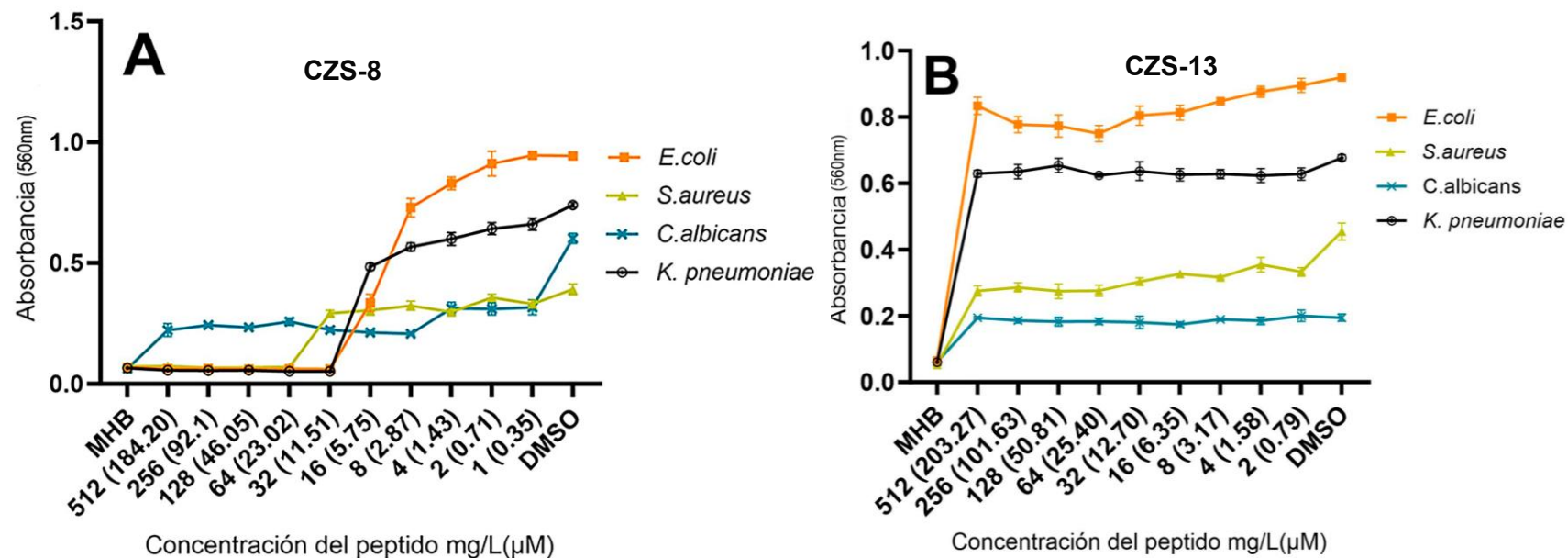


Figura 3-6: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de ambas cruzioseptinas contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *K. pneumoniae*; **A.** Cruzioseptina-8 (CZS-8) y **B.** Cruzioseptina-13 (CZS-13); Blanco: MHB y DMSO: Control negativo.
Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

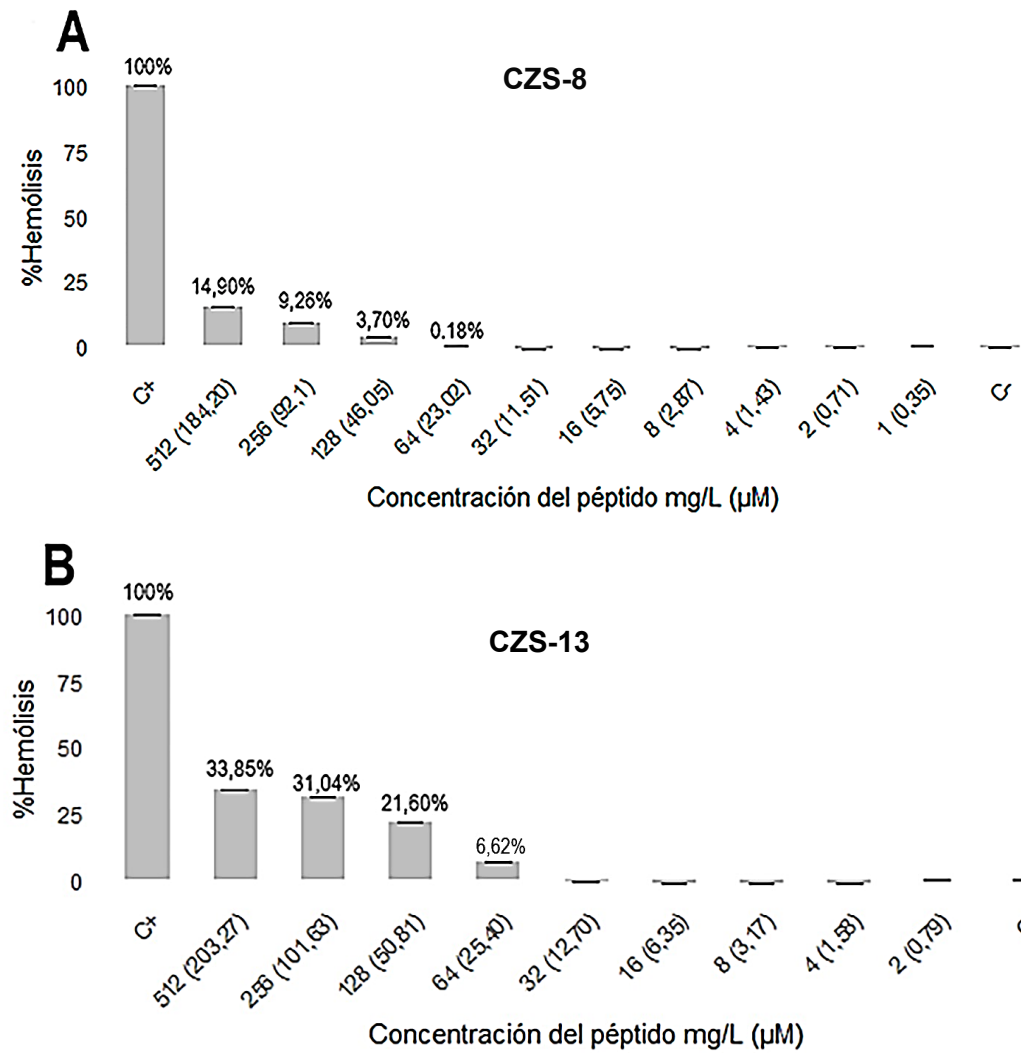


Figura 3-7: Actividad hemolítica de las dos cruzioseptinas. **A.** Cruzioseptina-8(CZS-8) y **B.** Cruzioseptina-13(CZS-13).

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

3.5 Índice de selectividad de los péptidos CZS-8 y CZS-13

Se realizó el cálculo del índice de selectividad para cada microorganismo de cruzioseptina-8 (CZS-8), por otro lado, para cruzioseptina-13 (CZS-13) como no presentó actividad no se hizo el cálculo del índice de selectividad.

Tabla 3-4: Índice de selectividad de CZS-8 y CZS-13 de cada microorganismo.

Péptido	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
CZS-8	11,45	11,45	5,72
CZS-13	S.A	S.A	S.A

S.A: Sin actividad

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de las secuencias de las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13

4.1.1 Secuencia nucleotídica CZS-8

Se analizaron las sustituciones sinónimas y no sinónimas de las secuencias de cruzioseptinas homólogas a CZS-8 (Tabla 3-2). Por un lado, las secuencias no sinónimas son aquellas que presentan un cambio dentro del marco de lectura que codifica a un aminoácido diferente, en cambio las sustituciones sinónimas son un cambio de lectura que codifica para el mismo aminoácido, por lo que se las considera mutaciones funcionalmente silenciosas y evolutivamente neutrales [53,54]. En este contexto, la alineación de la secuencia nucleotídica de la región del péptido señal y espaciador ácido, contiene menos sustituciones no sinónimas en comparación a la región del péptido maduro. En la que se registraron 2 sustituciones en CZS11, CZS-7 y CZS-6, 5 sustituciones en CZS-12 y 7 en CZS-2. Esto se puede explicar debido a que existe menos variabilidad en regiones funcionalmente restringidas, como es el péptido señal el cual se involucra específicamente en la translocación del péptido a través de la membrana celular y además se caracteriza por ser una región altamente conservada entre especies. Por otro lado, la variabilidad del péptido espaciador se debe a que mantiene al péptido bioactivo inactivo durante el almacenamiento [53,55].

En cambio, la variabilidad de las regiones que no están restringidas funcionalmente es mayor, es el caso de la región del péptido maduro, ya que no solo contribuye a la protección externa contra patógenos si no que también en procesos celulares como es la cicatrización de heridas y la proliferación de células como una respuesta inmune [26].

4.1.2 Secuencias peptídicas de CZS-8 y CZS-13

Se evaluaron las regiones variables dentro de las secuencias nucleotídicas que presentaban CZS-8 y CZS-13 a comparación de las demás cruzioseptinas (Tabla 3-3). Entre los residuos variables encontramos valina (V), leucina (L), asparagina (N), ácido aspártico (D), Lisina (K) y Alanina (A). Por un lado, la sustituciones con residuos como valina y leucina contribuyen al aumentó de la hidrofobicidad mejorando la actividad contra bacterias [56]. El reemplazo de leucina en lugar de residuos neutros apolares

como el triptófano puede llegar a mejorar la selectividad contra Gram negativas, pero resulta menos efectivo contra Gram positivas, esto se debe a que los anillos de la cadena lateral del triptófano son necesarios para la inserción del péptido en la membrana lipídica [57]. En cambio, aunque el residuo de valina genera mayor hidrofobicidad también puede influir en la estructura del péptido, ya que se ha comprobado que las sustituciones con este residuo disminuyen el contenido de hélice alfa [58,59]. Por otro lado, la sustitución repetida de residuos de alanina conduce a una disminución de la hidrofobicidad y por ende a una pérdida total de su actividad antimicrobiana [60]. Las sustituciones de residuos polares o hidrofílicos, como la asparagina (N) conducen a una disminución de la hidrofobicidad y anfipaticidad. Además, el ingreso de residuos negativos como el ácido aspártico (D) puede debilitar las interacciones electrostáticas a diferencia del reemplazo de residuos cargados positivamente como la lisina (K) que pueden mejorar la interacción con la membrana procariota y aumentar la actividad antimicrobiana [61,62].

4.2 Propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana

Las actividades antimicrobianas de los péptidos está directamente relacionada con sus propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad, carga, anfipaticidad y contenido de alfa hélice, por lo que un cambio de estos parámetros puede alterar significativamente el mecanismo de acción [4,14,63].

Como bien se sabe el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos se basa principalmente en interacciones electrostáticas entre el péptido y las membranas cargadas negativamente de la célula procariota [60]. Debido a que los péptidos catiónicos tienen la capacidad de acumularse en la superficie de la membrana y desestabilizarla según el modelo de alfombra [64]. Por lo que la cationicidad es una propiedad fisicoquímica de suma importancia como lo comprueba Jiang et al. (2008) el cual evaluó los efectos del aumento o disminución de la carga neta del péptido, lo que dio como resultado que el aumento de la carga puede mejorar la actividad antimicrobiana. Este es el caso de la cruzioseptina -1 (CZS-1) que exhibió una carga más elevada de +3 y por ende un mayor espectro de actividad contra bacterias o comparación de cruzioseptina -13 (CZS-13) con una carga disminuida de +1 no presentó actividad [61,65].

La hidrofobicidad es otro de los parámetros responsables de la actividad antimicrobiana como lo comprueba Chen y colaboradores (2007) cuyo estudio evaluó el efecto de la disminución y aumento de la hidrofobicidad. Sus resultados demostraron que el aumento de la hidrofobicidad en la cara no polar del péptido mejora la actividad antimicrobiana, pero además resalta que el aumento drástico de esta propiedad puede llevar a la pérdida de función, debido a la autoasociación peptídica que evita el ingreso a la pared celular procariota [60]. En este contexto, las cruzioseptinas (CZS-1,2,3) previamente caracterizadas por Proaño-Bolaños y colaboradores (2016), presenta una hidrofobicidad mayor a la cruzioseptina-8 y 13 (CZS-8 y CZS-13) y por lo tanto una mayor actividad. Sin embargo, en el caso de las cruzioseptinas (CZS-16 y CZS-17) caracterizadas por Cuesta y colaboradores (2021), aunque presentan mayor hidrofobicidad con respecto a la cruzioseptina-8 (CZS-8) su actividad es levemente menor en bacterias (Tabla 3-1) [30,31].

La selectividad bacteriana también se ve influenciada por la cationicidad e hidrofobicidad como lo menciona Wang et al. (2018) cuyo estudio evaluó como la composición de aminoácidos específicos alteran la cationicidad e hidrofobicidad, con la finalidad de generar un espectro de actividad más amplio para bacteria Gram positivas y Gram negativas. Se concluyó que los péptidos más activos contra bacterias Gram positivas presentan mayor porcentaje de contenido hidrofóbico y para las bacterias Gram negativas presentan mayor carga neta. [66]. Es el caso de cruzioseptina-8 (CZS-8) con una carga de +2 y un bajo contenido hidrofóbico de 51,85% a comparación de las otras cruzioseptinas, presenta mayor actividad contra *E. coli* y *K. pneumoniae* (Gram negativas) a una concentración de 11,52 μM , pero una menor actividad contra *S. aureus* a 23,02 μM (Gram positivas). Por otro lado, las cruzioseptinas 3 y 16 (CZS-3 y CZS-16) presentan la misma actividad para Gram positivas y negativas en concentraciones de 13,32 μM y 27,5 μM respectivamente, ambas tienen una carga de +2 y un contenido hidrofóbico de 52,14% (Tabla 4-5) [61].

Además se debe recalcar que la estructura secundaria del péptido también se ve influenciada por la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos y por los puentes salinos que se forman por los residuos cargados [67,62]. Como lo describe Chen et al. (2007), la disrupción de las membranas cargadas negativamente se basa en mecanismo de “alfombra” y aunque el contenido hidrofóbico sirve para la interacción de la interfaz desde el entorno acuoso de la membrana, son las interacciones electrostáticas las responsables de la lisis celular [62,63]. Por lo que en el caso de

cruzioseptina- 1 (CZS-1) con una carga de +3 presenta una mayor actividad contra *S. aureus* (Gram-positiva) a una concentración de 23,02 μM . Esto se debe principalmente a que la membrana del Gram positivas poseen un contenido de lípidos aniónicos [64]. Sin embargo, si esta interacción electrostática es insuficiente no se generará una aglomeración del péptido en la membrana y por ende no la atravesará como es el caso cruzioseptina 13 con una carga de +1 sin ninguna actividad, aunque sus propiedades hidrofóbicas sean suficientes [30,61,64].

Tabla 4-5: Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de las cruzioseptinas provenientes de *Cruziohyla calcarifer*.

Péptidos sintéticos	CIM μM (mg/L)				CBM μM (mg/L)				Referencias
	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	
CZS-8	11,52(32)	11,52(32)	23,02(64)	SA	184,2(>512)	184,2(>512)	184,2(>512)	184,2(>512)	
CZS-13	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	
CZS-1	15,11(32)	NA	3,77(8)	3,77(8)	15,11(32)	NA	7,56(32)	120,87(256)	[30].
CZS-2	26,35(64)	NA	6,59(16)	13,18(32)	26,35(64)	NA	26,35(64)	52,69(128)	[30].
CZS-3	13,32(32)	NA	13,32(32)	13,32(32)	26,66(64)	NA	53,31(128)	53,31(128)	[30].
CZS-16	27,5(64)	NA	27,5(64)	55,1(128)	220,6(>512)	NA	220,6(>512)	220,6(512)	[31].
CZS-17	55,5(128)	NA	111,0(256)	222,0(512)	222,0(>512)	NA	222,0(>512)	222,0(>512)	[31].

SA: sin actividad; NA: no disponible

Realizado por: Montesdeoca Emily, 2024

En el caso de la actividad antifúngica las cruzioseptinas CZS-8 y CZS-13 no presentaron actividad contra *C. albicans*. Esto se debe principalmente a la composición de la membrana del hongo que está constituida de fosfolípidos como el ergosterol, el cual le confiere rigidez y provoca que la inserción del péptido se vea afectada [64,68].

4.3 Actividad hemolítica e Índice de selectividad.

Se sabe que los péptidos antimicrobianos tienen la capacidad de interactuar con diferentes membranas celulares, incluyendo a las membranas de los glóbulos rojos. Por lo que es de suma importancia evaluar cual es la actividad hemolítica con la finalidad de comprender sus efectos en células humanas. En la actualidad se busca diseñar péptidos que tengan un amplio rango contra diferentes microorganismos, pero sin tener un impacto tóxico en células del hospedero [42,69].

La cruzioseptina-8 (CZS-8) exhibió actividad contra bacterias Gram negativas hasta la concentración de 11,51 μM sin presentar hemólisis a dicha concentración. En contraste, cruzioseptina-13 (CZS-13) no presentó actividad antibacteriana, pero sí una hemólisis del 6,62% en la concentración de 25,40 μM . Esto se podría explicar mediante sus propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad, ya que se ha reportado que el aumento de esta propiedad puede generar una mayor actividad hemolítica. Este

fenómeno es evidente en el caso de cruzioseptina-13 (CZS-13), el cual presenta una elevación mínima de hidrofobicidad de 0,41 a comparación de cruzioseptina-8 (CZS-8) [70].

Se ha observado que la hidrofobicidad presenta dos umbrales distintos. Uno de ellos sugiere que un aumento moderado puede mejorar la actividad antimicrobiana sin provocar hemólisis aparente. El segundo umbral indica que un incremento excesivo en esta propiedad puede afectar negativamente la actividad antimicrobiana y ocasionar una toxicidad en los glóbulos rojos [60,64]. Por lo que existe un rango de hidrofobicidad que favorece a ambas actividades, dichos umbrales que limitan este rango no están identificados cuantitativamente ya que varían dependiendo de la escala de hidrofobicidad empleada en cada estudio [58,64]. En el caso de las cruzioseptinas (CZS-1,2,3) con una escala de hidrofobicidad de 0,51 a 0,58 mayores a comparación de otras cruzioseptinas, presentaron actividad hemolítica de 1 a 54% en concentraciones de 8 a 64 mg/L en las que se reportaron actividad. Además, exhibieron un espectro de actividad más amplio a comparación de CZS-8 y CZS-13 contra una diversidad de microorganismos como *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* [30].

La afinidad de los péptidos antimicrobianos hacia un tipo específico de células se ve influenciada directamente por la composición de la membrana celular. A diferencia de la membrana cargada negativamente de las bacterias, los glóbulos rojos por su composición de fosfatidilcolina (PC), esfingomielina y colesterol los cuales le confieren una carga neutra [71]. Por lo que la interacción electrostática debería ser menos importante en el mecanismo de acción en este tipo de células a comparación de sus interacciones hidrofóbicas [72,73]. Según lo mencionado por Chen et al. (2007) el cual ha reportado que los péptidos emplean un mecanismo de modo barril frente a membranas zwitterionicas (neutras) a través de interacciones hidrofóbicas que inducen la formación de poros [60].

En este contexto, es de suma importancia entender el comportamiento de estas moléculas anfipáticas en un medio acuoso y como las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas son capaces de interactuar con la célula diana. Este comportamiento anfipático está relacionado directamente con el momento hidrofóbico, el mismo que describe la distribución de las regiones hidrofílicas que se agrupan estructuralmente en la hélice alfa [64,70]. En la investigación de Travkova et al. (2017) menciona que el incremento del momento hidrofóbico da como resultado mayor actividad hemolítica [74].

Es el caso de las cruzioseptinas (CZS-1,2,3), que con un mayor momento hidrofóbico llegaron a inducir hasta un 100% de hemólisis en las concentraciones más altas a comparación de cruzioseptinas 8 y 13 que poseen un menor momento hidrofóbico, se observó solo un 14,90 y 33,85% de hemólisis respectivamente en las mismas concentraciones [30].

Con respecto al índice de selectividad (IS) se sabe que cuanto mayor sea el IS más seguro será a nivel clínico [51]. Este índice de selectividad es una manera cuantitativa para evaluar la eficiencia y la seguridad de muchos fármacos ya que con un perfil equilibrado pueden ser candidatos para estudios clínicos [75]. La cruzioseptina-8 (CZS-8) presentó un IS de 11,45 para Gram negativas y un menor IS de 5,75 para Gram positivas, por lo que CZS-8 es mucho más seguro y eficaz contra Gram negativas, debido a su bajo porcentaje de hemólisis y su actividad significativa [31].

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones y recomendaciones

En el siguiente trabajo se logró analizar la secuencia nucleotídica de la cruziospetina-8 (CZS-8) y peptídica de ambas cruzioseptinas (CZS-8 y CZS-13) comparándola con las demás cruzioseptinas reportadas. Por un lado, en la secuencia nucleotídica se identificó las regiones conservadas y variables por medio del análisis de las sustituciones sinónimas y no sinónimas, y aunque ambas provocan un cambio de lectura son las sustituciones no sinónimas que codifican a un residuo diferente. Estos cambios dependen directamente de las necesidades evolutivas y funcionales. En cuanto a las secuencias peptídicas se encontraron múltiples residuos que varían en la región del péptido maduro de las cruzioseptinas. Estos cambios de residuos pueden alterar las propiedades fisicoquímicas y estructurales afectando la actividad y selectividad antimicrobiana.

En cuanto a la actividad antimicrobiana la cruzioseptina-8 (CZS-8) se encontró que una mayor actividad contra *E. coli* y *K. pneumoniae* (Gram negativas) a una concentración de 11,52 μM sin presentar hemólisis a dicha concentración y una menor actividad contra *S. aureus* a 23,02 μM (Gram positivas) con una hemólisis de 0.18%. Esta selectividad se debe principalmente a sus propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad y cationicidad, ambas propiedades combinadas son de suma importancia en la interacción electrostática e hidrofóbica con la célula diana.

Por otro lado, la cruzioseptina-13 no presentó actividad para ninguna de las bacterias analizadas: *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, sin embargo, presentó actividad hemolítica desde 6.62% hasta 33.85 % en concentraciones 25,40 μM y 203.27 μM respectivamente. Cruzioseptina-13 (CZS-13) fue más hemolítica que cruzioseptina-8 (CZS-8) debido principalmente a que CZS-13 es más hidrofóbico, ya que se ha evidenciado que la hidrofobicidad juega un rol más relevante en la interacción con la membrana de los eritrocitos.

En un futuro se recomienda estudiar el desarrollo de análogos por medio del reemplazo de diferentes residuos de aminoácidos que pueden mejorar las propiedades funcionales, con la finalidad de potenciar la actividad de cruzioseptina-8 pero sin aumentar su actividad hemolítica. Por otro lado, se podría explorar la sinergia con otros medicamentos con la finalidad de evaluar la actividad y espectro antimicrobiano de cruzioseptina-13. Además, se debería de evaluar otras posibles actividades, ya que como se ha mencionado estas biomoléculas no solo pueden tener actividad contra microorganismos, sino que también tiene la capacidad de intervenir en procesos celulares más complejos como es la señalización celular.

6. Referencias

1. Kang H-K, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol.* 2017;55: 1–12. doi:10.1007/s12275-017-6452-1
2. Zhang Q-Y, Yan Z-B, Meng Y-M, Hong X-Y, Shao G, Ma J-J, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research.* 2021;8: 48. doi:10.1186/s40779-021-00343-2
3. Lorenzon EN, Piccoli JP, Santos-Filho NA, Cilli EM. Dimerization of Antimicrobial Peptides: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Peptide Activity. *Protein and Peptide Letters.* 2019;26: 98. doi:10.2174/0929866526666190102125304
4. Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides : issues for potential clinical use. *BioDrugs.* 2003;17: 233–240. doi:10.2165/00063030-200317040-00002
5. Govindarajan DK, Kandaswamy K. Antimicrobial peptides: A small molecule for sustainable healthcare applications. *Medicine in Microecology.* 2023;18: 100090. doi:10.1016/j.medmic.2023.100090
6. Collado, Victorio, Porras, Rebeca, Cutuli Teresa, Gómez Lucia. EL SISTEMA INMUNE INNATO I: SUS MECANISMOS. *RCCV.* 2008;2: 1–16.
7. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet.* 1997;349: 418–422. doi:10.1016/S0140-6736(97)80051-7
8. Bienvenido a la base de datos Dramp. [cited 2 Jan 2024]. Available: <http://dramp.cpu-bioinform.org/>
9. Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5: 241. doi:10.3389/fmicb.2014.00241
10. Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins.* 2018;10: 461. doi:10.3390/toxins10110461
11. Li J, Hu S, Jian W, Xie C, Yang X. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Bot Stud.* 2021;62: 5. doi:10.1186/s40529-021-00312-x
12. Wang G. Bioinformatic Analysis of 1000 Amphibian Antimicrobial Peptides Uncovers Multiple Length-Dependent Correlations for Peptide Design and Prediction. *Antibiotics.* 2020;9: 491. doi:10.3390/antibiotics9080491
13. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 2020;11: 582779. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
14. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett.* 2020;27: 4–16. doi:10.2174/0929866526666190822165812
15. Li S, Wang Y, Xue Z, Jia Y, Li R, He C, et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology.* 2021;109: 103–115. doi:10.1016/j.tifs.2021.01.005
16. Corrêa JAF, Evangelista AG, Nazareth T de M, Luciano FB. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia.* 2019;8: 100494. doi:10.1016/j.mtla.2019.100494
17. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules.* 2018;8: 4. doi:10.3390/biom8010004

18. Cho JH, Sung BH, Kim SC. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009;1788: 1564–1569. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.025
19. Chen X, Liu S, Fang J, Zheng S, Wang Z, Jiao Y, et al. Peptides Isolated from Amphibian Skin Secretions with Emphasis on Antimicrobial Peptides. *Toxins (Basel)*. 2022;14: 722. doi:10.3390/toxins14100722
20. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009;1788: 1556–1563. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.018
21. Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 2004;32: D590-592. doi:10.1093/nar/gkh025
22. Varga JFA, Bui-Marinós MP, Katzenback BA. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. *Frontiers in Immunology*. 2019;9. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03128>
23. Antoniazzi MM, Mailho-Fontana PL, Nomura F, Azevedo HB, Pimenta DC, Sciani JM, et al. Reproductive behaviour, cutaneous morphology, and skin secretion analysis in the anuran *Dermatonotus muelleri*. *iScience*. 2022;25: 104073. doi:10.1016/j.isci.2022.104073
24. Brunetti AE, Hermida GN, Iurman MG, Faivovich J. Odorous secretions in anurans: morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Anat*. 2016;228: 430–442. doi:10.1111/joa.12413
25. Toledo RC, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1995;111: 1–29. doi:10.1016/0300-9629(95)98515-I
26. Rollins-Smith LA. The importance of antimicrobial peptides (AMPs) in amphibian skin defense. *Dev Comp Immunol*. 2023;142: 104657. doi:10.1016/j.dci.2023.104657
27. Azevedo Calderon L de, Silva A de AE, Ciancaglini P, Stábeli RG. Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*. 2011;40: 29–49. doi:10.1007/s00726-010-0622-3
28. 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. *Regulatory Peptides*. 2005;129: 103–108. doi:10.1016/j.regpep.2005.01.017
29. Pierre TN, Seon AA, Amiche M, Nicolas P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267: 370–378. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01012.x
30. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, 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: 1–13. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.017
31. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquinga F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53: 853–868. doi:10.1007/s00726-021-02986-w
32. Mendes B, Proaño-Bolaños C, Gadelha FR, Almeida JR, Miguel DC. Cruzioseptins, antibacterial peptides from *Cruziohyla calcarifer* skin, as promising leishmanicidal agents. *Pathogens and Disease*. 2020;78: ftaa053. doi:10.1093/femspd/ftaa053
33. Torrades S. Uso y abuso de los antibióticos. *Offarm*. 2001;20: 82–93.
34. González Mendoza J, Maguiña Vargas C, González Ponce F de M. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*. 2019;36: 145–151.

35. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Rayo Morfin-Otero M del, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD, Giono-Cerezo S, et al. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*. 2020;156: 172–180. doi:10.24875/gmm.20005624
36. OMS. Resistencia a los antimicrobianos. In: Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [cited 22 Dec 2023]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
35. Ministerio de salud pública del Ecuador. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. Ecuador. Ministerio de Salud; 2019
38. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. [cited 31 Jan 2024]. Available: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240060241>
39. Zurita J, Denning DW, Paz-Y-Miño A, Solís MB, Arias LM. Serious fungal infections in Ecuador. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36: 975–981. doi:10.1007/s10096-017-2928-5
40. Medina ÁM. La resistencia a los antibióticos y la falta de interés de la industria farmacéutica. *Infectio*. 2014; 35–36.
41. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6: 1543–1575. doi:10.3390/ph6121543
42. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res*. 2019;11: 3919–3931.
43. Bachem Products | Peptides. [cited 22 Dec 2023]. Available: <https://shop.bachem.com/catalog/all-products/peptides/>
44. Peptide Mass Calculator v3.2. [cited 22 Dec 2023]. Available: <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>
45. HeliQuest ComputParam form version3. [cited 22 Dec 2023]. Available: <https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>
46. NPS@ : SOPMA secondary structure prediction. [cited 22 Dec 2023]. Available: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html
44. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549. 2018 [cited 2 Jan 2024]. Available: <https://www.megasoftware.net/>
48. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. [cited 22 Dec 2023]. Available: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
49. Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi treefrog, *Boana picturata*. *Journal of Proteomics*. 2022;264: 104633. doi:10.1016/j.jprot.2022.104633
50. Chaurand P, Luetzenkirchen F, Spengler B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999;10: 91–103. doi:10.1016/S1044-0305(98)00145-7
51. Tamargo J, Le Heuzey J-Y, Mabo P. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71: 549–567. doi:10.1007/s00228-015-1832-0
52. Casanova M, Maresca M, Poncin I, Point V, Olleik H, Boidin-Wichlacz C, et al. Promising antibacterial efficacy of arenicin peptides against the emerging opportunistic pathogen *Mycobacterium abscessus*. *J Biomed Sci*. 2024;31: 18. doi:10.1186/s12929-024-01007-8

53. Choudhuri S. Chapter 2 - Fundamentals of Molecular Evolution**The opinions expressed in this chapter are the author's own and they do not necessarily reflect the opinions of the FDA, the DHHS, or the Federal Government. In: Choudhuri S, editor. *Bioinformatics for Beginners*. Oxford: Academic Press; 2014. pp. 27–53. doi:10.1016/B978-0-12-410471-6.00002-5

54. Chu D, Wei L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer*. 2019;19: 359. doi:10.1186/s12885-019-5572-x

55. König E, Bininda-Emonds ORP, Shaw C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*. 2015;63: 96–117. doi:10.1016/j.peptides.2014.11.003

56. Tan J, Huang J, Huang Y, Chen Y. Effects of Single Amino Acid Substitution on the Biophysical Properties and Biological Activities of an Amphipathic α -Helical Antibacterial Peptide Against Gram-Negative Bacteria. *Molecules*. 2014;19: 10803. doi:10.3390/molecules190810803

57. Gopal R, Park S-C, Ha K-J, Cho SJ, Kim SW, Song PI, et al. Effect of Leucine and Lysine substitution on the antimicrobial activity and evaluation of the mechanism of the HPA3NT3 analog peptide. *Journal of Peptide Science*. 2009;15: 589–594. doi:10.1002/psc.1155

58. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep*. 2020;10: 13206. doi:10.1038/s41598-020-69995-9

59. Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, Hancock REW. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat Biotechnol*. 2005;23: 1008–1012. doi:10.1038/nbt1113

60. Chen Y, Guarnieri M, Vasil AI. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides | *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007 [cited 30 Nov 2023]. Available: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00925-06#T1>

61. Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2008;90: 369–383. doi:10.1002/bip.20911

62. Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280: 12316–12329. doi:10.1074/jbc.M413406200

63. Huang Y, Huang J, Chen Y. α -helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. 2010;1: 143–152. doi:10.1007/s13238-010-0004-3

64. Bobone S, Stella L. Selectivity of Antimicrobial Peptides: A Complex Interplay of Multiple Equilibria. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1117: 175–214. doi:10.1007/978-981-13-3588-4_11

65. Islam MdM, Asif F, Zaman SU, Arnab MdKH, Rahman MdM, Hasan M. Effect of charge on the antimicrobial activity of α -helical amphibian antimicrobial peptide. *Current Research in Microbial Sciences*. 2023;4: 100182. doi:10.1016/j.crmicr.2023.100182

66. Wang X, Mishra B, Lushnikova T, Narayana JL, Wang G. Amino Acid Composition Determines Peptide Activity Spectrum and Hot-Spot-Based Design of Mercidin. *Adv Biosyst*. 2018;2: 1700259. doi:10.1002/adbi.201700259

67. Chen Y, Mant CT, Hodges RS. Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic α -helix. *J Pept Res*. 2002;59: 18–33. doi:10.1046/j.1397-002x.2001.10994.x

68. Rella A, Farnoud AM, Del Poeta M. Plasma Membrane Lipids and Their Role in Fungal Virulence. *Prog Lipid Res*. 2016;61: 63–72. doi:10.1016/j.plipres.2015.11.003

70. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane

interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;141: 528–536. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.003

71. Gidalevitz D, Ishitsuka Y, Muresan AS, Konovalov O, Waring AJ, Lehrer RI, et al. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 6302–6307. doi:10.1073/pnas.0934731100

72. Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters*. 1997;403: 208–212. doi:10.1016/S0014-5793(97)00055-0

73. Epand RF, Schmitt MA, Gellman SH, Epand RM. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758: 1343–1350. doi:10.1016/j.bbamem.2006.01.018

74. Travkova OG, Moehwald H, Brezesinski G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;247: 521–532. doi:10.1016/j.cis.2017.06.001

75. Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11: 751–761. doi:10.1038/nrd3801