



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

Tesis de pregrado

***Ocurrencia de actividad antimicrobiana en la secreción de la
piel de Callimedusa ecuatoriana y caracterización
estructural del péptido Ikiam 2599***

Stefanny Michelle Bonilla Jiménez

26 de marzo de 2021, Ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 26 de marzo de 2021

Yo, Stefanny Michelle Bonilla Jiménez con documento de identidad N° 1207086305, 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.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Stefanny Michelle Bonilla Jiménez

INVESTIGACIÓN | Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía a Alto Tena
INNOVACIÓN | Tena - Napo - Ecuador
EDUCACIÓN | Telf.: (06) 370 0040 - (06) 299 9160

www.ikiam.edu.ec

 @u_ikiam  IkiamOficial  u_ikiam  Universidad Ikiam

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Ocurrencia de actividad antimicrobiana en la secreción de la piel de *Callimedusa ecuatoriana* y caracterización estructural del nuevo péptido cutáneo Ikiam 2599”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Stefanny Michelle Bonilla Jiménez, 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, 26 de marzo de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
CAROLINA DEL
CARMEN PROANO
BOLANOS

.....

Carolina Proaño Bolaños

C.I.:1714818760

Agradecimientos

Para mí, es muy satisfactorio haber tenido la oportunidad de formarme en medio de la Amazonía ecuatoriana. El obtener mi grado académico en Ingeniería en Biotecnología en una universidad en pleno crecimiento, que será una de las mejores del país, la Universidad Regional Amazónica Ikiám me llena de orgullo. Primero, un enorme agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Carolina Proaño, por el continuo acompañamiento y supervisión de mi tesis (desde el planteamiento del tema hasta el desarrollo final de este trabajo de investigación).

Además, agradezco a los miembros del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Ikiám, Andrea Carrera y del laboratorio de Productos Naturales de Ikiám, Joel Medina por ser los profesionales más colaborativos en cuanto a asesoramiento en investigación. En especial, al equipo PARG, Giovanna Morán, Nina Espinosa de los Monteros y Renato Naranjo, por la paciencia y apoyo constante en todo el año de investigación.

A mis amigos de laboratorio, María Augusta Navarrete y Fernando Valdivieso, que se convirtieron en una nueva familia. Gracias por hacer que los días de laboratorio sean divertidos y enriquecedores.

Agradezco el financiamiento de esta tesis de investigación al Proyecto de conservación de Anfibios y sus Recursos Genéticos PARG, que en conjunto con la Universidad Regional Amazónica Ikiám permitieron el término a satisfacción mi trabajo de integración curricular.

Finalmente, mi mayor agradecimiento a las personas que han sido mi fuerza emocional en todo este proceso, mi familia y Andrés Astudillo. Muchas gracias por ser soporte e inspiración.

Dedicatoria

*A mi familia, Grimanesa, William, Mila y Jim,
mi mayor fuente de vida y apoyo,
quienes me inspiran a seguir mis sueños y objetivos.*

ÍNDICE GENERAL

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
Aprobación del tribunal	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Péptidos de la secreciones cutáneas de anfibios	1
1.1.2 Péptidos antimicrobianos: estructura y función	3
1.1.3 Péptidos en Phyllomedusidae y su potencial biomédico	5
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación de la investigación	8
1.3.1 Recursos Genéticos en Ecuador: <i>Callimedusa ecuatoriana</i>	8
1.4 Objetivos de investigación	10
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	11
2.1 Extracción de la secreción cutánea de <i>Callimedusa ecuatoriana</i>	11
2.2 Caracterización de la actividad antimicrobiana de las fracciones de la secreción cutánea	11
2.2.1 Fraccionamiento de la secreción cutánea mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	11

2.2.2	Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC de la secreción cutánea	12
2.2.3	Análisis de las fracciones de RP-HPLC por MALDI-TOF MS	13
2.3	Clonación molecular del precursor del péptido antimicrobiano derivado de la librería de ADNc de la secreción cutánea de <i>Callimedusa ecuatoriana</i>	13
2.3.1	Extracción de ARNm de la secreción	13
2.3.2	Construcción de librería de ADNc	14
2.3.4	Visualización de productos de PCR por electroforesis	17
2.3.5	Purificación de productos de RACE PCR	18
2.3.6	Ligación de productos de RACE PCR con vector PGEM-T easy	19
2.3.7	Transformación bacteriana	20
2.3.8	Selección de colonias transformadas	20
2.3.9	Aislamiento del ADN recombinante	20
2.3.10	Amplificación de ADN recombinante mediante PCR	21
2.3.11	Visualización por electroforesis de productos de Cloning PCR	22
2.4	Secuenciación	22
2.5	Análisis bioinformáticos de las secuencias	23
2.6	Síntesis de péptido en fase sólida (SPPS)	24
2.7	Ensayos antimicrobianos: Determinación de la concentración inhibitoria mínima	24
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS		26
3.1	Caracterización de la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea	26
3.2	Identificación y caracterización estructural de péptidos de la secreción cutánea de <i>C. ecuatoriana</i> .	27
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN		39
4.1	Primer estudio antimicrobiano en las secreciones de la piel de <i>Callimedusa ecuatoriana</i>	39

4.2	Hallazgo de un nuevo péptido Ikiam 2599 y Phylloseptina-TO8 en <i>C. ecuatoriana</i>	41
4.3	Perspectivas futuras del estudio	44
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
	REFERENCIAS	47
	ANEXOS	53

Índice de tablas

Tabla 1. Máster mix de retro transcripción: Construcción de la librería de ADNc.....	14
Tabla 2. Máster mix para RACE PCR.	15
Tabla 3. Primers empleados en RACE PCR de péptidos en las librerías de ADNc.	16
Tabla 4. Método de PCR en termociclador para 3' RACE PCR.....	17
Tabla 5. Máster mix de ligación con el sistema pGEM-T Easy Vector.....	19
Tabla 6. Máster mix de Cloning PCR de plásmidos recombinantes.	21
Tabla 7. Método de PCR en termociclador para Cloning PCR.....	22
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de las fracciones de HPLC de la secreción cutánea de <i>C. ecuatoriana</i>	28
Tabla 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del nuevo péptido Ikiam 2599 y los tres miembros de la familia Picturina descrita en <i>Boana picturata</i>	31
Tabla 10. Alineamiento múltiple del péptido maduro del nuevo péptido Ikiam 2599 con los péptidos de la familia Picturina.	32
Tabla 11. Propiedades físico-químicas del nuevo péptido de la secreción de <i>C. ecuatoriana</i> y las Picturinas relacionadas.....	33
Tabla 12. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de Phylloseptinas.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Múltiples funciones de los péptidos bioactivos en la piel de los anfibios.	2
Figura 2. Espécimen de <i>Callimedusa ecuatoriana</i> (a). Mapa de distribución potencial de hábitat para <i>C. ecuatoriana</i> (b)..	9
Figura 3. Cromatograma de HPLC en fase reversa de la secreción cutánea de <i>Callimedusa ecuatoriana</i>	26
Figura 4. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de la secreción cutánea de <i>C. ecuatoriana</i> y su correspondiente traducción a secuencia de aminoácidos del marco abierto de lectura del nuevo péptido antimicrobiano Ikiam 2599.	30
Figura 5. Gráfico de rueda helicoidal alfa predicho del nuevo péptido.	34
Figura 6. HPLC del producto de síntesis en fase sólida del péptido Ikiam 2599 sintetizado con 83% de pureza..	36
Figura 7. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra <i>S. aureus</i>	37
Figura 8. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra <i>C. albicans</i>	37
Figura 9. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra <i>E. coli</i>	38
Figura 10. Actividad hemolítica del péptido sintético Ikiam 2599.	38

Resumen

Los péptidos defensivos de las secreciones de la piel de anfibios han generado un gran interés en el mundo por su capacidad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoos, cicatrizante de heridas, antioxidante, e incluso anticancerígena. Entre ellos, los péptidos antimicrobianos (AMPs), son considerados como una alternativa terapéutica potencial contra las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales. En la familia de anfibios Phyllomedusidae, se han descrito nuevos AMPs, con una fuerte actividad antimicrobiana, con poca o ninguna actividad hemolítica, considerándolos potenciales para el desarrollo clínico. En Ecuador, existen especies pertenecientes a esta familia, con potencial biomédico, que se encuentran en peligro de extinción e inexploradas como fuente de nuevos AMPs, como *Callimedusa ecuatoriana*. En este estudio, se reporta por primera vez el análisis del potencial antimicrobiano de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*, mediante el fraccionamiento por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), ensayos antimicrobianos y espectrometría de masas asistida por matriz (MALDI-TOF MS). Además, se reporta la estructura primaria del primer péptido (Ikiam 2599) de la piel de *C. ecuatoriana* obtenida por clonaje molecular. A partir del análisis de su secuencia precursora con la de péptidos descritos, se identificó que el péptido Ikiam 2599 pertenece a la familia recién descrita Picturinas. El péptido sintético Ikiam 2599 carece de actividad hemolítica y antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, no presenta actividad antifúngica. Este estudio demuestra la importancia biomédica de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*, evidenciando el potencial de la diversidad biológica y molecular inexplorada en especies endémicas del Ecuador.

Palabras claves: secreción cutánea, actividad antimicrobiana, clonaje molecular, péptidos defensivos, pliegue de prolina.

Abstract

Defensive peptides from amphibian skin secretions have generated great interest in the world for their antibacterial, antifungal, antiprotozoal, wound healing, antioxidant, and even anticancer capabilities. Between them, antimicrobial peptides (AMPs) are considered as a potential therapeutic alternative against infections caused by microorganisms resistant to conventional antibiotics. In Phyllomedusidae family, new AMPs have been described, with strong antimicrobial activity with low or no hemolytic activity, considering them potential for clinical development. In Ecuador, there are species belonging to this family, with biomedical potential that are in danger of extinction and unexplored as a source of new MPAs, such as *Callimedusa ecuatoriana*. This study reports for the first time analysis of the antimicrobial potential of *C. ecuatoriana* cutaneous secretion through fractionation by high performance liquid chromatography (HPLC), antimicrobial assays and matrix-assisted mass spectrometry (MALDI-TOF MS). In addition, the primary structure of the first peptide (Ikiam2599) from *C. ecuatoriana* skin obtained by molecular cloning is reported. From the analysis of its precursor sequence against described peptides, it was identified that Ikiam2599 peptide belongs to the recently described Picturin family. The synthetic peptide Ikiam2599 lacks hemolytic and antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: additionally, it lack antifungal activity. This study demonstrates the biomedical potential of the *C. ecuatoriana* cutaneous secretion, also showing the potential of unexplored biological and molecular diversity in endemic species of Ecuador.

Keywords: skin secretion, antimicrobial activity, molecular cloning, defensive peptides, proline kink.

Lista de abreviaturas

PARG: Proyecto de conservación de Anfibios y sus Recursos Genéticos

AMP: Péptido antimicrobiano

APD3: Base de datos de péptidos antimicrobianos

CAMPR3: Colección de péptidos antimicrobianos

LAMP: Base de datos “Linking Antimicrobial Peptides”

AMR: Resistencia antimicrobiana

ADNc: ADN complementario

ARNm: ARN mensajero

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

MALDI-TOF-MS: Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz y detección de masas por tiempo de vuelo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RACE PCR: Amplificación rápida de los extremos de ADNc

SPPS: Síntesis en fase sólida

MIC: concentración inhibitoria mínima

MBC: concentración bactericida mínima

TFA: ácido trifluoroacético

NUP: Nested Universal Primer

dNTPs: desoxirribonucleótidos

MHB: caldo Mueller Hinton

MHA: agar Mueller Hinton

CHCA: ácido α -Cyano-4-hydroxycinnámico

Tris-HCl: Tampón de trisaminometano-ácido clorhídrico

TBE: Tampón de Tris, borato y EDTA

DMSO: dimetil sulfóxido

PBS: Tampón fosfato salino

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Péptidos de la secreciones cutáneas de anfibios

Los anfibios viven en microambientes cálidos y húmedos, favorables para el crecimiento de bacterias y hongos potencialmente patógenos. Estos animales desarrollaron un sistema de defensa que protege su piel de la invasión de estos microorganismos, y que está basado en componentes bioactivos en las secreciones de su piel [1]. Las glándulas exócrinas dérmicas de los anfibios son las responsables de secretar grandes cantidades y variedades de hormonas y péptidos bioactivos, que son liberados sobre la superficie de su piel [2,3]. La liberación de estas biomoléculas se da a través de la ruptura de la membrana plasmática y la extrusión de los gránulos secretores a través de un conducto que se abre a la superficie [3]. Los péptidos secretados por glándulas granulares han destacado por su rol en la protección de peligros ambientales, patógenos y en la cicatrización de heridas, pero también presentan otros efectos biológicos en la ecología de los anfibios (Figura 1) [4,5]. Además, cada especie de anfibio produce su propio set de péptidos genéticamente codificados y de secuencia definida, convirtiendo a las secreciones de anfibios en una fuente importante de péptidos bioactivos con funciones potenciales para la aplicación biomédica o biotecnológica.

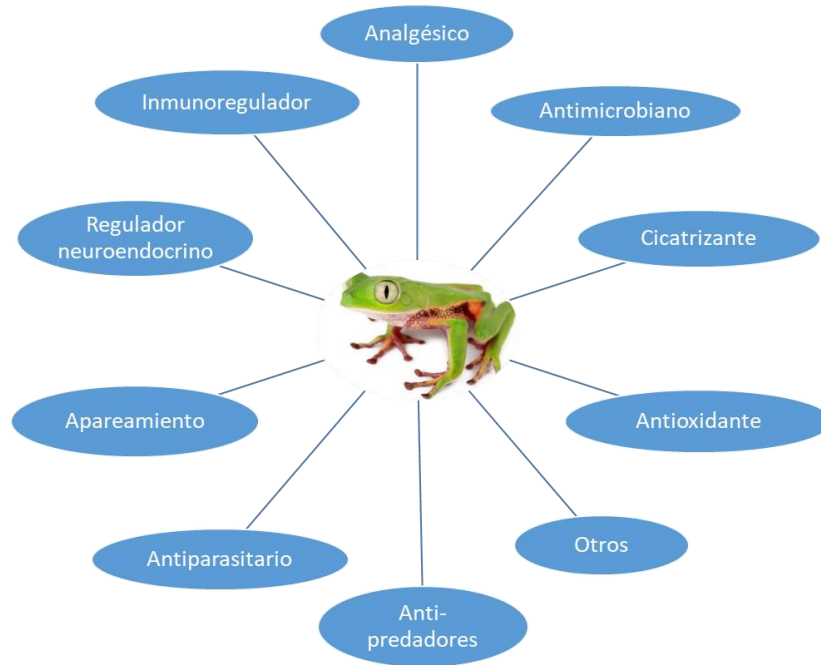


Figura 1. Múltiples funciones de los péptidos bioactivos en la piel de los anfibios.

Modificado de Xu & Lai, 2015 [5].

En las últimas décadas los componentes bioactivos de las secreciones de anfibios, en especial péptidos, han tenido un importante interés investigativo. Se ha discutido la estructura y función biológica de más de 100 categorías de péptidos bioactivos de la piel de anfibios [5]. Los péptidos de las secreciones de la piel de anfibios difieren en secuencia y función dentro de la fisiología de los anfibios. Las aplicaciones biomédicas más relevantes descritas hasta la actualidad en péptidos incluyen a los AMPs de amplio espectro, que se han considerado incluso en tratamientos alternativos contra microorganismos farmacorresistentes [6]. Además se reportan importantes péptidos con actividad anticancerígena [7], analgésica y antiinflamatoria [8], cicatrizante [9], antioxidante [10], efectora de hemostasia [11], entre otros. Una base de datos de péptidos defensivos de anfibios DADP (<http://split4.pmfst.hr/dadp/> ; ingresado el 27 de abril de 2021) contiene

2571 entradas correspondientes a 1923 secuencias diferentes de péptidos de anuros incluidos AMPs y otros péptidos defensivos [12].

1.1.2 Péptidos antimicrobianos: estructura y función

Los péptidos antimicrobianos son cadenas cortas formadas por aminoácidos producidos por la mayoría de los seres vivos, pero difieren en secuencia de aminoácidos y estructura secundaria, por lo que no se ha podido identificar dominios invariables asociados con su actividad biológica [1]. Sin embargo, independientemente de su origen biológico, todos los AMPs comparten ciertas características fisicoquímicas comunes. La mayoría de los AMPs varían en tamaño de 12 a 50 residuos de aminoácidos [13–15], lo que los hace candidatos a optimización estructural y a síntesis química para potenciar su actividad biológica [13–16]. La mayoría de los péptidos antimicrobianos conocidos son catiónicos, es decir tienen una carga neta positiva a pH fisiológico y es debido a la presencia de múltiples residuos de arginina y lisina [1,15,17]; son hidrófobos, debido a la presencia de al menos 50% de aminoácidos apolares. Además, la mayoría de ellos son lineales con potencial de formar estructuras hélices α u hojas β anfipáticas o anfifílicas a menudo inducidas por la interacción con fosfolípidos de membrana de la célula diana, mientras que otros son cíclicos debido a la presencia de enlaces disulfuro o tioéteres [16–18].

Se han definido dos rutas generales para describir el mecanismo de acción de los AMPs, y ambas empiezan con la interacción electrostática de los péptidos catiónicos con las membranas bacterianas [18,19]. Luego de esta primera interacción los mecanismos divergen. En la primera ruta existe una perturbación de la integridad de la membrana citoplasmática de los patógenos, a estos péptidos se los denomina AMPs activos de

membrana, [13,16,17]. En la segunda ruta existe la introducción del péptido al citoplasma bacteriano, y se los denomina AMPs intracelularmente activos [13,20].

Los péptidos antimicrobianos han demostrado ser un componente principal en la defensa contra predadores, microorganismos patógenos y reparación de heridas de la piel de anfibios[15]. Se ha descrito que los AMPs de anfibios presentan un rápido efecto letal y una amplia actividad antibacteriana, antifúngica y antiprotozoaria. Los AMPs son capaces de penetrar y destruir su membrana plasmática y/o inactivar varios objetivos intracelularmente, evitando que los microorganismos desarrollen resistencia al péptido [15,16]. Por lo que se ha propuesto a los AMPs de anfibios como candidatos ideales para la aplicación terapéutica con el creciente problema del abuso de fármacos [15].

Hasta el 2020, se han descrito 3257 péptidos antimicrobianos de diferentes fuentes biológicas y sintéticas, incluidos 1120 péptidos activos derivados de anfibios. Estas cifras se encuentran registradas en la base de datos especializada de AMPs APD3 (<https://wangapd3.com/main.php> ; ingresado el 27 de abril de 2021) [21]. La investigación en AMPs ha crecido a lo largo de los años, que en la actualidad existen bases de datos como LAMP2 (<http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/index.php> ; ingresado el 27 de abril de 2021) que incluyen 23253 secuencias de péptidos de desarrollo experimental, de predicciones y registrados en patentes [22]. Entre las actividades que presentan estos AMPs se encuentran antibacterianos, antibiofilm, anti-MRSA, anti-Tuberculosis, anti-endotoxina, anti-toxina, antivirales, anti-VIH, antifúngicos, antiparasitarios, antimaláricos, anticáncer, antidiabéticos, curativos de heridas, quimiotácticos, antiinflamatorios, espermicidas, insecticidas, inhibidores de los canales de iones, inhibidores de la proteasa, antioxidantes y péptidos sinérgicos [21]. Por ejemplo, las dermaseptinas son AMPs de 24-

34-mer aislados de anfibios, y presentan actividad contra bacterias, levaduras, protozoos como *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium falciparum*, virus como el Herpes simple tipo 2 y contra hongos filamentosos de los géneros *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium* [23–27]. Gracias a este amplio espectro de actividad, actualmente se considera a los AMPs como una alternativa a las terapias clásicas o incluso, en terapias complementarias en tratamientos contra enfermedades infecciosas resistentes [20,28].

1.1.3 Péptidos en Phyllomedusidae y su potencial biomédico

En la familia Phyllomedusidae [29] se han reportado 196 péptidos bioactivos, de los cuales 149 fueron identificados en el género *Phyllomedusa* spp., 33 en el género *Phasmahyla* spp., 12 en el género *Agalychnis* spp., y 2 en el género *Hylomantis* spp. En los géneros *Callimedusa* spp., *Pithecopus* spp., *Cruziohyla* spp., y *Phrynomedusa* spp. no se presentan registros hasta la fecha de acceso en la base de datos DADP (ingresado el 27 de abril de 2021) [12]. Los péptidos de esta familia pertenecen a 5 categorías de péptidos bioactivos: antimicrobiana, liberadoras de insulina, analgésicos, miotrópicos e inhibidores de proteinasas.

En Phyllomedusidae se han descrito un total de 93 péptidos con actividad antimicrobiana, clasificados en las familias: Dermaseptinas, Dermatoxinas, Phylloseptinas, Phylloxinas y Plasticinas [2]. Hasta el 2011 un único péptido derivado de Magainina, aislada de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*, ingresó a los ensayos clínicos de fase III bajo el nombre de MSI-78 o Pexiganan. Este péptido había sido analizado para el tratamiento tópico de las úlceras del pie diabético, pero en 1999 la FDA denegó su aprobación ya que se requerían más ensayos clínicos [30]. Locilex® (crema de Pexiganam al 0,8%, Dipexium

Pharmaceuticals co.) se convierte en el primer antibiótico en fase clínica III de la FDA para el tratamiento de infecciones leves del pie diabético [31]. Patentes chinas de Song y sus colaboradores, en 2001-2012, describen AMPs altamente catiónicos aislados de la piel de *Rana nigromaculata* y *R. chensinensis*, pero carecen de información sobre la citotoxicidad de los AMPs descubiertos. En el 2015, Jiang y colaboradores presentaron una patente para Dermaseptinas, aislados de las secreciones de la piel de *Phyllomedusa* [32]. En el mismo año otra familia de AMPs de anfibios Phylloseptinas, aisladas de la piel de la rana amazónica *Phyllomedusa hypochondrialis*, fue patentada por Ribeiro de Paiva y colaboradores [33]. Se encontró que las Phylloseptinas son más efectivas para matar bacterias patógenas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*) que los antibióticos estándar y presentan escasa toxicidad a 128 µg / ml.

1.2 Planteamiento del problema

El desarrollo de antimicrobianos revolucionó la medicina moderna al permitir avances en todos los aspectos de la medicina clínica, incluidos partos más seguros, procedimientos quirúrgicos, trasplantes de órganos y regímenes de quimioterapia [31]. Sin embargo, la resistencia antimicrobiana (AMR por sus siglas en inglés) apareció poco tiempo después del desarrollo de los primeros antibióticos en 1950 [32]. Como resultado de la AMR, las infecciones bacterianas se han convertido nuevamente en una amenaza clínica importante [33]. Las consecuencias de la resistencia a antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, se observan a nivel mundial en múltiples sectores sociales, económicos y ambientales. El uso excesivo de antibióticos en el sector agrícola, y ganadero genera un impacto negativo en la salud humana y la soberanía alimentaria [34–36]

Desde hace décadas se plantea la necesidad de buscar nuevas moléculas bioactivas de fuentes naturales diversas que permitan el desarrollo de alternativas terapéuticas a los tratamientos existentes. La piel de los anfibios es una de ellas, hasta el momento se han logrado identificar compuestos con propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antidiabéticas, anticancerígenas, antibióticas, antivirales y antifúngicas [6–8,26,37,38]. Se ha demostrado también novedosas aplicaciones en la recuperación de heridas antioxidante y efectores de hemostasia, que posibilita la aplicación biomédica y biotecnológica de los péptidos bioactivos de las secreciones cutáneas de anfibios [9–11].

Se estima que existen más de 100 000 compuestos bioactivos en las secreciones de la piel de los anfibios, pero la IUCN (<https://www.iucnredlist.org> ; ingresado el 28 de abril de 2021) estima que alrededor del 41% de las especies de anfibios están en peligro de extinción [5,39]. Una de las estrategias para la conservación de anfibios es resaltar las potenciales aplicaciones de sus recursos genéticos y protegerlos por su valor farmacéutico promisorio [40]. Lo cual permitiría aportar soluciones a problemáticas humanas, como la resistencia que presentan los patógenos a las terapias antimicrobianas clásicas, que pone en riesgo todo el sistema de salud mundial actualmente.

Sin embargo, hasta ahora existen especies pertenecientes a esta familia que permanecen sin ser estudiadas. *Callimedusa ecuatoriana*, anteriormente *Phyllomedusa ecuatoriana*, es una especie endémica del sureste de la Amazonia ecuatoriana que pasó en 2016 a pertenecer al nuevo género *Callimedusa* spp. [29]. *C. ecuatoriana* (Figura 2a) actualmente se encuentra amenazada por la pérdida de su hábitat en la cordillera del Cóndor [41]. La amenaza en la que se encuentran las poblaciones de esta especie y la falta de investigación de sus recursos genéticos, ponen en peligro de extinción, junto con la

especie, toda su riqueza genética. Hasta el momento el país está desaprovechando el alto potencial de aplicabilidad biomédica de esta y otras especies endémicas, puesto que no se ha estudiado el potencial farmacológico que pueden tener los recursos genéticos de *Callimedusa ecuatoriana*.

1.3 Justificación de la investigación

La piel de anfibios es una fuente promisoría de compuestos bioactivos de interés farmacológico y biotecnológico.

1.3.1 Recursos Genéticos en Ecuador: *Callimedusa ecuatoriana*

Los anfibios son recursos valiosos para el Ecuador por su importancia ecológica, cultural y por el potencial que tienen para contribuir al bienestar de la humanidad. Se considera que Ecuador es el país con la diversidad de anfibios más alta por unidad de área, con aproximadamente 2440 especies por cada millón de km²: esto lo convierte en el país con la concentración más variada de ranas y sapos del planeta [42]. Además, alberga a la cuarta fauna de anfibios más numerosa a nivel mundial, con un total de 622 especies descritas hasta inicios de 2019 [42,43]. Actualmente en el país, a pesar de la riqueza de anfibios, 188 de estas especies se encuentran en peligro de extinción. De un total de 253 anfibios endémicos ecuatorianos, 134 se encuentran incluidos en la lista roja de especies en peligro de extinción [43]. Dentro de las prioridades para la conservación que establecen los herpetólogos en Latinoamérica, se encuentra el desarrollo de investigación en torno a los anfibios para dar importancia y salvaguarda a sus recursos genéticos [44].

En Ecuador se han realizado muy pocos estudios en torno al potencial biomédico de los AMPs de anfibios, a pesar de la alta diversidad de estos organismos y del peligro de extinción en el que se encuentra su riqueza endémica. Se ha estudiado la actividad anticancerígena, antibacteriana y antifúngica de secreciones de anfibios pertenecientes a

las familias Bufonidae, Dendrobatidae, Hemiphractidae, Hylidae, Ranidae y Strabomantidae directamente contra cepas fúngicas [45–49]. Son pocos los estudios que se han realizado para caracterizar molecularmente de los AMPs activos de estas secreciones, entre ellos un estudio realizado en *Cruziohyla calcarifer* y *Agalychnis spurrelli* [37,50]. En *C. calcarifer* se logró descubrir una nueva familia de 15 péptidos llamada Cruzioseptinas, que presentan una amplia gama de actividad antimicrobiana.

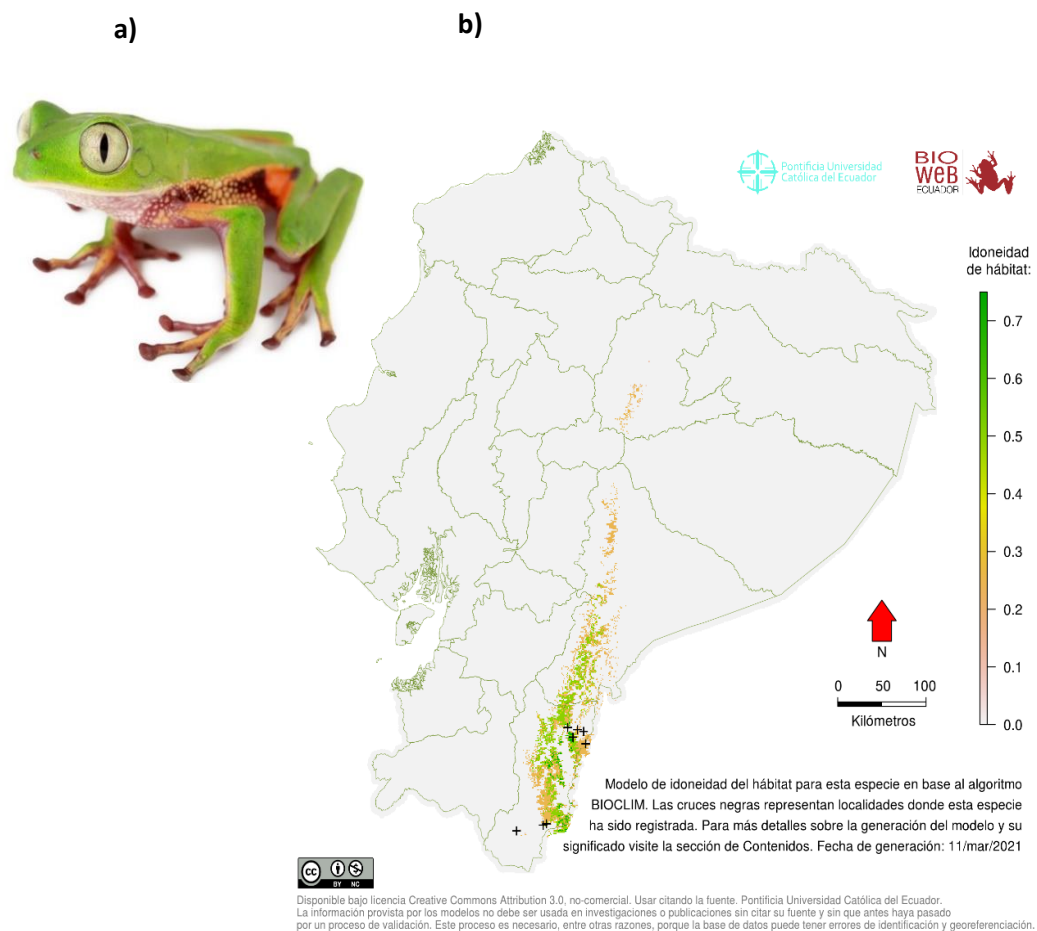


Figura 2. Espécimen de *Callimedusa ecuatoriana* (a). Mapa de distribución potencial de hábitat para *C. ecuatoriana* (b). Ron, S. R., y Read, M. (2019).

En este estudio nos enfocaremos en el estudio de la especie *Callimedusa ecuatoriana*, primero porque pertenece a la familia Phyllomedusidae y por lo tanto existe una alta probabilidad de encontrar compuestos bioactivos en sus secreciones cutáneas y segundo porque es una especie endémica amenazada [29,41]. Su distribución actual se restringe a cuatro localidades en las estribaciones de estribaciones orientales amazónicas de los Andes, en la provincia de Morona-Santiago y Zamora Chinchipe en Ecuador, de 1500 a 1890 msnm (Figura 2b) [51]. Esta especie se encuentra amenazada por la pérdida de hábitat y minería a cielo abierto, por lo cual esta podría ser la única oportunidad de estudiar sus secreciones y caracterizar sus compuestos. Además, esto permitirá salvaguardar sus recursos genéticos los cuales pueden tener potencial biomédico para el desarrollo de nuevos terapéuticos.

1.4 Objetivos de investigación

Objetivo Principal

Caracterizar la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana* y la estructura primaria de al menos un péptido nuevo de la misma.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana* y aislar sus compuestos mediante RP-HPLC.
2. Identificar la masa de los péptidos aislados mediante espectrometría de masas empleando un MALDI-TOF MS.
3. Determinar la secuencia precursora de al menos un péptido de la piel de *C. ecuatoriana* a través de clonaje molecular.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Extracción de la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana*

Los especímenes de *Callimedusa ecuatoriana* (n=3, dos de crecimiento en cautiverio y uno de crecimiento en vida libre), empleados en este estudio, se obtuvieron gracias a una colaboración con el Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios. Las secreciones cutáneas se extrajeron mediante un masaje en la zona dorsal de los anfibios. Este método estimula la secreción del exudado de las glándulas granulares parótidas y tibiales a la superficie de la piel [52]. La secreción se recolectó con agua destilada en vasos de precipitación estériles de 1 litro. Posteriormente la secreción se trasvasó a tubos cónicos estériles de 25 ml y se congelaron inmediatamente a -80°C por 24h. Las secreciones fueron liofilizadas por 3 días en un VirTis BenchTop Pro Freeze Dryer (Sp Scientific, USA) y finalmente se almacenaron a -20°C hasta su análisis posterior. Los especímenes regresaron a sus terrarios después del proceso de extracción.

2.2 Caracterización de la actividad antimicrobiana de las fracciones de la secreción cutánea

2.2.1 Fraccionamiento de la secreción cutánea mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Se disolvieron 5 mg de secreción liofilizada en 200 µl de dH₂O/ácido trifluoroacético (TFA) (99,95/0,05, v/v) y se clarificó la muestra por centrifugación. Posteriormente, se separaron 100 µl del sobrenadante de la muestra y se inyectó manualmente en un sistema de Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con Detector UV/Vis

2489, Bombas e inyector 2545, Colector de fracciones III (Waters, USA). La separación cromatográfica se realizó en una columna analítica (C18; 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m; Júpiter; USA) durante 240 minutos con un gradiente lineal de elución de 90% (dH₂O/TFA) (99,95/0,05, v/v) y 10% (acetonitrilo/TFA) (99,95/0,05, v/v) a 100% (acetonitrilo/TFA) (99,95/0,05, v/v) a un flujo de 1ml/min. Se colectaron 240 fracciones, 1 fracción por minuto, empleando un colector de fracciones automático. Posteriormente, las fracciones que demostraron picos fueron analizadas por ensayos de actividad antimicrobiana descrita en 2.2.2 y por MALDI-TOF MS descrito en 2.2.3. La detección de la absorbancia (λ) de cada fracción se realizó a 214 nm para detectar la presencia de enlaces peptídicos y 280 nm para identificar la presencia de residuos de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) [53].

2.2.2 Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC de la secreción cutánea

Se realizaron ensayos de inhibición bacteriana y antifúngica con todas las fracciones de HPLC, para lo cual primero se concentraron alícuotas de 500 μ l de las fracciones cromatográficas por centrifugación al vacío y se resuspendieron en 14 μ l de tampón fosfato salino (PBS); el mismo PBS se utilizó como blanco en estos ensayos. Primero, se revivieron alícuotas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* en 10 ml de caldo Mueller Hinton (MHB) y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó un pase de los microorganismos en 20ml de MHB y se incubó nuevamente a 37°C hasta que *E. coli* alcanzó 0,4 OD, *S. aureus* 0,2 OD y *C. albicans* 0,15 OD. Se sembraron 125 μ l de cada bacteria y 200 μ l de la levadura en placas Petri con Mueller Hinton Agar (MHA) y se extendió con la ayuda de un hisopo estéril en

toda la superficie del agar. Posteriormente, se hicieron pocillos con la punta de una pipeta Pasteur estéril para cargar luego 2 μ l de cada una de las 240 fracciones por duplicado. Como control negativo se sembraron 2 μ l de PBS. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y se visualizó la actividad antimicrobiana por la formación de halos de inhibición de las fracciones contra los microorganismos sembrados.

2.2.3 Análisis de las fracciones de RP-HPLC por MALDI-TOF MS

La masa molecular de los compuestos en cada fracción se analizó por espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz y detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) en un espectrómetro Axima Confidence (Shimadzu, Japón), utilizando 5 mg/ml de ácido α -Cyano-4-hydroxycinnámico (CHCA) en dH₂O/acetonitrilo/TFA (50/49,9/0,1, v/v/v) como matriz. En la placa de lectura, cada pocillo se cargó con 1 μ l de matriz CHCA y se dejó secar al aire, luego se cargaron 2 μ l de cada fracción de RP-HPLC y se dejó secar previo a la inserción de la placa en el equipo. La lectura de masa se realizó en un rango de 1000 a 3500 Da para detectar la presencia de péptido en las secreciones.

2.3 Clonación molecular del precursor del péptido antimicrobiano derivado de la librería de ADNc de la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana*

2.3.1 Extracción de ARNm de la secreción

La extracción del ARNm de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana* se realizó utilizando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ (Dynal Biotec, UK). Primero se diluyeron 5 mg de secreción liofilizada en 1 ml de tampón de lisis/unión celular. El ARNm poliadenilado se separó de la dilución utilizando las perlas magnéticas oligo-dT del kit. Posteriormente, se realizaron dos

lavados continuos a las perlas hibridadas con 500 μ l de los tampones de lavado A y B del kit. Finalmente el ARN se separó de las perlas empleando 18 μ l de tampón de elución (tris-HCl) y shock término a 80°C. El ARNm aislado de la secreción se utilizó inmediatamente en la construcción de la librería de ADNc [53].

2.3.2 Construcción de librería de ADNc

Se empleó el sistema GoScript™ Reverse Transcription System para sintetizar la primera cadena de 3'ADNc mediante transcripción reversa. Para favorecer la hibridación, se incubaron 4 μ l del ARNm extraído en el punto 2.3.1 y 1 μ l del primer 3'CDS (20 μ M) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀VN-3'; V=A, C, o G, N=A, T, C, o G) por 5 min a 70°C seguidos de 5 min en hielo. A esta reacción se añadió 15 μ l de máster mix (Tabla 1). Se prepararon 5 réplicas de esta librería de ADNc [54].

Tabla 1. Máster mix de retro transcripción: Construcción de la librería de ADNc.

Componente del máster mix	Volumen (μ l)	
	1Rx	5 Rx
H ₂ O PCR	5,8	29
Go Scrpit 5X buffer	4	20
MgCl ₂	3,2	16
dNTPs mix	1	5
Go Script Retro transcriptasa	1	5
Volumen total	15 μl	75 μl

2.3.3 Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE PCR)

A partir de la librería de ADNc construida en el paso anterior, se realizaron 3'-RACE PCR para obtener las secuencias nucleotídicas precursoras de los péptidos antimicrobianos que transcribe *C. ecuatoriana* [55]. Para lo cual se usaron 5 µl de la librería y 15 µl de master mix para cada reacción de RACE PCR (Tabla 2). Los primers forward fueron diseñado a partir de diferentes regiones conservadas de péptidos antimicrobianas descritos en el Orden Anura (Tabla 3), utilizados en la reacción RACE PCR a la par con el primer reverse Nested Universal Primer (NUP) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'). Cada reacción RACE PCR se realizó para 4Rx: La muestra y el control negativo (agua) a dos temperaturas de annealing (Tm1 y Tm2) (Tabla 3), en un termociclador con el método 3' RACE PCR (Tabla 4).

Tabla 2. Máster mix para RACE PCR.

Componente del máster mix	Volúmen (µl)	
	1Rx	4Rx
H ₂ O PCR	9,4	37,6
Buffer Green 5X	4	1,6
dNTPs mix (10mM)	0,4	1,6
Primer Forward* (20 mM)	0,5	2
Primer Reverse-NUP(20 mM)	0,5	2
Enzima Go Taq polimerasa	0,2	0,8
Volúmen total	15 µl	60 µl

* Los primers utilizados para RACE PCR con la librería de ADNc se enlistan en la Tabla 3 de esta sección con dos temperaturas de annealing probadas.

Tabla 3. Primers empleados en RACE PCR de péptidos en las librerías de ADNc.

Primer	Secuencia	Tm 1 (°C)	Tm 2 (°C)	Bibliografía
PSA	5'-CAGCACTTTCTGAATTACAAGACCAA-3'	60	62	[37]
Dermo-PDS	5'-GACCAAAGATGTCWTTCTTGAAGAAAT-3'	59	61	[50]
SII	5'-GAGAAGAAGCCATGAAGACTCTGA-3'	59	61	[56]
Der-S1	5'-TGACCTTCAGTACCCAGCACTTTC-3'	55	57	[57]
Der-S2	5'-GTGGTACATAATTGATAATTGTGCT-3'	59	61	[57]
Deg-S1	5'-ACTTTCYGAWTTRYAAGMCCAAABATG-3'	59	61	[58]
Deg-S2	5'-CCMRWCATGKCTTTCHTDAAGAAATCT-3'	57	59	[59]
Deg-S3	5'-CARGGICCIATHWSIAT-3'	53	55	[60]

Tabla 4. Método de PCR en termociclador para 3' RACE PCR.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	1 min	1
Denaturación	94	30 s	
Annealing	Tm1/Tm2*	30 s	40
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	10 min	1
Fin	4	∞	1

*Las temperaturas de annealing Tm1 y Tm2 probadas para cada primer se detalla en la Tabla 3 del presente capítulo.

2.3.4 Visualización de productos de PCR por electroforesis

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Se cargaron 5 µl de cada producto de PCR, su respectivo control negativo y el marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Promega, USA). Las condiciones de la corrida de electroforesis fueron 400 mA y 100 V por 90 minutos. Para visualizar las bandas de ADN, el gel se tiñó durante 30 minutos en una solución de 5 µl de Diamond Dye en 50 ml de TBE 1X y se visualizó en un transiluminador Enduro GDS touch 1302 (Labnet, USA) con luz azul.

2.3.5 Purificación de productos de RACE PCR

Los productos de PCR de la sección 2.3.2 fueron purificados utilizando el sistema PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™, USA) para eliminar los dímeros de dNTPs y restos de primers que se producen durante la reacción de PCR. En resumen, se mezclaron 10 µl de producto de PCR y 80 µl de tampón de unión B2 del kit y se colocaron en la columna del kit acoplado a un tubo colector. Se centrifugó a temperatura ambiente a 10000 g por 1 min y se descartó el líquido que pasó a través de la columna. Luego se colocó la columna de regreso al tubo de recolección y se adicionaron 650 µl de tampón de lavado W1 a la columna. Se centrifugó a temperatura ambiente a 10000 g por 1 min y se descartó nuevamente el líquido, se repitió una última centrifugación a velocidad máxima por 1 min antes de descartar el tubo de recolección. La elución del ADN purificado se realizó en un tubo 1,5ml con 15 µl de Tris-HCl (10 mM a pH=8,5), colocándolo con cuidado en el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a velocidad máxima por 2 min. Se verificó la concentración y pureza del ADN purificado con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (ThermoFisher, USA) y el volumen obtenido se reconcentró por centrifugación al vacío y almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

2.3.6 Ligación de productos de RACE PCR con vector PGEM-T easy

Los productos de PCR purificados en la sección 2.3.4 se resuspendieron en 8 μ l de H₂O PCR y se homogeneizó por vórtex y spin, manteniéndolo en hielo por intervalos de 30 s. Para la ligación con el sistema pGEM-T Easy Vector [61], se preparó un master mix de ligación (Tabla 5). Se incubó el producto por 1 hora a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4°C.

Tabla 5. Máster mix de ligación con el sistema pGEM-T Easy Vector.

Componente del máster mix	Volumen (μ l)
2X Rapid Ligation Buffer	2,5
pGEM-T Easy Vector	0,5
T4DNA Ligasa (2 weiss units/ μ l)	0,5
Producto de PCR purificado	1,5
Volumen total	5 μl

2.3.7 Transformación bacteriana

La transformación bacteriana del producto de ligación con el vector pGEM-T Easy de la sección 2.3.6 se realizó en *E. coli* JM109. Primero se descongeló, sobre hielo, una alícuota de 25 µl de bacterias competentes *E. coli* JM109 almacenada a -80 °C y a través de shock térmico se transformó con 2,3 µl del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo por 20 min, luego se llevó a una temperatura de 42 °C por 50 s para provocar el shock térmico y finalmente se colocó sobre hielo por 2 min. Las muestras se incubaron en 950 ml de medio SOC a 37 °C con agitación de 150 rpm por 2h y 30 min. Se sembraron al menos 4 placas con 100 µl de cultivo en placas con medio MacConkey suplementado con ampicilina (100 µg/ml), las placas se incubaron por 18h a 37°C.

2.3.8 Selección de colonias transformadas

Se seleccionaron las colonias blancas (Lac negativas, resistentes a ampicilina) y se volvieron a sembrar por estriado en nuevas placas con agar MacConkey suplementadas con ampicilina (100 µg/ml).

2.3.9 Aislamiento del ADN recombinante

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

2.3.10 Amplificación de ADN recombinante mediante PCR

El ADN recombinante se amplificó por PCR utilizando los primers Forward M13F (5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCCAC-3') y Reverse M13R (5'-TGTGAGCGGATAACAATTTTCCAC-3'). Se prepararon 23,75 µl de master mix (Tabla 6) y se adicionaron 1,25 µl de ADN recombinante. Se empleó agua en lugar de ADN para el control negativo y ADN control para el control positivo. La reacción de PCR se realizó utilizando el perfil térmico descrito en la Tabla 7.

Tabla 6. Máster mix de Cloning PCR de plásmidos recombinantes.

Componente del máster mix	Volumen 1Rx (µl)
H ₂ O grado PCR	15,5
5X Buffer Green	5
dNTPs (10 µM)	0,5
primer forward M13F	1,25
primer reverse M13R	1,25
enzima Go Taq polimerasa	0,25
Volúmen total	23,75 µl

Tabla 7. Método de PCR en termociclador para Cloning PCR.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	1 min	1
Denaturación	94	30 s	
Annealing	55	30 s	35
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	10 min	1
Fin	4	∞	1

2.3.11 Visualización por electroforesis de productos de Cloning PCR

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X como se detalla en la sección 2.3.4.

2.4 Secuenciación

Se seleccionaron los productos clonados con un peso mayor a 500 pb y se secuenciaron por el método Sanger (Servicios de laboratorio, Universidad de las Américas, Quito, Ecuador). Se enviaron alícuotas de aproximadamente 20 µl de los productos de Cloning PCR de la sección 2.3.10. Utilizando los primers M13F y M13R para la identificación del ADN clonado en la sección 2.3 que codifica a los precursores biosintéticos de péptidos antimicrobianos.

2.5 Análisis bioinformáticos de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron en el software de acceso libre MEGA X. Primero se evaluó que la lectura de las secuencias obtenidas sea correcta, con un pico único de lectura por cada nucleótido. Se identificó la secuencia “AAT TCG AT” como inicio de la secuencia inserta en las lecturas forward (con el primer M13F) y se eliminó las secuencias después de la cola de poli A en la secuencia inserta. Se identificó la secuencia “TAG TGA T” en las lecturas reverse (con el primer M13R) y se eliminó las secuencias después de la cola de poli T en la secuencia inserto. Las secuencias nucleotídicas limpias se tradujeron a secuencia de aminoácidos y se hizo un alineamiento básico local en BLAST/n y BLAST/p para comparar la secuencia nucleotídica y de aminoácidos con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología (Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D., NCBI). La masa teórica del péptido se calculó en el servidor de acceso libre en línea Peptide Mass Calculator V 3.2 (<http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>). La predicción de la estructura secundaria del péptido se llevó a cabo en SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) , y las propiedades fisicoquímicas en Bachem Peptide Calculator (<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>) y Heliquest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>). Finalmente se realizó el modelo de predicción rueda helicoidal alfa del péptido utilizando Heliquest.

2.6 Síntesis de péptido en fase sólida (SPPS)

Un péptido nuevo Ikiam 2599 identificado por clonaje molecular (sección 2.4) fue sintetizado químicamente empleando un Sintetizador automático de péptidos (Liberty Blue Automated Microwave Peptide Synthesizer, CEM, USA), utilizando la estrategia Fmoc (9-fluorenil-metoxycarbonita) en fase sólida. Para sintetizar 0,1mMol del péptido ácido se empleó 0,2 g de resina Cl-TCP (Cl) ProTide Resin (CEM, USA) y N, N'-dimetilformamida como solvente para la síntesis. Los grupos protectores Fmoc fueron removidos durante la síntesis con piperidina 20%. Oxyma y DIC (N, N'-diisopropilcarbodiimida) fueron empleados en el acoplamiento. Finalizada la síntesis, 3 h 30 min después, se mezcló la resina unida al péptido con 5 ml de un coctel de clivaje TFA/TIPS/DODT/H₂O (92,5/2,5/2,5/2,5 v/v/v/v). La mezcla se incubó en el sistema microondas del sintetizador por 30 min a 38°C para completar el clivaje y desprotección del péptido sintético. El péptido se separó por precipitación utilizando éter frío y centrifugación. El péptido sintético se purificó por HPLC de fase reversa y su pureza fue confirmada por MALDI-TOF MS.

2.7 Ensayos antimicrobianos: Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) del nuevo péptido sintético contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la levadura *Candida albicans* [53]. Para iniciar, los microorganismos se cultivaron a 37°C en medio MHB a 150 rpm por 16-24h. Subsecuentemente se subcultivaron 500 µl en 50 ml de medio MHB fresco y diluyeron en MHB para alcanzar 10⁶ UFC/ml de los microorganismos. Luego, 198 µl de cada microorganismo fue cultivado con 2 µl de péptido en diluciones seriadas (1 a 512

x 10² mg/L) en placas de 96 pocillos. Se emplearon dos controles negativos: el primero contenía 200 µl de MHB sin bacterias y el segundo 2 µl de DMSO que fue el diluyente del péptido. Se realizaron 7 réplicas en este ensayo. Los cultivos se incubaron a 37°C durante toda la noche. El crecimiento de los microorganismos se detectó mediante la absorbancia a 550 nm empleando un lector de microplacas GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, USA).

2.8 Ensayos de hemólisis

Para determinar la actividad hemolítica del nuevo péptido sintético se siguió el protocolo de Oddo & Hassen (2017) modificado [62]. Se empleó una solución de glóbulos rojos humanos heparinizados en PBS (4%) y las mismas concentraciones obtenidas por diluciones seriadas del péptido sintético analizadas en los ensayos MIC en el apartado 2.7. En tubos de 1,5ml, se colocaron 200 µl de la solución de glóbulos rojos al 4% y se adicionaron 200 µl de cada dilución del péptido sintético. Como control negativo se emplearon 200 µl de PBS sin péptido y como control positivo se adicionaron 200 µl de tritón X-100 (Sigma Aldrich, USA). Se realizaron 5 réplicas de cada tratamiento y se incubaron a 37°C por 2 h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1000 g por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a placas de 96 pocillos. La lectura se realizó a 550 nm en un lector de placas GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, USA). El porcentaje de hemólisis se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{Hemólisis} = (A - A_o) / (A_x - A_o) * 100$$

Dónde A es la OD de las muestras con la concentración del péptido, A_o es la OD del control negativo y A_x es la OD del control positivo.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Caracterización de la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea

Se obtuvo 20 mg aproximadamente de secreción liofilizada de los 3 especímenes empleados. 5 mg de la secreción de *C. ecuatoriana* fueron fraccionadas por HPLC, que resultó en 240 fracciones de 1 ml colectadas automáticamente. En el cromatograma de HPLC se detectaron una serie de picos a 214 y 280 nm lo que evidencia la presencia de péptidos y proteínas en dichas fracciones (Figura 3). Los ensayos de actividad antimicrobiana demostraron que 8 fracciones (Tabla 8), señaladas en la Figura 3, presentaron actividad antimicrobiana (Figura 1, Anexos). Sin embargo, el diámetro de los halos de inhibición microbiana se descarta como resultado cuantitativo, debido a que no se logró comprobar la presencia de un compuesto único en las fracciones y su concentración. Adicionalmente, por MALDI-TOF MS se identificó que los compuestos presentes en las fracciones 83-93 presentan un rango de masas de 2.050 a 3.500 Da (Tabla 8).

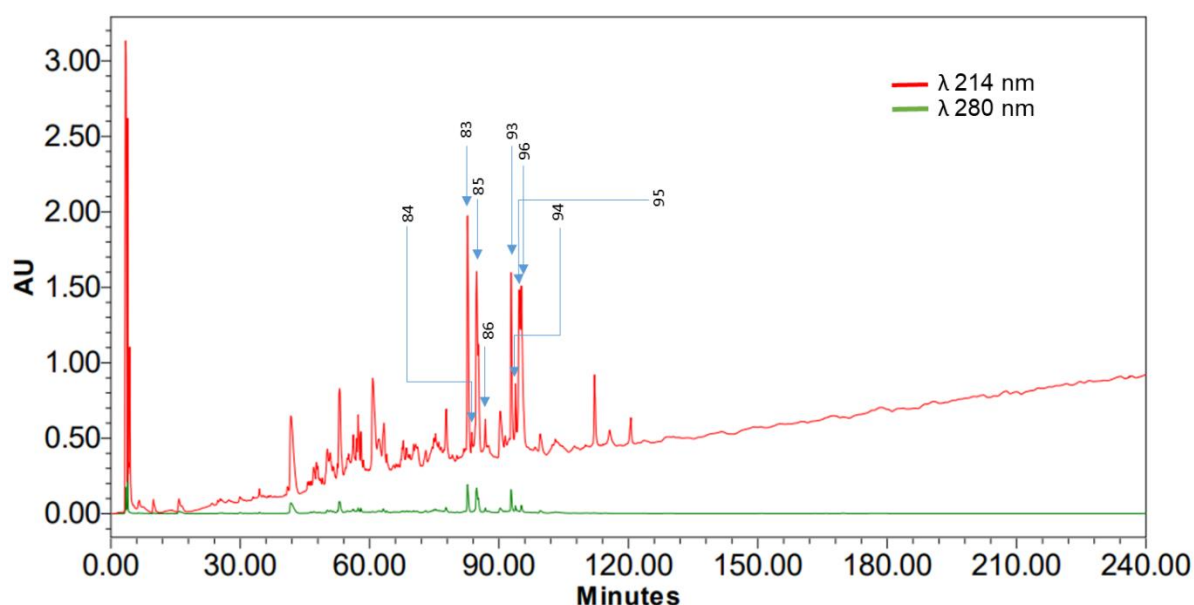


Figura 3. Cromatograma de HPLC en fase reversa de la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana* fraccionada durante 240 min con detección dual UV a 214 nm (rojo) y 280 nm (verde). En azul se marca las fracciones con actividad antimicrobiana.

Cuatro de las ocho fracciones de la secreción cutánea que tienen actividad antimicrobiana presentan acción dual, contra bacterias Gram negativas (*E. coli*) y Gram positivas (*S. aureus*). En las fracciones restantes la actividad fue selectiva hacia uno u otro patógeno. Sin embargo, ninguna de las fracciones presentó actividad antifúngica contra *C. albicans* (Tabla 8). El rango de masas de MALDI-TOF MS (2123.42 a 3475.21 Da) y los picos predominantes a 214 y 280 nm de las 8 fracciones, nos hace suponer la presencia de péptidos en estas fracciones.

3.2 Identificación y caracterización estructural de péptidos de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*.

A través de clonaje molecular se obtuvieron las secuencias precursoras de dos péptidos en las librerías de ADNc de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*: un péptido no identificado anteriormente en las bases de datos del GenBank y un péptido Phylloseptina-TO8 descrito anteriormente en *Phyllomedusa tomopterna* [63,64]. Primero, el precursor biosintético de un nuevo péptido fue clonado con éxito a partir de la librería de ADNc (Figura 4) utilizando el primer Dermo-PDS (Tabla 1). El marco de lectura abierto del nuevo péptido contiene 222 nucleótidos/74 aminoácidos compuesto de cuatro dominios: el péptido señal en la región N-terminal el cual está compuesto por 22 aminoácidos, un dominio espaciador ácido de 24 residuos, un péptido maduro ácido de 25 mer y una región C-terminal no traducida. La secuencia del péptido maduro deducido es GVFKDALKQFGAALPDKAANALKPK-OH. El precursor del nuevo péptido fue comparado con la base de datos del NCBI a través de las herramientas BLAST/n y BLAST/p. En el BLAST/n, no se obtuvieron resultados de alineamientos significativos con la base de secuencias

nucleotídicas del NCBI. Luego se realizó un blast/p con la secuencia traducida empleando el marco de lectura abierto y el filtro “Amphibia”.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de las fracciones de HPLC de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*

# Fracción HPLC	Actividad antimicrobiana			Masa (Da) MALDI-TOF MS
	<i>S. aureus</i> (Gram +)	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>C. albicans</i> (levadura)	
83	+	+	-	3475.21
84	-	+	-	2123.42 2107.50 2085.40 2145.40 3452.10
85	+	+	-	2488.99 2450.00
86	+	+	-	2450.00 2488.00 2897.96 2935.50
93	-	+	-	2668.30 2692.30 2708.30
94	-	+	-	2668.30 3224.00 3226.00 2670.30
95	+	-	-	2069.40 2048.40
96	+	+	-	2069.37

Los resultados arrojaron que el precursor del péptido Ikiam 2599 resultó 71.1% similar a Caerin 1.1 reportada en *Litoria splendida* con 70% de cobertura de alineamiento, 53.5% al precursor de Dermaseptin-PC (*Phyllomedusa coelestis*) con 95% de cobertura, 54.8% al precursor de Fallaxidin 1.1 (*Litoria fallax*) con 83% de cobertura y 54% con el precursor de Frenatin 3.1 (*Nyctimystes infrafrenatus*) con 100% de cobertura de alineamiento (número de acceso ACG50815.1; QGU34109.1; B5LUQ9.1; Q571V4.1, respectivamente). Con el alineamiento, también se detectó un dominio conservado putativo en la región del péptido señal (en el intervalo 2-22aa) con la superfamilia FSAP_sig_propep (número de acceso pfam03032), una familia de péptido señal y propéptidos activos de la piel de anfibios. Por el contrario, la comparación por BLAST/p del péptido maduro no muestra similitud significativa con esta base de datos, lo que indica que se trata de un péptido nuevo no perteneciente a estas familias. Por lo tanto, se ha nombrado referencialmente al nuevo péptido antimicrobiano descubierto en la secreción de *Callimedusa ecuatoriana* como Ikiam 2599, dado que la masa teórica es de 2599.47 Da y fue identificado en la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

En el 2016, Proaño describió una nueva familia de péptidos antimicrobianos en *Boana picturata* denominada Picturinas (PTR) [53]. El nuevo péptido Ikiam 2599 tiene una estructura muy parecida a las secuencias precursoras de los péptidos pertenecientes a esta familia. La comparación de las secuencias nucleotídicas del marco de lectura abierto del precursor de Ikiam 2599 con precursores de Picturinas (Figura 7, Anexos) permitieron identificar 1 mutación no sinónima en la región de péptido señal, y otra en la región del péptido maduro de Ikiam 2599. La mutación no sinónima en el codón codificante del aminoácido 15 del péptido maduro, ocasiona un cambio conformacional en la predicción

de la estructura secundaria del péptido (Tabla 9 y 11). Al comparar las propiedades fisicoquímicas y la predicción de la estructura secundaria, el dominio de alfa hélice predicho es del 80 % de los aminoácidos, en comparación al 88% de las PTRs. También disminuye la hidrofobicidad ligeramente del nuevo péptido (valor H de 0.236), en comparación a las Picturinas (H=0.71-0.306), la carga del péptido Ikiam 2599 es de +3 al igual que la Picturina 1 y 2.

```

 M S F L K K S L F L A L F L G I V S L S
1ATGTCTTTCT TGAAGAAATC ACTTTTCCTG GCTCTGTTCC TCGGAATAGT TTCCTGTCC
 I C E E E K R Q E E E E K E D E E Y E E
61ATCTGTGAAG AAGAGAAAAG ACAAGAAGAA GAGGAGAAGG AAGATGAAGA ATATGAAGAG
G Y E A S E E K R  G V F K D A L K Q F G
121GGATATGAAG CAAGTGAAGA AAAGAGAGGA GTCTTCAAAG ACGCCTTAAA ACAATTTGGT
 A A L P D K A A N A L K P K *
181GCAGCACTTC CTGATAAAGC TGCCAATGCT CTTAAACCAA AGTAATGTCT CATCAATAAG
241GAGCATACTT ATCATTGATC GTGCCAGACA TATAATAAAG CATATTAATA AAAAAAAAAA
301AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

Figura 4. Secuencia nucleotídica del ADNc clonado de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana* y su correspondiente traducción a secuencia de aminoácidos del marco abierto de lectura del nuevo péptido antimicrobiano Ikiam 2599. El péptido señal putativo está subrayado doble; el péptido maduro está subrayado simple; el codón de terminación está marcado por un asterisco.

Tabla 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura del nuevo péptido Ikiam 2599 y los tres miembros de la familia Picturina descrita en *Boana picturata*. En asterisco se señalan los aminoácidos idénticos y el stop. Se resaltan en amarillo los aminoácidos q son diferentes.

Péptido	Especie	Péptido señal	Espaciador ácido
		1	*** *****
Ikiam 2599	<i>P.ecuatoriana</i>	MSFLKKSFLFLAFLGIVSLSIC EE EEKRQ EE EEKEDEEYEEGYEASEEK R	
PTR1	<i>B.picturata</i>	-----SLFLVLFLGIVSLSIC EE EEKRQ EE EEKEDEEYEEGYEASEEK R	
PTR2	<i>B.picturata</i>	MSFLKKSFLFLVLFLGIVSLSIC EE EEKRQ EE EEKEDEEYEEGYEASEEK R	
PTR3	<i>B.picturata</i>	-----LFLVLFLGIVSLSIC EE EEKRQ EE EEKEDEEYEEGYEASEEK R	
Péptido maduro			
		50	***** * * * * *
Ikiam 2599	<i>P.ecuatoriana</i>	GVFKDALKQFGAAL P DKAANALKPK*	
PTR1	<i>B.picturata</i>	GVFKDALKQLGAALLDKAANALKPK*	
PTR2	<i>B.picturata</i>	GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK*	
PTR3	<i>B.picturata</i>	GVFKDALKQFGAALLDHFSWFCSS*	

Al comparar la secuencia del péptido maduro de Ikiam2599 con la Picturina 1-3 derivadas de la secreción de *B. picturata*, se identificó una similitud de 90, 94, 96 % respectivamente, lo cual sugiere que el nuevo péptido puede ser agrupado dentro de la familia de péptidos antimicrobianos Picturinas. El gráfico de rueda helicoidal alfa predicho (Figura 5) muestra que el nuevo péptido mantiene las características anfipáticas de los péptidos antimicrobianos, pero con una cara hidrofóbica pequeña (A/L/L/F/F).

Tabla 10. Alineamiento múltiple del péptido maduro del nuevo péptido Ikiam 2599 con los péptidos de la familia Picturina.

Péptido	Secuencia del péptido maduro	Similitud (%)	Valor e	Cobertura (%)
Ikiam 2599	GVFKDALKQFGAALPDKAANALKPK	-	-	-
PTR1	GVFKDALKQLGAALLDKAANALKPK	92.00	1e-21	100
PTR2	GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK	96.00	1e-23	100
PTR3	GVFKDALKQFGAALLDHFSWFCSSSE	93.75	1e-13	64

Además del nuevo péptido encontrado por clonaje molecular, también se reporta por primera vez la secuencia precursora del péptido antimicrobiano Phylloseptin-TO8 (PSN-TO8) en *C. ecuatoriana*, el cual no posee registro del precursor en la base de datos de UniProt. La secuencia de PSN-TO8 se obtuvo por secuenciación directa y se trata de un péptido de 19 residuos (número de acceso P85447), descrito por primera vez en *Phyllomedusa tomopterna*. El alineamiento de la secuencia precursora de PSN-TO8 con otros miembros de la familia Phylloseptina de la base de datos del NCBI (Figura 8, Anexo) y sus correspondientes secuencias traducidas de aminoácidos (Tabla 12) demuestra una alta similitud de secuencia. Además, se identificó 1 mutación no sinónima en la región de péptido señal, 1 mutación no sinónima en la región del espaciador ácido y 2 mutaciones no sinónimas en la región del péptido maduro de PSN-TO8 encontrado en *C. ecuatoriana*.

Tabla 11. Propiedades físico-químicas del nuevo péptido de la secreción de *C. ecuatoriana* y las Picturinas relacionadas.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	#AAs	Alfa hélice [%]	Hidrofobicidad [H]	Momento hidrofóbico [μH]	Carga neta [z]	Masa teórica [Da]
	₁ HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC ₁ HHHHHHHHHH ₁ CCC ₂₅						
Ikiam 2599	GVFKDALKQFGAAL P DKAANALKPK	25	80	0.236	0.319	3	2599.07
	₁ HH ₁ CTT ₂₅						
Picturin-1	GVFKDALKQLGAALLDKAANALKPK	25	88.00	0.271	0.306	3	2581.10
	₁ HH ₁ CTT ₂₅						
Picturin-2	GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK	25	88.00	0.275	0.309	3	2615.12
	₁ HH ₁ CTT ₂₅						
Picturin-3	GVFKDALKQFGAALLDHF ₁ SWFCSSE	25	88.00	0.306	0.326	2	2615.07

*Alpha helix (H); Random coil (C); Beta turn (T).

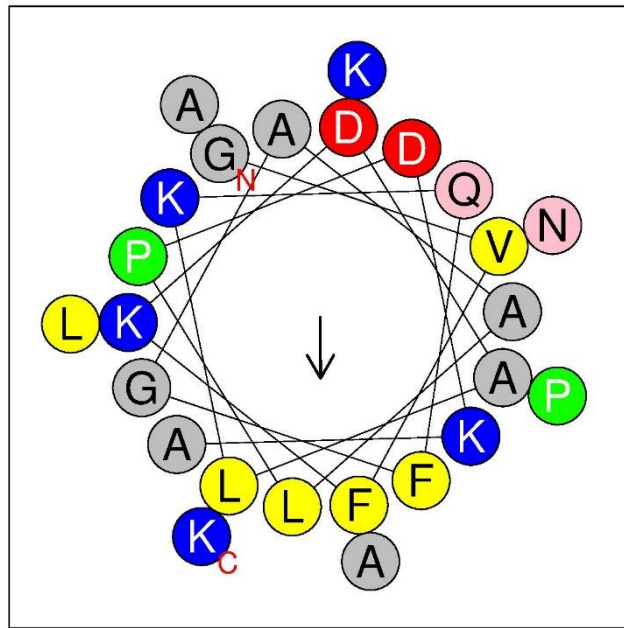


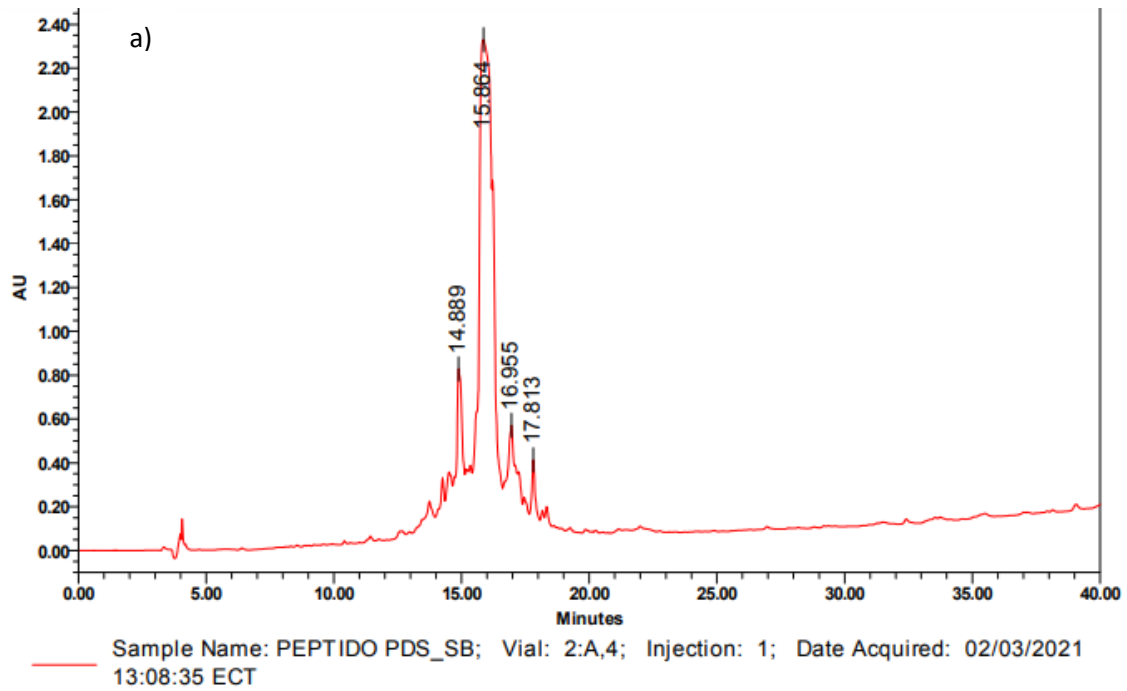
Figura 5. Gráfico de rueda helicoidal alfa predicho del nuevo péptido. Los residuos básicos están en azul, los residuos no polares (en amarillo) forman una pequeña cara hidrofóbica señalada con la flecha.

Tabla 12. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos traducidas del marco abierto de lectura de Phylloseptinas. En asterisco se señalan los aminoácidos idénticos. Los dos puntos indican conservación entre grupos de propiedades fuertemente similares y el punto entre grupos débilmente similares.

Péptido	#Acceso n/AAs	Especie	Péptido señal	Espaciador acídico
			1	***:*****:*****:***:*****
<i>P.e</i> PSN- TO8	-	<i>Callimedusa</i> <i>ecuatoriana</i>	MAF F KKSLFLVLFLGLVLSL S IC EE EKRETE E K E NEQEDDDK S EEKR	
PSN-7	AM229010. 1/P85882.1	<i>Pithecopus</i> <i>azureus</i>	MAFLKKS L FLVLFLGLVLSL S IC EE EKRETE E EENEQEDDDK S EEKR	
PSN-8	AM229011. 1/P85883.1	<i>P. azureus</i>	MAFLKKS L FLVLFLGLVLSL S IC EE EKRETE E E E Y N QEDDDK S EEKR	
PST-PT	LT703448.1 /SIP79164. 1	<i>Phyllomedusa</i> <i>. tarsius</i>	MAFIKKS L FLVLFFGLVLSL S IC EE EKRETE E EK E NDQEDDDK S EEKR	
			Péptido maduro	
			47	***** . . . : * : * * * :
<i>P.e</i> PSN- TO8	-	<i>C.</i> <i>ecuatoriana</i>	FLSLIP H AINAVS A LAKHFG	
PSN- TO8*	/P85447.1	<i>P.</i> <i>tomopterna</i>	FLSLIP H AINAVS A LAKHF-	
PSN-7	AM229010. 1/P85882.1	<i>P. azureus</i>	FLSLIP H AINAVS A IAKHFG	
PSN-8	AM229011. 1/P85883.1	<i>P. azureus</i>	FLSLIP T AINAVS A LAKHFG	
PST-PT	LT703448.1 /SIP79164. 1	<i>P. tarsius</i>	FLSLIP K IAGG I AALAKHLG	

*PSN-TO8 tiene únicamente registro del péptido maduro en la base de datos del NCBI

Finalmente, el péptido sintético Ikiam 2599 con un 83% de pureza (Figura 6), se utilizó para los ensayos de actividad inhibitoria MIC contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Figura 7-9) y actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos (Figura 10). El péptido sintético no demostró actividad hemolítica contra glóbulos rojos en concentraciones >2.048 mg/l ($7,88 \times 10^5 \mu\text{M}$), pero tampoco demostró actividad inhibitoria contra las dos bacterias ni la levadura en concentraciones <2.048 mg/L ($7,88 \times 10^5 \mu\text{M}$).



Peak Summary with Statistics

b)

Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	PEPTIDO PDS_SB	2:A,4	1	14.889	5739639	6.82	508823
2	PEPTIDO PDS_SB	2:A,4	1	17.813	2127945	2.53	259125
3	PEPTIDO PDS_SB	2:A,4	1	16.955	6384418	7.59	328873
4	PEPTIDO PDS_SB	2:A,4	1	15.864	69863471	83.06	2009088

Figura 6. HPLC del producto de síntesis en fase sólida del péptido Ikiam 2599 sintetizado con 83% de pureza. a) Cromatograma del producto de síntesis. b) Valores estadísticos de 4 compuestos con mayores picos de absorbancia y por consiguiente mayor área debajo la curva; el péptido Ikiam 2559 y 3 péptidos considerados como productos de síntesis no deseados.

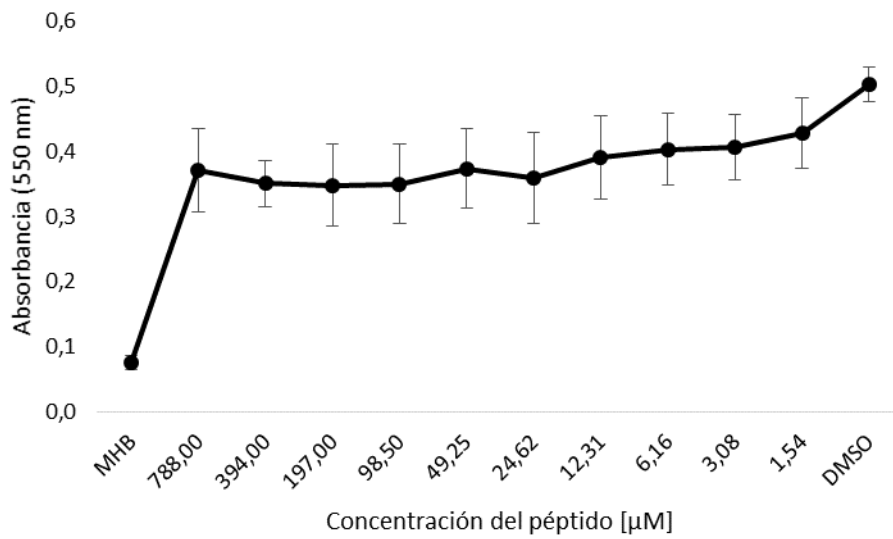


Figura 7. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra *S. aureus*.

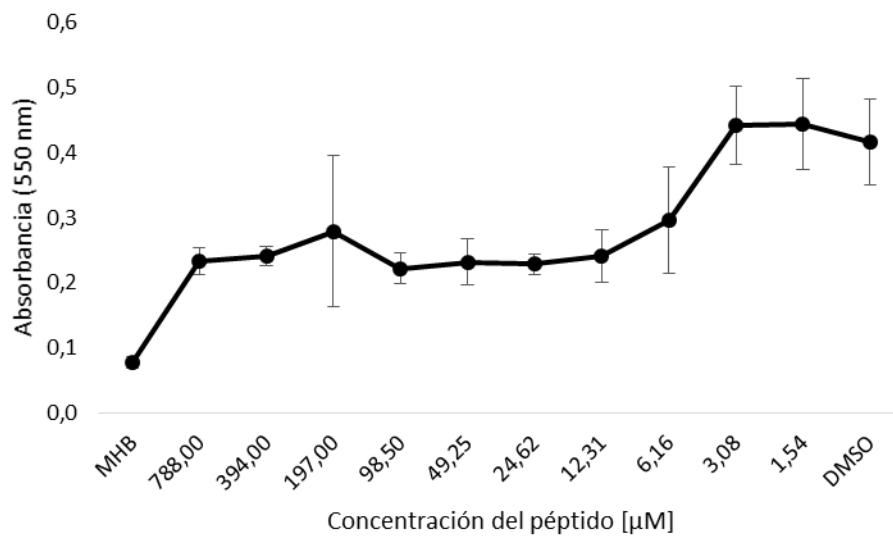


Figura 8. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra *C. albicans*.

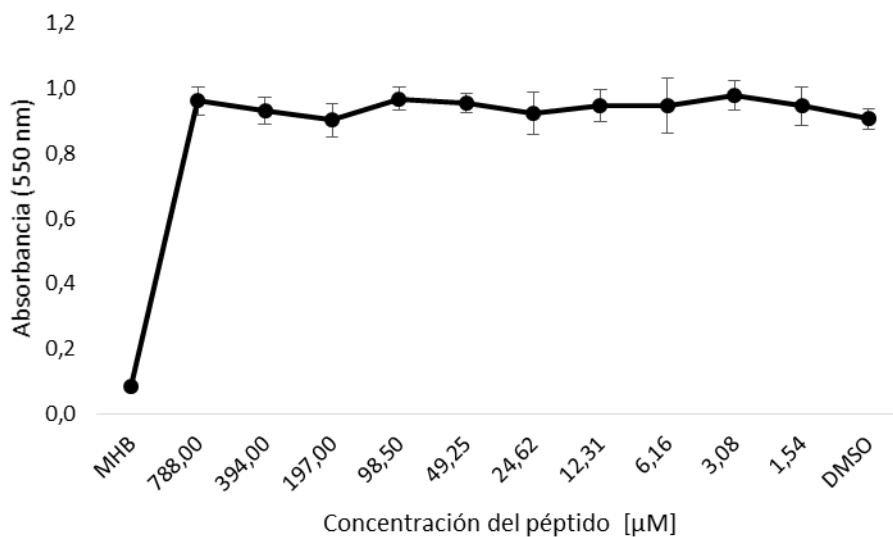


Figura 9. MIC del péptido sintético Ikiam 2599 contra *E. coli*.

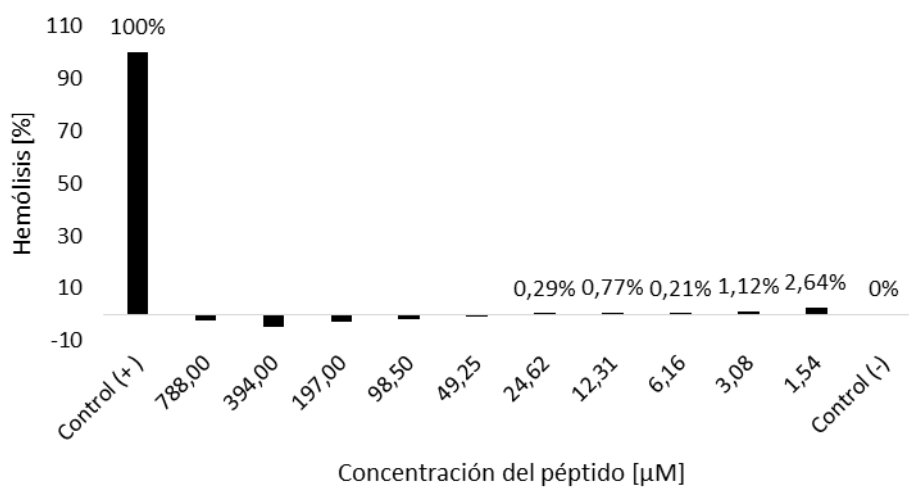


Figura 10. Actividad hemolítica del péptido sintético Ikiam 2599. El Control (+): Triton X-100 + Dimetilsulfóxido (DMSO) y el Control (-): DMSO.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Primer estudio antimicrobiano en las secreciones de la piel de *Callimedusa ecuatoriana*

En esta tesis, se reporta por primera vez la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana* contra la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 y la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los picos cromatográficos a 214 y 280 nm suponen la presencia de péptidos en las fracciones de HPLC, en algunos casos, selectivos para *E. coli* o *S. aureus* y otros de acción dual contra ambos (Tabla 8). Una de las principales desventajas de la detección de componentes activos mediante el uso de bioensayos es su baja sensibilidad. Por tanto, no se detecta la presencia de péptidos antimicrobianos que pueden ser potencialmente valiosos para uso terapéutico pero que están presentes en fracciones cromatográficas en concentraciones bajas que están por debajo de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de microorganismos [65]. Esta limitación es de particular relevancia en investigaciones que involucran especies muy pequeñas o en el caso de especies raras cuando pocos individuos están disponibles para el estudio, como ocurre con *C. ecuatoriana*. Para contrarrestar este limitante, se tiene que realizar una aproximación peptidómica por espectrometría de masas en tándem o clonaje molecular de secuencias precursoras de AMP a partir de la secreción cutánea. El MALDI TOF-MS de estas fracciones de HPLC permitió identificar masas en el rango de 2.069 a 3.475 Da que permite asociar la actividad antimicrobiana de las fracciones a péptidos presentes en la secreción. Al comparar las características de los posibles péptidos en *C. ecuatoriana* con las familias de péptidos antimicrobianos de Phyllomedusinae reportadas en bases de datos (APD3; CAMPR3). Por el rango de masas (2069 a 3475 Da), bioactividad de amplio

espectro contra Gram positivas y Gram negativas, los péptidos en estas fracciones pueden pertenecer potencialmente a las familias Phylloseptina (18-20 aa), Plasticina (23 aa) Distinctin (25 aa) Cruzioseptina (21-23 aa). Al filtrar la actividad, a específica contra Gram+ y el rango de masa (2048 a Da) los resultados indican que puede tratarse de un miembro de la familia Phylloseptina (18-20 aa). En cambio, la inhibición de Gram- y un rango de masas de 2085-3452 Da indica que estos péptidos son posibles miembros de las Dermaseptinas (27-32) aa. Estos resultados representan la diversidad de familia de péptidos que posiblemente se encuentren en las secreciones defensivas de *Callimedusa ecuatoriana* [21,66].

A través de clonaje molecular de las librerías de ADNc de la secreción de *C. ecuatoriana*, se identificaron dos péptidos antimicrobianos que no están relacionados a las masas de MALDI TOF MS correspondientes a los picos cromatográficos de HPLC de las fracciones de la secreción. El precursor de un nuevo péptido no descrito anteriormente en ninguna especie, se encontró en el ADNc de la secreción de *C. ecuatoriana*. Sugiriendo que la diversidad de péptidos antimicrobianos está subestimada con los resultados cromatográficos de la secreción, debido a la heterogeneidad con la que las biomoléculas se expresan en la secreción de los anfibios. La baja concentración con la que se producen algunas de estas biomoléculas ocasiona que algunos de estos péptidos pasen desapercibidos o ausentes en las lecturas de absorbancia de las fracciones cromatográficas de la secreción. La utilización de técnicas moleculares más directas como el clonaje molecular con primers específicos de Phyllomedusinae, complementan los resultados de HPLC y MALDI TOF MS en la búsqueda de péptidos antimicrobianos en la secreción de *C. ecuatoriana*.

4.2 Hallazgo de un nuevo péptido Ikiam 2599 y Phylloseptina-TO8 en *C.*

ecuatoriana

En esta tesis, se descubrió la secuencia del primer péptido cutáneo de *C. ecuatoriana* mediante clonaje molecular. Una primera búsqueda en la base de datos de nucleótidos del GenBank no encontró similitud con otras familias de péptidos anteriormente descritos. Al comparar la secuencia traducida del precursor, se encontró homología en la región del péptido señal lo que nos indica que pertenece a la superfamilia de péptido señal y propéptido FSAP_sig_propep (número de acceso pfam03032) que comparte varias familias de AMP de la piel anfibios de la región suramericana (*Phyllomedusa coelestis*), e incluso anfibios australianos (*Litoria splendida*, *Nyctimystes infrafringatus*, *Litoria fallax*). A pesar de estos resultados, la familia FSAP sig_propep no incluye la región del péptido maduro que es la región activa del péptido, lo que no permite asociarlo a ninguna de las familias descritas. Sin embargo, se identificó 92-96% de similitud con una nueva familia de péptidos descubierta en *Boana picturata* y llamada Picturinas [53]. En el alineamiento de las secuencias nucleotídicas del marco de lectura abierto del precursor de Ikiam 2599 con precursores de Picturinas se pudo encontrar una alta similitud de las secuencias de ADN en la región de péptido señal y espaciador ácido, lo que indica que estos péptidos pueden compartir el mismo origen, a pesar de pertenecer a familias diferentes: *B. picturata* a Hylidae y *C. ecuatoriana* a Phyllomedusidae[29].

El rol de la conformación en alfa hélice se ha relacionado fuertemente con la bioactividad de los péptidos antimicrobianos [67–69]. Por comparación estructural de la predicción de estructura secundaria, se identificó la alteración de la continuación de alfa hélice característica en las Picturinas (<ALLD>, hhhh) en el péptido Ikiam 2599. Esta disrupción se da por una única mutación no sinónima, que cambia una Leucina a Prolina (<ALPD>, hcch) en la posición 15 del péptido maduro. El cambio en la conformación de alfa hélice ocasionada por Prolina (P)/Glicina ha sido caracterizado funcionalmente en los péptidos antimicrobianos [70,71]. La prolina es un aminoácido único, formando un anillo de cinco miembros que contiene nitrógeno. Esta diferencia es muy importante, ya que significa que P no puede ocupar muchas de las conformaciones de la cadena principal que fácilmente adoptan los demás aminoácidos. En este sentido, puede considerarse un opuesto a la glicina, que puede adoptar muchas más conformaciones de cadena principal. Por esta razón, la prolina a menudo se puede encontrar en giros muy cerrados en las estructuras de las proteínas y también puede funcionar para introducir pliegues en hélices alfa, ya que no puede adoptar una conformación helicoidal normal [72].

En péptidos, el pliegue del alfa hélice altera la capacidad de estabilizar el poro de barril en membrana [70], además que no posee ningún efecto sobre la barrera de translocación y reduce la afinidad del péptido a la membrana [71]. Esta modificación en Ikiam 2599 se puede asociar a la disminución de actividad antimicrobiana que se encontró en el péptido nuevo en comparación a Picturina 2 (PTR 2), que es su análogo natural más cercano con 96% de similitud. PTR 2 presentó 48,95 μM contra *E. coli*; 195,79 μM contra *S. aureus* y *C. albicans* de concentración mínima inhibitoria y bactericida [53]. Sin embargo, no se descarta potenciales aplicaciones del nuevo péptido, así como su funcionalidad

dentro de la ecología de *C. ecuatoriana*, ya que los péptidos secretados por las secreciones cutáneas de los Phyllomedusidos han destacado por su multifuncionalidad, incluida la actividad antimicrobiana, liberadora de insulina, analgésica, miotrópica e inhibidora de proteinasas; de acuerdo se registra en la base de datos DADP (ingresado el 27 de abril de 2021) [12].

Por clonaje molecular, además se reporta por primera vez en *C. ecuatoriana* el péptido Phylloseptin-TO8 con 19 aminoácidos (número de acceso P85447), identificado y caracterizado previamente en *Phyllomedusa tomopterna*. *P. tomopterna* (al igual que *Phyllomedusa ecuatoriana*) pasó en 2016 a pertenecer al nuevo género *Callimedusa* spp. Esto debido a que en el análisis filogenético, ambas especies de anfibios junto con otras 4, están estrechamente relacionadas, y comparten un ancestro común en el Mioceno, hace 14,6 millones de años [29].

Phylloseptin-TO8 se encontró con el precursor de glicina C-terminal, el cual se ha descrito como un residuo de glicina que su extremo N-terminal es sitio de reconocimiento de pro-proteínas convertasas [73], terminando en una amidación del terminal carboxilo del péptido (FLSLIPHAINAVSALAKHF-NH₂). La amidación del residuo C-terminal en AMPs se reporta como una modificación post-traducciona natural frecuente e importante identificada en anfibios ya que le otorga una carga positiva adicional, lo cual se relaciona con su función. Esta, entre otras modificaciones post-traduccionales juegan un papel importante en la optimización de la eficacia y especificidad de los mecanismos de acción de los péptidos [74]. Además, estudios sobre AMP sintéticos han demostrado que la amidación C-terminal puede mejorar la eficacia antibacteriana sin aumentar la capacidad lítica, lo que aumenta el potencial terapéutico de estos péptidos[75].

4.3 Perspectivas futuras del estudio

Para continuar este estudio se podrían proponer nuevos ensayos que permitan identificar el potencial biomédico y biotecnológico que podría tener el péptido Ikiam 2599, que no se incluyen en el presente estudio. A pesar de que el péptido natural no presentó la actividad antimicrobiana buscada, esto no significa que sea un péptido inactivo. Es necesario incrementar el rango de ensayos realizados con la finalidad de determinar la actividad biológica de este péptido y sus posibles aplicaciones. Paralelamente, se sugiere proponer modificaciones para el diseño y producción de análogos al péptido Ikiam 2599, que permitan otorgar actividad antimicrobiana a la vez que se mantiene la ausencia de toxicidad, incrementar su cationicidad y anfipaticidad y así evaluar su bioactividad.

Adicionalmente, existe un especial interés en probar la actividad antimicrobiana del nuevo péptido y/o sus análogos potenciados contra cepas de patógenos resistentes a antibióticos de interés nacional y mundial como las ESKAPE. Así como también probar la actividad antiparasitaria, reportada en AMPs, del nuevo péptido y/o sus análogos contra cepas de interés regional como lo son *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* En el futuro debería evaluarse la actividad antiproliferativa contra células cancerosas, dado que la Picturina-1 de *Boana picturata* presentó baja actividad antimicrobial pero una interesante actividad anticancerígena y de inhibición de migración celular contra líneas celulares de melanoma metastásico en estudios aún no publicado del laboratorio CISEAL de la PUCE [76].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, se comprobó el potencial de actividad antimicrobiana que posee la secreción cutánea de *Callimedusa ecuatoriana*, a través del estudio de las fracciones HPLC de la secreción. El rango de masas que presentan las lecturas de MALDI-TOF MS de los picos cromatográficos con actividad antimicrobiana, revelan un espectro de posibles nuevos AMPs no descritos en esta especie. El reporte por primera vez del precursor de una Phylloseptin-TO8 en *C. ecuatoriana* supone una ubiquidad de los genes precursores de AMPs compartidos entre varias especies de Phyllomedusidae. Además, el descubrimiento de un nuevo péptido Ikiam 2599 perteneciente a la familia de péptidos antimicrobianos Picturinas, y diferente a los resultados de masa por MALDI-TOF MS de los péptidos en las fracciones de la secreción, demuestra la subestimación a la diversidad de AMPs que se pueden encontrar en *C. ecuatoriana*, muchos de estos aún nuevos por describir.

Con este estudio se demuestra el potencial biomédico de la secreción cutánea de *C. ecuatoriana*, evidenciando además la gran cantidad de recursos genéticos inexplorados en especies endémicas del Ecuador. El potencial de la biodiversidad biológica incrementa aún más cuando esta biodiversidad es analizada a un nivel molecular. La aplicación de las técnicas de biología molecular presentadas permite estudiar los recursos genéticos, como el descubrimiento de péptidos en la secreción de anfibios ecuatorianos sin comprometer la vida de individuos de una especie amenazada.

Por los hallazgos en esta investigación, se motiva el estudio de la diversidad local, con énfasis en las especies endémicas y amenazadas de anfibios ecuatorianos. Se demuestra el potencial de aplicación biomédico que poseen los recursos genéticos de especies que no se han estudiado hasta la actualidad. La locación de un centro de

investigación en un sitio estratégico de acceso a biodiversidad, como la Universidad Regional Amazónica Ikiam, es una ventaja que se debe aprovechar en el desarrollo de investigación en Ecuador.

REFERENCIAS

1. Conlon JM. Evolution in Action: Skin Peptides. Handbook of Biologically Active Peptides. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2013. pp. 1842–1849. doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00252-9
2. Ladram A. Antimicrobial peptides from frog skin biodiversity and therapeutic promises. Front Biosci. 2016;21: 4461. doi:10.2741/4461
3. König E, Bininda-Emonds ORP. Evidence for convergent evolution in the antimicrobial peptide system in anuran amphibians. Peptides. 2011;32: 20–25. doi:10.1016/j.peptides.2010.10.009
4. Demori I, Rashed Z El, Corradino V, Catalano A, Rovegno L, Queirolo L, et al. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. Molecules. 2019;24: 347. doi:10.3390/molecules24020347
5. Xu X, Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. Chem Rev. 2015;115: 1760–1846. doi:10.1021/cr4006704
6. Santana CJC, Magalhães ACM, dos Santos Júnior ACM, Ricart CAO, Lima BD, Álvares A da CM, et al. Figainin 1, a Novel Amphibian Skin Peptide with Antimicrobial and Antiproliferative Properties. Antibiotics. 2020;9: 625. doi:10.3390/antibiotics9090625
7. Chen D, Zhou X, Chen X, Huang L, Xi X, Ma C, et al. Evaluating the Bioactivity of a Novel Antimicrobial and Anticancer Peptide, Dermaseptin-PS4(Der-PS4), from the Skin Secretion of *Phyllomedusa sauvagii*. Molecules. 2019;24: 2974. doi:10.3390/molecules24162974
8. Zhou X, Xu J, Zhong R, Ma C, Zhou M, Cao Z, et al. Pharmacological Effects of a Novel Bradykinin-Related Peptide (RR-18) from the Skin Secretion of the Hejiang Frog (*Ordorana hejiangensis*) on Smooth Muscle. Biomedicines. 2020;8: 225. doi:10.3390/biomedicines8070225
9. Li X, Wang Y, Zou Z, Yang M, Wu C, Su Y, et al. OM-LV20, a novel peptide from odorous frog skin, accelerates wound healing in vitro and in vivo. Chem Biol Drug Des. 2018;91: 126–136. doi:10.1111/cbdd.13063
10. Wang Y, Cao X, Fu Z, Wang S, Li X, Liu N, et al. Identification and characterization of a novel gene-encoded antioxidant peptide obtained from amphibian skin secretions. Nat Prod Res. 2020;34: 754–758. doi:10.1080/14786419.2018.1499635
11. Udovychenko I, Oliynyk D, Dudkina J, Halenova T, Savchuk O. Analysis of the common spadefoot toad (*Phelobates fuscus*) skin secretions on the presence of the potential hemostasis system effectors. Bull Taras Shevchenko Natl Univ Kyiv Ser Biol. 2019;77: 38–44. doi:10.17721/1728_2748.2019.77.38-44
12. Novković M, Simunić J, Bojović V, Tossi A, Juretić D. DADP: The database of anuran defense peptides. Bioinformatics. 2012;28: 1406–1407. doi:10.1093/bioinformatics/bts141

13. Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003;24: 1681–1691. doi:10.1016/j.peptides.2003.08.023
14. Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*. 2009;276: 6497–6508. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x
15. Patocka J, Nepovimova E, Klimova B, Wu Q, Kuca K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem*. 2018;25. doi:10.2174/0929867325666180713125314
16. Bahar A, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 2013;6: 1543–1575. doi:10.3390/ph6121543
17. Shai Y. Active Antimicrobial Peptides. *Biopolymers*. 2002; 236–248.
18. Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition*. 2017. pp. 3–22. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7_1
19. Yeaman MR. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*. 2003;55: 27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2
20. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*. 2017;133: 117–138. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.018
21. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
22. Zhao X, Wu H, Lu H, Li G, Huang Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One*. 2013;8: 6–11. doi:10.1371/journal.pone.0066557
23. Morton CO, dos Santos SC, Coote P. An amphibian-derived, cationic, α -helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Mol Microbiol*. 2007;65: 494–507. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05801.x
24. Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates M V., Azevedo RB, et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem*. 2002;277: 49332–49340. doi:10.1074/jbc.M209289200
25. Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46: 1059–1066. doi:10.1128/AAC.46.4.1059-1066.2002
26. Zairi A, Tangy F, Selmi B. In vitro antiviral activity of dermaseptin S4 and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. *Artic J Med Virol*. 2013; doi:10.1002/jmv.23450
27. Osusky M, Osuska L, Kay W, Misra S. Genetic modification of potato against

- microbial diseases: In vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor Appl Genet.* 2005;111: 711–722. doi:10.1007/s00122-005-2056-y
28. Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY, Chakchir OB, Eliseev IE, Grinchuk TM, et al. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics—A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00128
 29. Duellman WE, Marion AB, Hedges & SB. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa.* 2016. pp. 1–109. doi:10.11646/zootaxa.4104.1.1
 30. Zucca M, Scutera S, Savoia D. *New Antimicrobial Frontiers. Mini-Reviews Med Chem.* 2011; doi:10.2174/138955711796575498
 31. Mahlapuu M, Björn C, Ekblom J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol.* 2020;40: 978–992. doi:10.1080/07388551.2020.1796576
 32. 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
 33. Kosikowska P, Lesner A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016;26: 689–702. doi:10.1080/13543776.2016.1176149
 34. Spellberg B, *diseases DG-C infectious, 2014 undefined.* The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *academic.oup.com.* Available: https://academic.oup.com/cid/article-abstract/59/suppl_2/S71/544083
 35. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40: 277–83. doi:Article
 36. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance.* 2014.
 37. 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, *Cruziohyala calcarifer*. *J Proteomics.* 2016;146: 1–13. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.017
 38. Liang Y, Zhang X, Yuan Y, Bao Y, Xiong M. Role and modulation of the secondary structure of antimicrobial peptides to improve selectivity [Internet]. *Biomaterials Science. Royal Society of Chemistry;* 2020. pp. 6858–6866. doi:10.1039/d0bm00801j
 39. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. *IUCN Red List of Threatened Species* [Internet]. 2021 [cited 30 Apr 2021]. Available: <https://www.iucnredlist.org/>
 40. Ministerio del Ambiente y Agua del Ecuador. *Proyecto Conservación de Anfibios del*

- Ecuador y Uso Sostenible de sus Recursos Genéticos – PARG [Internet]. 2015 [cited 30 Apr 2021]. Available: <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-el-pais-mas-diverso-en-anfibios/>
41. Coloma LA, Ron S. *Callimedusa ecuatoriana*, Agua Rica Leaf Frog. The IUCN Red List of Threatened Species 2016 [Internet]. 2016. Available: <https://www.iucnredlist.org/species/55851/107288055>
 42. Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz DA. Anfibios del Ecuador Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador [Internet]. 2019 [cited 27 Apr 2021] p. 1. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
 43. Coloma, L. A., Guayasamin, J. M. & Menéndez-Guerrero P. Lista Roja de Anfibios de Ecuador. AnfibiosWebEcuador. Base de datos electrónica. [Internet]. 2015 [cited 3 Jul 2019]. Available: <http://localhost/awe/awe.php?aw,10>
 44. Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibáñez R, Salas AW, Rogelio Cedeño J, et al. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America Disminución de Poblaciones y Prioridades Para la Conservación de Anfibios en Latinoamérica [Internet]. Conservation Biology. 2001. Available: <http://www.lternet.edu/la>
 45. Vargas Hurtado AP. Pruebas antimicrobianas de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en cinco especies de levaduras patógenas del género *Candida*. Pontif Univ Católica del Ecuador. 2012;
 46. Cilveti C, Rivera M, Riglos MR, Alcocer I. Inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos.
 47. Vallejo Rodríguez GM. Identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena, y su aporte como servicio ecosistémico de tipo provisión. 2016;
 48. Llumiquinga Llumiquinga MÁ. Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos sobre cepas bacterianas tipo y aislados clínicos multirresistentes. 2017;
 49. Cajiao Garcés VL. Determinación de la bioactividad de fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae). PUCE-Quito. 2018.
 50. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida JR, Wang L, Llumiquinga MA, Rivera M, et al. Unravelling the Skin Secretion Peptides of the Gliding Leaf Frog, *Agalychnis spurrelli* (Hylidae). *Biomolecules*. 2019;9: 667. doi:10.3390/biom9110667
 51. Ron, S. R., Read M. *Phyllomedusa ecuatoriana* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador [Internet]. 2018. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Phyllomedusa ecuatoriana>
 52. Vargas AP, Pérez Ó, Ortega -Paredes D, Rivera M. Caracterización molecular de péptidos antimicrobianos a partir de muestras de piel de *Agalychnis spurrelli*

- (Anura: Hylidae). 2015.
53. Proaño-Bolaños C. Unravelling skin secretion peptidomes of *Cruzhyola calcarifer*, *Agalychnis spurelli* and *Hypsiboas picturatus* (HYLIDAE). Queen's University Belfast. 2016.
 54. Wu Y, Wang L, Zhou M, Chen T, Shaw C. Biochemical and Biophysical Research Communications Phylloseptin-PBa1 , -PBa2 , -PBa3 : Three novel antimicrobial peptides from the skin secretion of Burmeister ' s leaf frog (*Phyllomedusa burmeisteri*). Biochem Biophys Res Commun. 2019;509: 664–673. doi:10.1016/j.bbrc.2018.12.156
 55. Wu D, Gao Y, Tan Y, Liu Y, Wang L, Zhou M, et al. Discovery of From the Skin Secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* , a Prototype of a Novel Family of Antimicrobial Peptide. 2018;9: 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.00541
 56. Proaño-Bolaños C, Li R, Zhou M, Wang L, Xi X, Tapia EE, et al. Novel Kazal-type proteinase inhibitors from the skin secretion of the Splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. EuPA Open Proteomics. 2017;15: 1–13. doi:10.1016/j.euprot.2017.02.001
 57. Raja Z, André S, Piesse C, Sereno D, Nicolas P. Structure, Antimicrobial Activities and Mode of Interaction with Membranes of Bovine Phylloseptins from the Painted-Belly Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagii*. PLoS One. 2013;8: 70782. doi:10.1371/journal.pone.0070782
 58. Liu Y, Shi D, Chen J, Zhou X, Xi M, Ma J, et al. A novel amphibian antimicrobial peptide, phylloseptin-PV1, exhibits effective anti-staphylococcal activity without inducing either hepatic or renal toxicity in mice. 2020; doi:10.3389/fmicb.2020.565158
 59. Ying Y, Wang H, Xi X, Ma C, Liu Y, Zhou M, et al. Design of N-Terminal Derivatives from a Novel Dermaseptin Exhibiting Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Isolates from Cystic Fibrosis Patients. 2019;
 60. Zhou Y, Shaw C, Chen T. PH-sauvagine from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*: A novel CRF-like peptide with smooth muscle contraction activity. Toxicon. 2015;104: 19–25. doi:10.1016/j.toxicon.2015.07.012
 61. Peptide A, Chen D, Zhou X, Chen X, Huang L, Xi X. Evaluating the Bioactivity of a Novel Antimicrobial. 2019;4.
 62. Oddo A, Hansen PR. Hemolytic activity of antimicrobial peptides. In: Hansen P, editor. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2017. pp. 427–435. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7_31
 63. UniProtKB: Phylloseptin-8 - *Phyllomedusa tomopterna* (Tiger-striped leaf frog). In: UniProtKB - P85447 (PLS8_PHYTM) [Internet]. Nov 2009 [cited 2 May 2021]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/P85447>
 64. Sa Mandel SM, Mundim NCCR, Prates MV, Silva LP, Bloch Junior C. Dermaseptins and phylloseptins of *Phyllomedusa* (hylidae) secretion. Sao Paulo; 2007. Available: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:40085028

65. Conlon JM, Mechkarska M, Leprince J. Peptidomic analysis in the discovery of therapeutically valuable peptides in amphibian skin secretions. *Expert Rev Proteomics*. 2019;16: 897–908. doi:10.1080/14789450.2019.1693894
66. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D1094–D1097. doi:10.1093/nar/gkv1051
67. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein Cell*. 2010;1: 143–152. doi:10.1007/s13238-010-0004-3
68. Eliseev IE, Terterov IN, Yudenko AN, Shamova O V. Linking sequence patterns and functionality of alpha-helical antimicrobial peptides. *Bioinformatics*. 2019;35: 2713–2717. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTY1048
69. Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides-Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758: 1436–1449. doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.021
70. Tuerkova A, Kabelka I, Králová T, Šukeník L, Štěpánková S, Pokorná R, et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *Elife*. 2020; 1–38. doi:10.7554/eLife.47946
71. Brožek R, Kabelka I, Vácha R. Effect of Helical Kink on Peptide Translocation across Phospholipid Membranes. *J Phys Chem B*. 2020;124: 5940–5947. doi:10.1021/acs.jpcc.0c03291
72. Betts M, Russell R. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: Barnes M, Gray I, editors. *Bioinformatics for Geneticists*. 1st ed. John Wiley & Sons; 2003. pp. 289–314. Available: [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=q8b1VQl2aVMC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioinformatics+for+Geneticists+\(Hierarchical+Exotoxicology+Mini+Series\)+\(Inglés\)+1st+Edición+de+Michael+R.+Barnes+\(Editor\),+Ian+C.+Gray+\(Editor\)&ots=3rrvQcvwbM&sig=tZXvLob1gP6Txa](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=q8b1VQl2aVMC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Bioinformatics+for+Geneticists+(Hierarchical+Exotoxicology+Mini+Series)+(Inglés)+1st+Edición+de+Michael+R.+Barnes+(Editor),+Ian+C.+Gray+(Editor)&ots=3rrvQcvwbM&sig=tZXvLob1gP6Txa)
73. Mehta NM, Carpenter SE, Consalvo AP. C-Terminal α -Amidation. *Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009. pp. 253–276. doi:10.1002/9783527626601.ch10
74. Wang G. Post-Translational Modifications of Natural Antimicrobial Peptides and Strategies for Peptide Engineering. *Curr Biotechnol e*. 2012;1: 72–79. doi:10.2174/2211550111201010072
75. Dennison SR, Mura M, Harris F, Morton LHG, Zvelindovsky A, Phoenix DA. The role of C-terminal amidation in the membrane interactions of the anionic antimicrobial peptide, maximin H5. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2015;1848: 1111–1118. doi:10.1016/j.bbamem.2015.01.014
76. Rivera M. Péptidos antimicrobiales y anticancerígenos de la piel de anfibios de Ecuador: Avances y perspectivas [Internet]. Quito; 2020. Available: <https://fb.watch/4ucTQM4qLt/>

ANEXOS

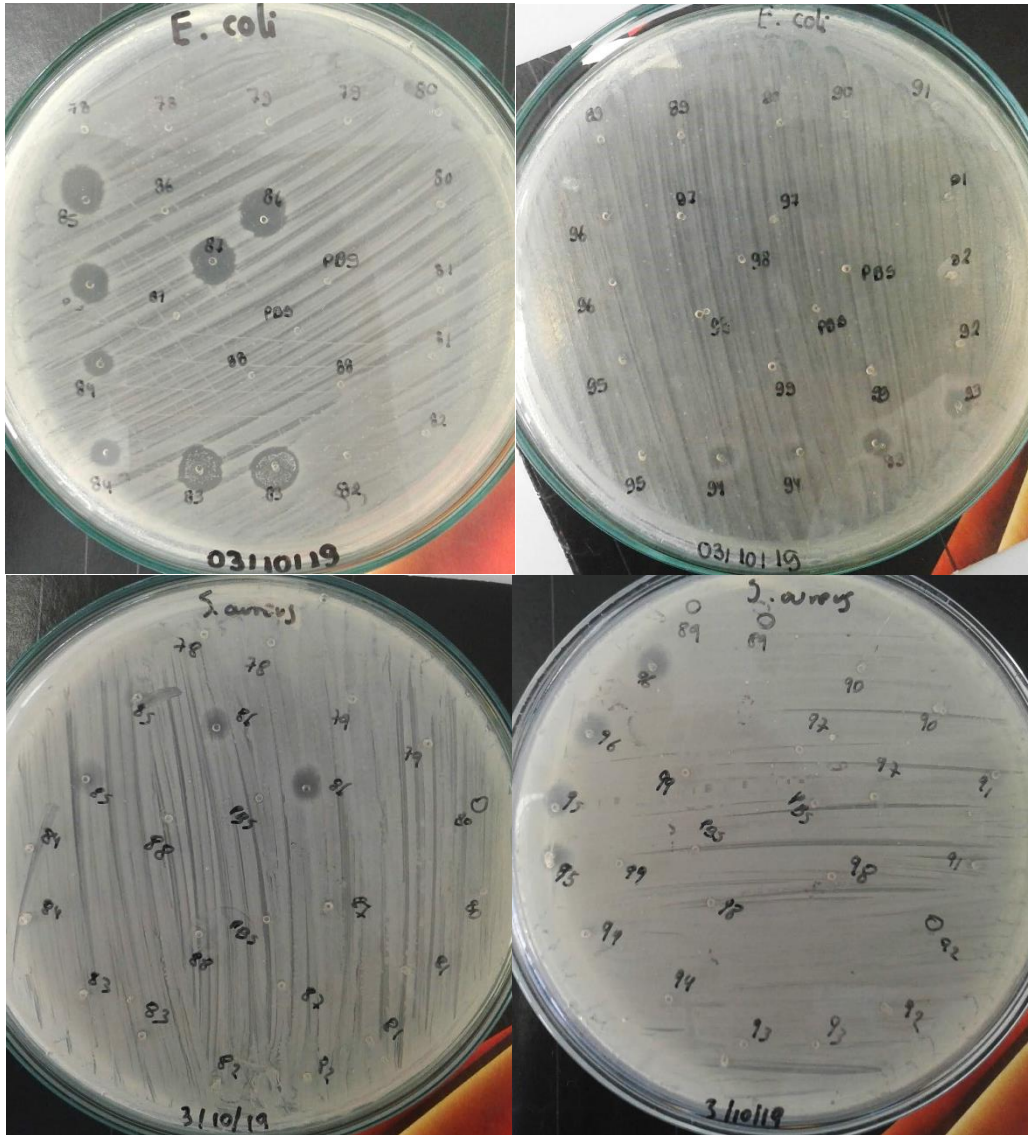


Figura 1. Halos de inhibición de las fracciones 83, 84, 85, 86, 93, 94, 95 y 96 del HPLC de la secreción de *C. ecuatoriana* contra *E. coli* (arriba) y *S. aureus* (abajo).

Tabla 1. Productos de RACE PCR de la librería de cDNA de *C. ecuatoriana* con primers específicos de Phyllomedusinae.

Primer/Tm(°C)	Secuencia del primer	Tamaño de banda (pb)
Dermo-PDS/61	5'-GACCAAAGATGTCWTTCTTGAAGAAAT-3'	400
Der-S1/51		350
Der-S1/53	TGACCTTCAGTACCCAGCACTTTC-3'	350
Der-S1/55		400
Der-S2/52	5'-GTGGTACATAATTGATAATTGTGCT-3'	600
Der-S2/53		500
Deg-S2/57	5'-CCMRWCATGKCTTCHTDAAGAAATCT-3'	400
Deg-S2/59		400

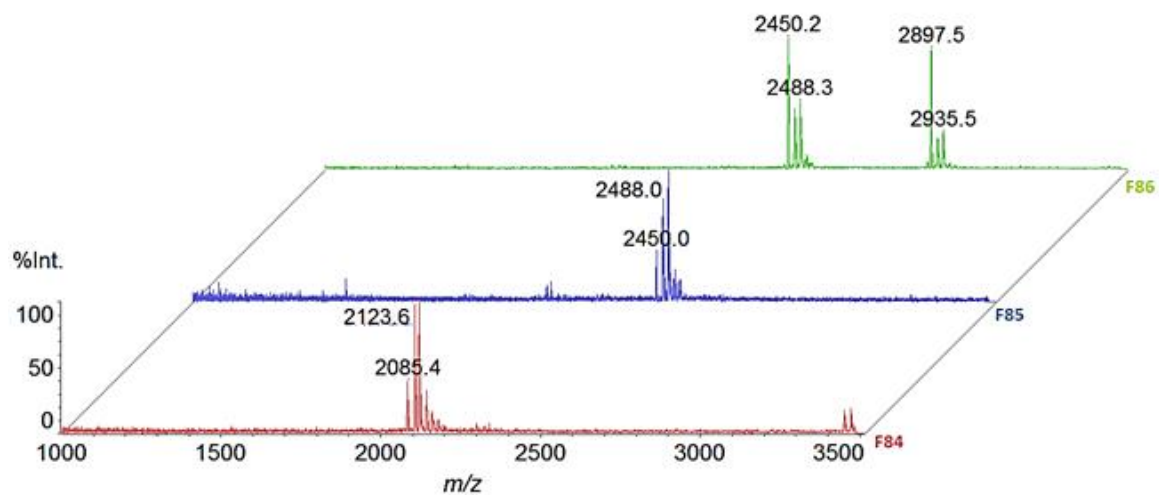


Figura 2. Espectros de masas MALDI-TOF de las fracciones 84, 85 y 86 de HPLC de la secreción cutánea de *C. equatoriana* con actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*.

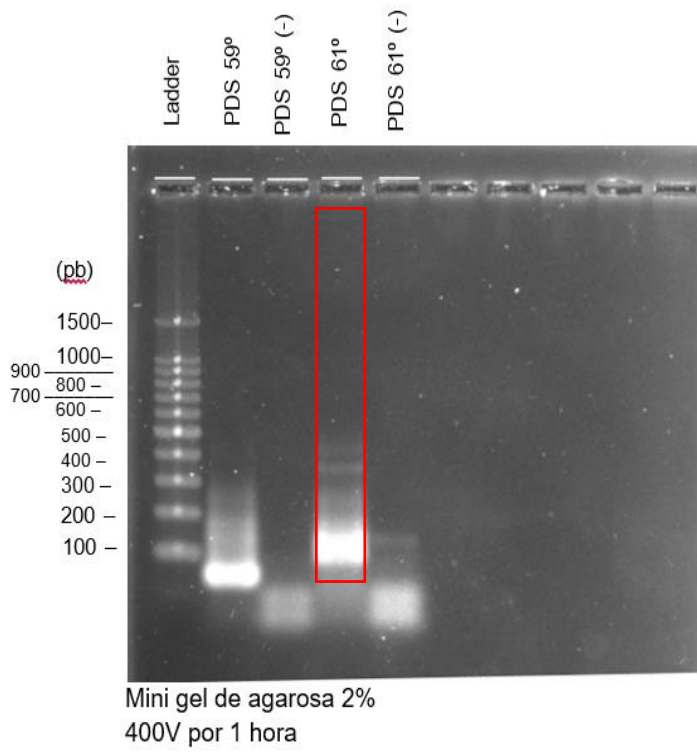


Figura 3. Gel del agarosa de los productos de RACE PCR de la librería de cDNA de *C. ecuatoriana* con el primer Dermo-PDS a 59 y 61°C. En rojo se enmarca el producto de PCR con el tamaño de banda esperado para un péptido antimicrobiano.

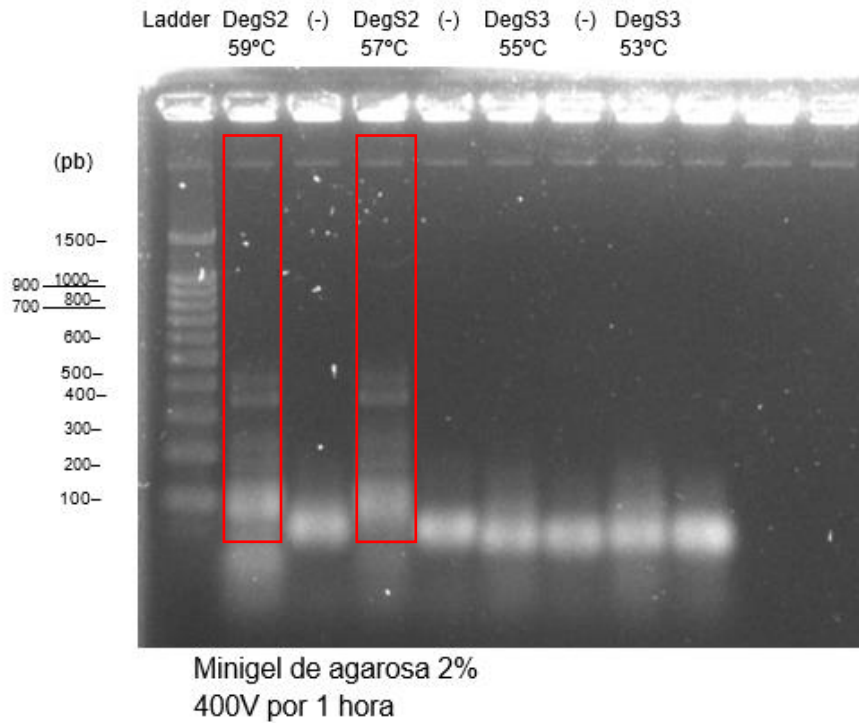


Figura 4. Gel del agarosa de los productos de RACE PCR del ADNc de *C. ecuatoriana* con el primer DEG-S2 a 59°C y 57°C y con el primer DEG-S3 a 55°C y 53°C. En rojo se enmarca el producto de PCR con el tamaño de banda esperado para un péptido antimicrobiano.

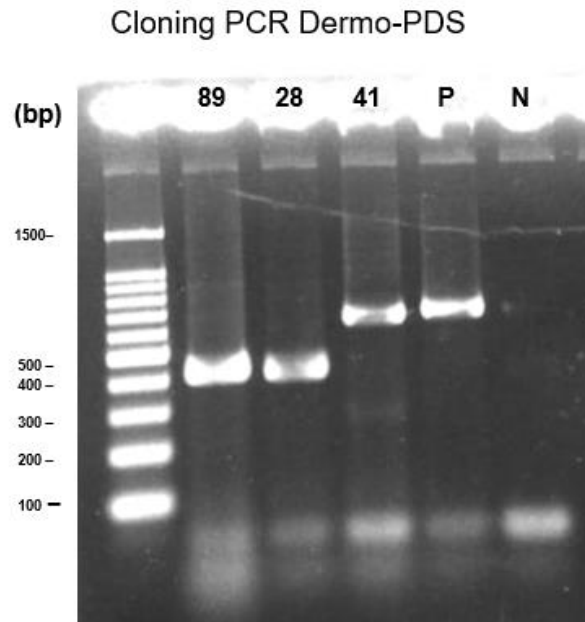


Figura 5. Gel del agarosa de los productos de Cloning PCR del plásmido recombinante de los clones con el primer Dermo-PDS. En rojo se enmarca el plásmido de un clon con el inserto.

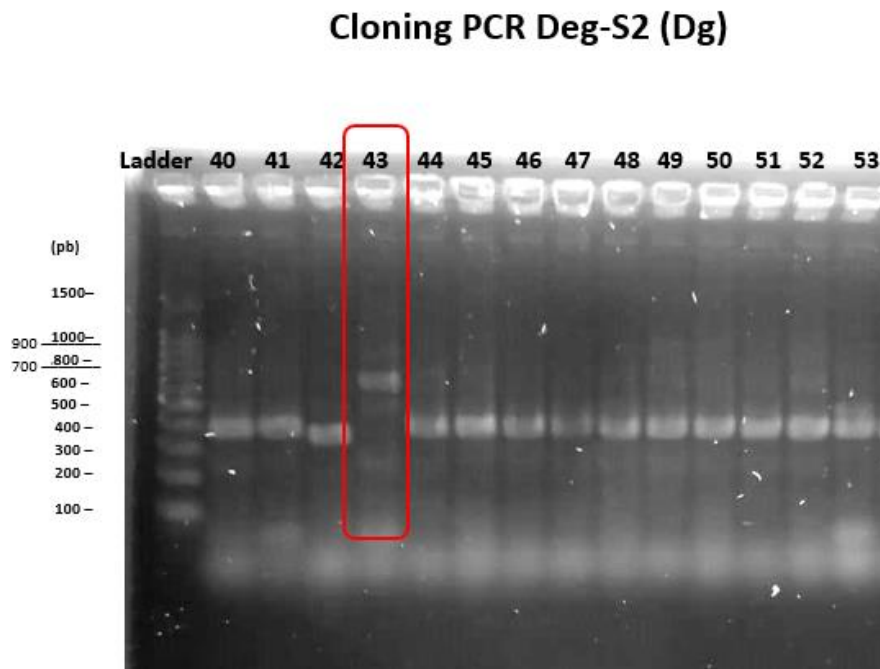


Figura 6. Gel del agarosa de los productos de Cloning PCR del plásmido recombinante de los clones con el primer DEG-S2. En rojo se enmarca el plásmido de un clon con el inserto.


```

Ikiam 2599      -----ATGTCTTCTTTGAAGAAATCACTTTTCCTGGCTCTGTTCCTCGGAATAGTTT 52
Picturin-2      GACCAAAGATGTCTTTCTTTGAAGAAATCACTTTTCCTGGTTCTGTTCCTCGGAATAGTTT 60
Picturin1      -----TCACTTTTCCTGGTTCTGTTCCTCGGAATAGTTT 34
Picturin-3      -----AAATCACTTTTCCTGGTTCTGTTCCTCGGAATAGTTT 37
                *****

Ikiam 2599      CCCTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGACAAGAAGAAGAGGAGAAGGAAGATGAAGAAT 112
Picturin-2      CCCTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGACAAGAAGAAGAGGAGAAGGAAGATGAAGAAT 120
Picturin1      CCCTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGACAAGAAGAAGAAGAGAAGGAAGATGAAGAAT 94
Picturin-3      CCCTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGACAAGAAGAAGAGGAGAAGGAAGATGAAGAAT 97
                *****

Ikiam 2599      ATGAAGAGGGATATGAAGCAAGTGAAGAAAAGAGAGGAGTCTTCAAAGACGCCTTAAAC 172
Picturin-2      ATGAAGAGGGATATGAAGCAAGTGAAGAAAAGAGAGGAGTCTTCAAAGACGCCTTAAAC 180
Picturin1      ATGAAGAGGGATATGAAGCAAGTGAAGAAAAGAGAGGAGTCTTCAAAGACGCCTTAAAC 154
Picturin-3      ATGAAGAGGGATATGAAGCAAGTGAAGAAAAGAGAGGAGTCTTCAAAGACGCCTTAAAC 157
                *****

Ikiam 2599      AATTGGTGCAGCACTTCCTGATAAAGCTGCCAATGCTCTTAAACCAAAGTAATGTCTCA 232
Picturin-2      AATTGGTGCAGCACTTCCTGATAAAGCTGCCAATGCTCTTAAACCAAAGTAATGTCTCA 240
Picturin1      AATTGGTGCAGCACTTCCTGATAAAGCTGCCAATGCTCTTAAACCAAAGTAATGTCTTA 214
Picturin-3      AATTGGTGCAGCACTTCCTGATCAAGCTGCCAATGCTCTTAAACCAAAGTAATGTCTCA 217
                **** ***** *

Ikiam 2599      TCAATAAGGAGCATACTTATCATTGATCGTGCCAGACATATAATAAAGCATATTAATAAAA 292
Picturin-2      TCAATAAGGAGCATACTTATCATTGATCGTGCCAGACATATAATAAAGCATATTATCAAAA 300
Picturin1      TCAATAAGGAACATACTTATCATTGATCGTGCCAGACATATAATAAAGCATATTATCTGA 274
Picturin-3      TCAATAAGGAGCATACTTATCATTGATCGTGCCAGACATATAATAAAGCATATTATCTGA 277
                *****

Ikiam 2599      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 318
Picturin-2      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 325
Picturin1      TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 305
Picturin-3      CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 309
                *****

```

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del marco abierto de lectura de los precursores del nuevo péptido Ikiam 2599 y tres miembros de la familia Picturinas. La región correspondiente al péptido señal se encuentra subrayado, la región ácida se muestra en cursiva y la región del péptido maduro en negrita. En asterisco se señalan los nucleótidos idénticos.

P.e PSN	-----ATGGCTTTCTT T AAGAAATCTCTTTTCCTTGACTATTCCCTTGG	44
PSN-7	<u>TTTTCCCAGCCCAAACATGGCTTTCTTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGACTATTCCCTTGG</u>	60
PSN-8	-----CAGCCCAAACATGGCTTTCTTGAAGAAATCTCTATTTCCTTGACTATTCCCTTGG	54
PST-PT	-----ATGGCTTTCATTAAGAAATCTCTTTTCCTTGACTATTCTTTGG	44
	***** * *****	
P.e PSN	<u>ATTGGTTTCCTTTCCATCTGT</u> GAAGAAGAGAAAAGAGAGACTGAAGAG A AAGAAAATGA	104
PSN-7	<u>ATTGGTTTCCTTTCCATCTGT</u> GAAGAAGAGAAAAGAGAGACTGAAGAGGAGGAAAATGA	120
PSN-8	<u>ATTGGTTTCCTTTCCATCTGT</u> GAAGAAGAGAAAAGAGAGACTGAAGAGGAGGAATATAA	114
PST-PT	<u>ATTGGTTTCCTTTCCATCTGT</u> GAAGAAGAGAAAAGAGAGACTGAAGAGAAAAGAAAATGA	104
	***** * *** * *	
P.e PSN	GCAAGAGGATGACGATAAAAAGTGAAGAGAAGAGAT TTCTT GAGCTTGATACCAC A TGCAAT	164
PSN-7	GCAAGAGGATGACGATAAAAAGTGAAGAGAAAAGAT TTCCCTCAGCTTGATACCACAT TGCAAT	180
PSN-8	TCAAGAGGATGACGATAAAAAGTGAAGAGAAGAGAT TTCCCTCAGCTTGATACCAACT TGCAAT	174
PST-PT	TCAAGAGGATGACGATAAAAAGTGAAGAGAAGAGAT TTCCCTCAGCTTGATACCAAGATAGC	164
	***** * ***** *	
P.e PSN	AAATGCAGTATCTGCA CTTGCTAAACATTT TGGT TAAATGCAATGTAATATTTCAACTC	224
PSN-7	AAATGCAGTATCTGCAAT TGCTAAACATTT CGGT TAAATACAATGTATCATTTTCATTTTCAT	240
PSN-8	AAATGCAGTATCTGCACT TGCTAAACATTT CGGT TAAATACAATGTAACATTT----CAT	229
PST-PT	AGGTGGAATAGCTGCTCTTGCTAAACATTTAGGT TAAATACAATGTAACATTTTCATA----	220
	* * * * * ***** * ***** * ***** * *	
P.e PSN	T-----ATGAACAAAATTATCAATAATTGTCCCCAAAATACATTAAAGCATATTTAACT	278
PSN-7	AACTCTAAGGAACGCAATTATCCATAATTGTCCCCAAAATACATTAAAGTATATTTAGCG	300
PSN-8	AACTTTAAGGAACGCAATTATCAATAATTGTCCCCAAAATACATTAAATGATATTTAGCC	289
PST-PT	-ACTCTAAGGAGCACAATTATCCATAATTGTCCCCAAAATATATTAAGCATATTTAAACC	279
	* * * * * ***** * ***** * ***** *	
P.e PSN	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----	306
PSN-7	AGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----	326
PSN-8	AGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----	314
PST-PT	AACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	310
	* *****	

Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del marco abierto de lectura de los precursores de péptidos Phylloseptinas. El péptido señal se encuentra subrayado, la región ácida se muestra en cursiva y la región del péptido maduro en negrita. En asterisco se señalan los nucleótidos idénticos. PSN y PST es nombre corto para Phylloseptina.