



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

**“Caracterización funcional del péptido dermaseptina-
CC1 de la secreción de la piel de la rana espléndida
Cruziohyla calcarifer”**

Joselin Viviana Cabrera Valarezo

Tutora: PhD. Carolina Proaño Bolaños

Napo - Ecuador

2022

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 25 de Febrero de 2022

Yo, Joselin Viviana Cabrera Valarezo con documento de identidad N° 0706667425, 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:

A handwritten signature in blue ink, reading "Joselin Valarezo". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underlining the name.

Joselin Viviana Cabrera Valarezo

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización funcional del péptido dermaseptina CC1 de la secreción de la piel de la rana espléndida *Cruziohyla calcarifer*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Joselin Viviana Cabrera Valarezo, 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, 25 de Febrero de 2022

Firma:

.....

Carolina Proaño Bolaños

C.I: 1714818760

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos más sinceros para mi directora de tesis la profesora Carolina Proaño, PhD por haberme dado la oportunidad de ser su tesista y haber dirigido la presente investigación a pesar del corto tiempo que había, agradezco mucho su esfuerzo y dedicación. También agradezco al Proyecto “Conservación de Anfibios y Recursos Genéticos” (PARG) e Ikiam por haber financiado esta tesis, me siento muy feliz de contribuir con la conservación de la biodiversidad.

Agradezco el acompañamiento y cariño de Nina Espinosa de los Monteros y Giovanna Morán por enseñarme y guiarme durante todo el tiempo que compartí con ellas en el laboratorio, me hicieron recordar lo mucho que amo la Biotecnología.

Agradezco a los profesores Rafael de Almeida y Fabián Aguilar por su motivación, dedicación, cariño y empatía, me llevo todo lo aprendido y lo compartiré para el resto de mi vida.

A mis compañeras del laboratorio y también mis amigas Nico, Gaby, Daya, Made, Slendy, Anghe, Yuly, Caro y Joss por brindarme su amistad y una sonrisa cuando más lo necesitaba. Especialmente a Nico, Gaby y Made, gracias por enseñarme a confiar y por confiar en mí. A la Dra. Amanda Pereira y la Psic. Maritza Constante por haberme brindado su apoyo y cariño, gracias por hacerme sentir en casa aun cuando estaba lejos de ella.

Finalmente agradezco a mi hermosa familia por ser mi soporte en este proceso. A mis padres y mi hermano, a mis tíos Mariana, Verónica, Jorge, Roberto, Zulema y Patricio y mis amados abuelitos Carmen y Jaime; gracias por darme tanto amor y formarme en la persona que ahora soy.

Gracias a todas las personas que he mencionado aquí, ustedes me inspiran a mejorar cada día.

DEDICATORIA

Con todo mi amor les dedico mi tesis a mi Dios amado y mi familia, mis padres María y Hernán; mi hermano Ariel y mi hermanita María Cristina que siempre la llevo en mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad.....	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	viii
Abstract.....	xi
Resumen.....	x
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Dermaseptinas: definición, características y mecanismo de acción.....	1
1.1.2 <i>Cruziohyla calcarifer</i>	4
1.1.3 <i>Cruziohyla calcarifer</i> : fuente potencial de péptidos antimicrobianos.....	5
1.2 Planteamiento del problema a investigar.....	5
1.3 Justificación de la investigación.....	6
1.4 Objetivos de la investigación.....	7
1.4.2 Objetivo general.....	7
1.4.3 Objetivos específicos.....	7
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	8
2.1 Análisis bioinformáticos.....	8
2.2 Producción de dermasetina-CC1 sintética.....	8
2.3 Purificación del péptido por cromatografía FLASH.....	9
2.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	9
2.5 Confirmación de pureza del péptido con HPLC de fase reversa.....	9
2.6 Determinación de Concentración inhibitoria mínima (MIC).....	9
2.7 Ensayo de hemólisis.....	10

CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	11
3.1 Análisis Bioinformáticos.....	11
3.2 Síntesis y purificación de dermaseptina CC1.....	18
3.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC).....	19
3.4 Hemólisis.....	20
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Análisis bioinformáticos.....	21
4.2 Propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana de la dermaseptina CC1.....	21
4.3 Toxicidad de la dermaseptina CC1.....	24
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	26
REFERENCIAS.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico químicas del péptido sintético dermaseptina CC1.....	11
Tabla 2. Comparación de la secuencia de nucleótidos de DMS-CC1 con otros péptidos pertenecientes a la familia dermaseptina de acuerdo a BLAST/n (nucleótido-nucleótido).....	13
Tabla 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de DMS-CC1 con otros péptidos pertenecientes a la familia dermaseptina de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espécimen de <i>Cruziohyla calcarifer</i>	4
Figura 2. Interacción del péptido α -hélice anfipático con la membrana plasmática bacteriana.....	7
Figura 3. Predicción de rueda helicoidal del péptido sintético DMS-CC1	12
Figura 4. Predicción de la estructura secundaria del péptido DMS-CC1 mediante PSIPred.....	12
Figura 5. Pureza de la dermaseptina CC1 sintetizada evaluada mediante HPLC.....	18
Figura 6. Análisis de masas del producto de síntesis del péptido dermaseptina-CC1 obtenido mediante MALDI-TOF MS.....	18
Figura 7. Pureza de la dermaseptina CC1 purificada por cromatografía FLASH	19
Figura 8. Análisis de masas del péptido puro dermaseptina-CC1 obtenido mediante MALDI-TOF MS.....	19
Figura 9. MIC de la dermaseptina CC1 contra <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>C.albicans</i> , <i>K.pneumoniae</i> y <i>P. aeruginosa</i>	20
Figura 10. Actividad hemolítica del péptido sintético DMS-CC1.....	20
Figura 11. Mecanismo de acción de las dermaseptinas sobre las bacterias Gram negativas.....	23

RESUMEN

Las dermaseptinas son una gran familia de péptidos antimicrobianos secretados por la piel de las ranas pertenecientes a la familia *Phyllomedusidae*. Estos péptidos cumplen la función de defensa frente a patógenos, por lo tanto, actúan sobre microorganismos como virus, hongos, bacterias y parásitos. Este trabajo presenta la caracterización funcional de la dermaseptina-CC1 de la especie *Cruziophyla calcarifer*. Este péptido fue sintetizado químicamente y luego se determinó su potencia, rango de acción y toxicidad en eritrocitos. Adicionalmente, se realizaron análisis bioinformáticos para obtener las características fisicoquímicas y similitud de secuencias con dermaseptinas conocidas en bases de datos (NCBI, UniProt). Los resultados muestran que la dermaseptina CC1 es un péptido catiónico que tiene una α -hélice anfipática con carga neta +3, con una secuencia que difiere de las dermaseptinas presentes en las bases de datos, alcanzando un 85 % de identidad y compartiendo características como un triptófano conservado en el tercera posición y motivos de consenso de la región media. La dermaseptina CC1 mostró actividad para todos los microorganismos utilizados en este estudio (cepas ATTC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*), siendo más potente contra bacterias Gram negativas con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 2,25 μ M contra *E. coli* y 9,02 μ M contra aislados clínicos resistentes a ampicilina (*K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*), sin actividad hemolítica. Este estudio presenta la dermaseptina CC1 como un péptido potencial para desarrollar tratamientos terapéuticos enfocados a combatir la resistencia bacteriana.

Palabras claves: *Cruziophyla calcarifer*, dermaseptina, actividad antimicrobiana, cationicidad, α -hélice

ABSTRACT

Dermaseptins are a large family of antimicrobial peptides secreted by the skin of frogs belonging to the Phyllomedusidae family. These peptides fulfill the function of defense against pathogens, therefore, they act on microorganisms such as viruses, fungi, bacteria and parasites. This work presents the functional characterization of dermaseptin-CC1 from the species *Cruziohyla calcarifer*. This peptide was chemically synthesized and then its potency, range of action, and toxicity were determined in erythrocytes. Additionally, bioinformatic analyzes were performed to obtain the physicochemical characteristics and sequence similarity with known dermaseptins in databases (NCBI, UniProt). The results show that dermaseptin CC1 is a cationic peptide that has an amphipathic α -helix with net charge +3, with a sequence that differs from the dermaseptins present in the databases, reaching 85 % identity and sharing characteristics such as a conserved tryptophan in the third position and mid-region consensus motifs. The dermaseptin CC1 showed activity for all the microorganisms used in this study (ATTC strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, and clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*), being more potent against Gram-negative bacteria with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.25 μ M against *E. coli* and 9.02 μ M against clinical isolates resistant to ampicillin (*K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*), without hemolytic activity. This study presents dermaseptin CC1 as a potential peptide to develop therapeutic treatments focused on combating bacterial resistance.

Keywords: *Cruziohyla calcarifer*, dermaseptin, antimicrobial activity, cationicity, α -helix

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Dermaseptinas: definición, características y mecanismo de acción

Los péptidos antimicrobianos son moléculas que contienen entre 12 y 50 residuos de aminoácidos y poseen características catiónicas y anfifílicas que facilitan o tienen actividad antimicrobiana. La función de estos péptidos es actuar en defensa del huésped contra patógenos como bacterias, hongos, virus y parásitos [1,2,3]. Estos péptidos pueden ser producidos por una amplia variedad de organismos desde bacterias hasta humanos [1,2].

Las dermaseptinas son una familia de péptidos antimicrobianos catiónicos secretados a través de la piel de las ranas arbóreas de Sudamérica de la familia *Phyllomedusidae* de la cual el género *Phyllomedusa* y *Agalychnis* han sido ampliamente estudiados y recientemente se ha encontrado dermaseptinas en la especie *Cruziohyala calcarifer* [1, 2, 4, 5]. La función de estos péptidos es defensa contra los patógenos microbianos a los que se encuentra expuesta la piel de estas ranas [6]. Las dermaseptinas se derivan de una pre-prosecuencia peptídica, secuencia de un precursor peptídico, que posee la región N-terminal conservada y variedad en los dominios carboxiterminales [2,6]. Esta familia de péptidos comparten un patrón conservado en sus secuencias que consta de un residuo de Triptófano en la tercera posición y de un motivo consenso AG(A)KAAL(V/G)G(N/K)AV(A) en la región media [3].

En 1991 se aisló y caracterizó estructuralmente la primera dermaseptina de la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagii* y se denominó como dermaseptina S1 [1,7]. Se obtuvo una estructura de 34 residuos de aminoácidos (ALWKTM LKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ) con una masa molecular de 3455 Dalton [7]. La dermaseptina S1 contenía un residuo de triptófano y podía formar una hélice alfa anfipática en medio ácido [7]. Desde este año los estudios continuaron gradualmente, siendo así que en el año 2009 se identificaron 49 dermaseptinas y hasta la actualidad se han identificado más de 240 en la base de datos UniProt [2, 8]. El mecanismo de acción de las dermaseptinas se basa en la transición de hélice-ovillo de este péptido que le

permite unirse a las capas lipídicas y destruir la membrana del patógeno, lo cual lo lleva a la muerte (9). Cada péptido de la familia dermaseptina actúa sobre una gran variedad de microorganismos lo que ha permitido el desarrollo de varias investigaciones en las cuales se ha registrado actividad biológica contra virus, hongos, bacterias y parásitos [2, 9,21].

Estudios realizados con dermaseptinas han demostrado que esta familia de péptidos posee actividad antiviral [9]. La dermaseptina S4 aislada de la especie *P. sauvagii* tiene actividad contra el virus de herpes simple tipo 2 (HSV-2) en células Vero mostrando un fuerte efecto en las cepas sensibles y resistentes a Aciclovir con un EC₅₀ de 2,10 µM y 6 µM respectivamente [10]. Así mismo, la dermaseptina S4 es capaz de inhibir la entrada del virus del VIH tipo 1 en células endometriales humanas Hec-1 sin interacción específica con la partícula viral, lo que impediría la resistencia frente a dermaseptina [11]. Estudios recientes *in vitro*, han demostrado que la dermaseptina S9 proveniente del género *Phyllomedusa* es capaz de prevenir la infección viral del SARS-CoV-2 a través de la unión de este péptido con el receptor ACE-2 (enzima convertidora de Angiotensina 2) e impedir que este se una con la proteína Spike (S) del virus [12].

Las dermaseptinas han demostrado tener actividad anti fúngica contra hongos filamentosos y levaduras [9]. Por ejemplo, las dermaseptina b y su forma precursora dermaseptina B aisladas de la especie *Phyllomedusa bicolor* poseen actividad contra los hongos *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y la levadura *Candida albicans*; siendo la dermaseptina b la que mostró mayor actividad, especialmente contra *C. neoformans* y *M. canis* con un MIC de 0,63 µM [13]. De la misma manera, la dermaseptina S3 aislada de esta misma especie tiene la actividad antimicótica en las levaduras (usando como organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*) presentando daño el ADN [14]. Otro estudio basado solo en dermaseptinas indicó la actividad antimicótica en los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* con un MIC mayor a 25 µM y un LD₅₀ de 0.05 a 4 µM [15]. Estudios más recientes han

demostrado que la dermaseptina SP2 (DRS-SP2) aislada de *Agalychnis spurrelli* posee actividad antimicótica contra *Candida albicans* con un MIC de 10,7 μM [16].

En cuanto a la actividad antibacteriana, las dermaseptinas han demostrado tener actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [9]. Las dermaseptinas s1, s2, s3 y s4 indicaron actividad contra *Escherichia coli* siendo s3 y s1 las que presentaban actividad más potente con un MIC de 0,8 y 1,5 μM respectivamente [17]. Otro ejemplo, son las dermaseptinas K4-S4 (1-13) y K4-S4 (1-16) que poseen actividad contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* dado que 20 μM del péptido redujo en 30 minutos seis unidades logarítmicas de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) viables [18]. Por otro lado, la dermaseptina AC aislada de la secreción cutánea de *A. callidryas* posee actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* con 2 μM y contra *P. aeruginosa* 4 μM [19]. Asimismo, la dermaseptina B4 aislada de *Phyllobates bicolor* mostró actividad antibacterial contra *S.aureus*, *E.coli* y *P. aeruginosa* con un MIC de 3, 5 y 11,6 μM respectivamente [20]. Estudios más recientes han demostrado que la dermaseptina SP2 aislada de *A. spurrelli* presenta actividad contra *E. coli* y *S. aureus* con un MIC de 2,68 μM [16].

Las dermaseptinas han manifestado poseer actividad antiparasitaria [21]. La dermaseptina S4 aislada de la especie *P. sauvagii* tiene actividad contra el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* mostrando una fuerte potencia los análogos K₄K₂₀-S₄ y K₄S₄(1-13) con un IC₅₀ de 0,2 μM y 6 μM respectivamente, siendo más efectivos en la etapa de trofozoito de este parásito [22]. Así mismo, las dermaseptinas S4 y S3 aisladas del género *Phyllomedusa* se evaluaron sobre *P. falciparum* resistente a hidroxiclороquina, dando como resultado en un IC₅₀ de 1,5 μM y 2 μM respectivamente [23]. Por otro lado, investigaciones en la dermaseptina S01 proveniente de la especie *Phyllomedusa oreades* mostró efecto antiparasitario contra *Trypanosoma cruzi*, al reducir la población a un nivel casi indetectable a una concentración de $\sim 6 \mu\text{M}$ en la etapa de tripomastigote del parásito [24]. Otro estudio similar ha demostrado que la dermaseptina s1 aislada de la especie *Phyllomedusa sauvagii* pose actividad contra *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani* con un IC₅₀ de $> 20 \mu\text{M}$ en la etapa de amastigotes en ambas especies [25].

1.1.2 *Cruziohyla calcarifer*

Cruziohyla calcarifer es una especie perteneciente a la familia Phyllomedusidae conocida como “rana de árbol esplendida” (Figura 1). Esta especie se distribuye a lo largo de las costas del Caribe, desde Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá hasta Ecuador. En Ecuador, esta especie habita en el bosque Húmedo Tropical del Chocó y el Bosque Piemontano Occidental en la provincia de Esmeraldas [26,5]. Esta rana es arbórea y se caracteriza por tener discos expandidos al final de los dedos, pupilas verticales, calcares prominentes en sus talones y coloración ventral anaranjado brillante. Esta especie es de tamaño pequeño a medio con cuerpo alargado, es nocturna asociada al dosel de los árboles primarios por lo cual, es difícil encontrarla, y su reproducción ocurre en épocas lluviosas en los meses de marzo a octubre [26].



Figura 1. Espécimen de *Cruziohyla calcarifer*. Ron SR. bioweb.bio

La especie *Cruziohyla calcarifer* ocurre en zonas restringidas y su población se encuentra en disminución [27]. Un ejemplo de esto es que La Global Biodiversity Information Facility (GBIF) ha registrado 105 especímenes de *Cruziohyla calcarifer* hasta el año 2018 en las costas del Caribe de las cuales 34 especies pertenecen a Ecuador [28]. Por otro lado, en el Museo de Zoología QCAZ del Ecuador se registraron 45 especímenes hasta el año 2007 [26]. Por estos motivos, su categoría de Preocupación Menor está siendo evaluada por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) [29] y en Ecuador es catalogada como casi amenazada en la Lista Roja de Anfibios del Ecuador [27].

1.1.3 *Cruziohyla calcarifer*: fuente potencial de péptidos antimicrobianos

Cruziohyla calcarifer es una especie perteneciente a la familia Phyllomedusidae que ha demostrado actividad antimicrobiana y presencia de péptidos en la secreción de su piel [30, 31, 5]. La actividad antimicrobiana se presentó en secreciones de la piel con altas concentraciones proteicas contra bacterias como *Shigella sp*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y estreptococos [30]. En cuanto a la presencia de péptidos, se ha identificado y aislado nueve péptidos como son: medusina CC1, filoquinina CC, PR CC1, péptidos largos alfa helicoidales, filoseptina-CC1, plasticinas-CC1 y CC2, triptofilina CcT2, cruzioseptina y dermaseptina CC1. De las cuales la dermaseptina CC1 fue la primer dermaseptina aislada para *C. calcarifer* [30, 31, 32].

Se encontró que esta dermaseptina identificada por Proaño (2016) posee similitud con tres especies de anfibios de dos géneros diferentes y contiene potencial antimicrobiano. En la dermaseptina CC1 se identificó un 86 % de similitud péptidos como son: dermaseptin sVI, adenoregulina y con péptidos relacionados con dermaseptinas que corresponden a las especies de *Phyllomedusa sauvagii*, *Agalychnis dacnicolor* y *Phyllomedusa bicolor* respectivamente [31].

1.2 Planteamiento del problema a investigar

La resistencia bacteriana es la adaptación de las bacterias para crecer en presencia de los antibióticos y constituye una amenaza para la salud mundial [33]. En los países con ingresos medios y bajos las enfermedades infecciosas bacterianas representan el 60 % de las causas de muerte, incrementando el uso de antibióticos y consecuente la resistencia de los mismos [34]. En el año 2015, en el mundo murieron aproximadamente 70 000 personas debido a enfermedades causadas por la resistencia a antibióticos y para el año 2050 se estima que estas cifras se incrementen a diez millones de muertes al año [35]. En cuanto a Ecuador, desde el año 2010 al 2018 se registraron 55 104 casos hospitalarios por resistencia bacteriana [36] que incluían patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* señaladas por la OMS como prioritarios [33]. En este mismo año en el país, la resistencia bacteriana se

incrementó en un 33 % en comparación con el año 2017 [37]. Actualmente, en Ecuador las enfermedades infecciosas representan la quinta causa de muerte, de las cuales la más representativa es la neumonía bacteriana seguida de enfermedades virales como la influenza [38]. Así, en el país las terapias disponibles para combatir la resistencia bacteriana son escasas y la infraestructura para realizar análisis microbiológicos para identificar estos patógenos es inadecuada [39]; añadido a esto las desigualdades sociales y económicas contribuye al uso indebido y excesivo de los antibióticos que aumentan la resistencia bacteriana en el país [33, 37, 40].

1.3 Justificación de la investigación

La resistencia bacteriana constituye un problema de atención prioritaria en los países en vías de desarrollo donde el desconocimiento y desigualdades sociales incrementan la resistencia bacteriana en la población [40]. Para combatir esta problemática se han desarrollado algunas soluciones como son la combinación de antibióticos y la creación de antibióticos última generación, los cuales se emplean para combatir las bacterias cuando los antibióticos convencionales no dan resultado [41]. Sin embargo, las bacterias continúan desarrollando resistencia, por lo cual es necesario buscar soluciones alternativas. Es así que para combatir esta resistencia bacteriana una nueva opción sería la implementación de péptidos antimicrobianos [9]. Estos péptidos antimicrobianos son capaces de destruir o penetrar la membrana bacteriana rápidamente en comparación con los antibióticos que necesitan de tiempos más prolongados para poder actuar [18]. Además, la actividad biológica de estos péptidos se basa en las propiedades fisicoquímicas lo que hace que desarrollar resistencia en las bacterias sea más difícil, lo que no ocurre con los antibióticos [18]. Estos motivos hacen que los péptidos sean ideales como una nueva opción para formular antibióticos [9, 2, 18]. Especialmente las dermaseptinas de las cuales se ha comprobado anteriormente su amplio espectro para combatir diferentes cepas bacterianas [2,18]. Así, la dermaseptina CC1 aislada de la especie *Cruziohyala calcarifer* por Proaño (2016) se convierte en una nueva opción para combatir la resistencia bacteriana debido a que en base a las propiedades fisicoquímicas se estimó que la dermaseptina CC1 conforma una alfa hélice anfipática que como

consecuencia permitiría la actividad antimicrobiana (Figura 2), siendo necesario corroborar esta actividad biológica en nuevas investigaciones [31].

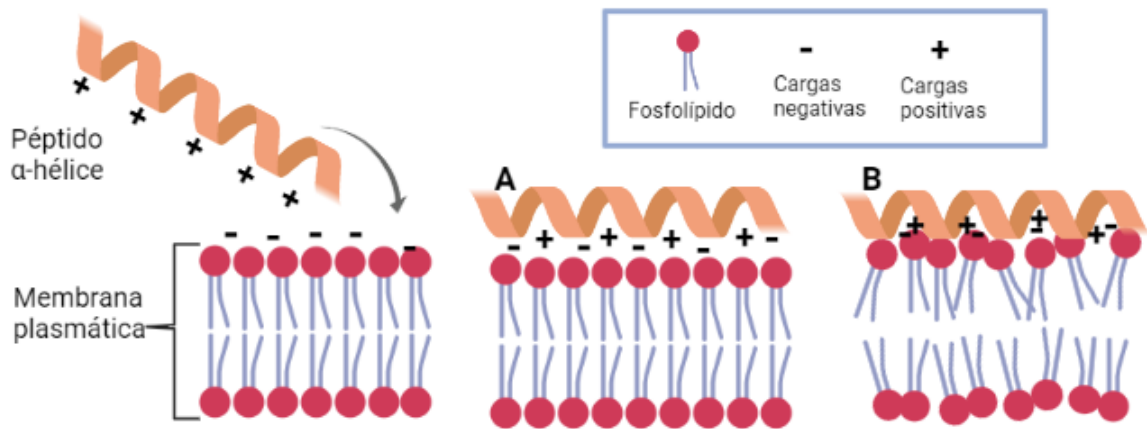


Figura 2. Interacción del péptido α -hélice anfipático con la membrana plasmática bacteriana. A: El péptido cargado positivamente en su cara polar interactúa con la membrana plasmática cargada negativamente por los fosfolípidos. B: El péptido ocasiona pérdida de la integridad de la membrana que posteriormente puede llevar a la muerte bacteriana. Adaptada en base a la información descrita por Bartels E J H, Dekker D, Amiche M (2019) [9].

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.2 Objetivo general

- Caracterizar funcionalmente al péptido sintético dermaseptina CC1 proveniente de la secreción de la piel de la rana *Cruziohyala calcarifer*

1.4.3 Objetivos específicos

- Determinar la concentración inhibitoria y bactericida mínima del péptido dermaseptina CC1 contra cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans* y aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*
- Evaluar la toxicidad del péptido sintético mediante un ensayo hemolítico
- Analizar la secuencia de la dermaseptina-CC1 empleando herramientas bioinformáticas.

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Análisis bioinformáticos

La secuencia del péptido dermaseptina CC1 se comparó con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) empleando la herramienta de Blast/n y Blast/p. Se analizó la secuencia de nucleótidos y se realizó la predicción de la estructura secundaria se realizó usando SOPMA y PSIPred. Las propiedades fisicoquímicas del péptido se calcularon usando HeliQuest y Peptide property calculator v.3.1.

2.2 Producción de dermasetina-CC1 sintética

El péptido dermaseptina-CC1 (DMS-CC1), GLWSIIKTVGKLAAKEAAGAAGKAALNTVAEKVNE GEK-amida, en base a la información prevista por Proaño (2016), fue sintetizado previamente mediante la técnica de síntesis en fase sólida con el grupo protector Fmoc, usando un sintetizador automático de péptidos (Liberty Blue, CEM). Para sintetizar 0,1 mmol del péptido se utilizó 0,526 g de resina Fmoc Rink Amide LL (ProTide), N, N -dimetilformamida (DMF) como solvente principal y piperidina al 20 % como solvente de desprotección. En el acoplamiento de aminoácidos se usó 1.0 M de Oxima y 1.0 M de *N, N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como activadores y cada aminoácido en concentración de 0.2 M. Concluida la síntesis fue necesaria una fase de clivaje en donde se separe la cadena peptídica de la resina, utilizando 5 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) (92.5 %), triisopropilsilano (TIPS) (2.5 %), 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (DODT) (2.5 %) y agua (2.5 %). A continuación, se añadió 20 mL de dietil éter frío y se precipitó el péptido durante 24 h a -20 °C. Seguido a esto se centrifugó el péptido a 2000rpm durante 10 min, se descartó la fase líquida, se añadió 15 mL de dietil éter frío, se homogenizó la mezcla, y se repitió todo el procedimiento de lavado tres veces. Se dejó secar el péptido durante toda la noche para luego ser disuelto utilizando ácido acético al 10 %. Finalmente el péptido fue liofilizado y almacenado a -20°C. La pureza del péptido sintético se evaluó mediante HPLC en fase reversa y se confirmó la masa del péptido empleando MALDI-TOF MS.

2.3 Purificación del péptido por cromatografía FLASH

Se disolvieron 10 mg del péptido en 1 mL de solución A (99,90 % H₂O + 0,1 % ácido trifluoroacético v/v) y se mezcló por vórtex. Se filtró a través de una membrana de 0,45 µm y se inyectaron 800 µL empleando un cartucho Buchi Flash Pure, C18, 4 g (12.3 x 6 mm) para la cromatografía FLASH. Se usó un gradiente de elución de 10 % a 100 % de la solución B (99,90 % acetonitrilo + TFA 0,1 % v/v) por 60 minutos con un flujo de 2,5 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 a 280 nm. Las fracciones se colectaron en tubos de vidrio de 5 mL.

2.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se colocó 1 µL de matriz CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) en la placa de MALDI-TOF de 48 pocillos y se dejó secar. Luego se adicionó 2 µL de las fracciones obtenidas mediante cromatografía FLASH y se situó la placa en el espectrómetro de masas MALDI-TOF con un rango de 1000 a 4500 Da en modo reflectron.

2.5 Confirmación de pureza del péptido con HPLC de fase reversa

Se disolvió 0,5 mg del péptido sintético en 500 µL de solución A (99,95 % H₂O+0,05 % ácido trifluoroacético v/v) y mezcló por vórtex. Se filtró a través de una membrana de 0,22 µm y se usó 50 µL para el HPLC de fase reversa empleando una columna analítica Jupiter 5µm, C-18, 300 Å (4.6 x 250 nm). Se utilizó un gradiente de elución de 10 % a 100 % de la solución B (99,95 % acetonitrilo+TFA 0,05 % v/v) por 65 minutos con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 a 280 nm.

2.6 Determinación de Concentración inhibitoria mínima (MIC)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria para las bacterias *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y la levadura *C. albicans* ATCC 10231; y los aislados clínicos resistentes a ampicilina de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizaron diluciones seriadas del péptido DMS CC1 en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 x 10² mg/L. Cada microorganismo en su fase logarítmica se diluyó y se alcanzó 1x10⁶ (UFC)/mL para bacterias y 1x10⁵ (UFC)/mL para levaduras. Seguido se colocó 2 µL de cada dilución del

péptido y 198 µL del microorganismo en una placa estéril de 96 pocillos. Como control positivo se empleó 2 µL de DMSO en 198 µL del microorganismo y como control negativo 200 µL de caldo Mueller Hinton Broth (MHB). Se realizó 5 réplicas para cada concentración del péptido y dos repeticiones del experimento para confirmar los resultados. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h para promover el crecimiento de los microorganismos y se leyó la absorbancia a 550 nm en el lector de placas ELISA GloMax (Promega).

2.7 Ensayo de hemólisis

Se empleó eritrocitos humanos, grupo sanguíneo B+, para determinar la actividad hemolítica del péptido DMS CC1. Se lavaron los eritrocitos con tampón fosfato salino (PBS) y se diluyó con PBS para obtener una suspensión del 4 %. Se realizaron diluciones seriadas del péptido DMS CC1 en PBS para obtener las mismas concentraciones empleadas en el ensayo MIC. Realizadas estas diluciones se colocaron 200 µL de la suspensión al 4 % más 200 µL de las diluciones del péptido a cada concentración. Como control positivo se colocó 200 µL de la solución de eritrocitos al 4 %, 95 µL de PBS 1x y 5 µL de Triton X-100. Como control negativo 200 µL de PBS 1x más 200 µL de solución de eritrocitos. Se realizaron 5 réplicas para cada concentración del péptido, dos repeticiones del experimento para confirmar los resultados y se incubó a 37 °C por 120 minutos. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm y se transfirieron 200 µL del sobrenadante a una placa estéril de 96 pocillos. Posteriormente, se midió la lisis de los eritrocitos en un lector de placas GloMax (Promega) a una absorbancia de 570 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó según la siguiente fórmula:

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

Donde:

A: OD de la concentración de la dilución del péptido

A₀: OD Control negativo

A_x: OD Control positivo

CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Análisis Bioinformáticos

Las propiedades físico químicas del péptido dermaseptina CC1 se predijeron usando Peptide property calculator v.3.1, SOPMA y HeliQuest. Los valores de hidrofobicidad fueron calculados usando HeliQuest, siendo la hidrofobicidad de 0,253 con un momento hidrofóbico de 0,072 y una carga neta de +3 (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físico químicas del péptido sintético dermaseptina CC1.

Secuencia	GLWSIIKTVGKLAAKEAAKAAGKAALNTVAEKVNE
Número de aminoácidos	35
Masa teórica en Dalton	3549,0405
% de aminoácidos básicos	17,14
% de aminoácidos neutros	22,86
% de aminoácidos ácidos	8,57
% de aminoácidos hidrofóbicos	51,43
Carga neta z	3
% de hélice alfa	97,14
Hidrofobicidad H	0,252
Momento hidrofóbico μ H	0,07244

El porcentaje de residuos hidrofóbicos del péptido DMS-CC1 se identificó usando Peptide property calculator v.3.1 siendo 51, 43 %, así mismo con el software HeliQuest se realizó una predicción de rueda helicoidal en la cual se puede observar sus características anfipáticas (Figura 3). En cuanto a la estructura secundaria, mediante SOPMA se encontró que el 97, 14 % de los aminoácidos del péptido DMS-CC1 conforman una α -hélice, información acorde con la predicción de PSIPred (Figura 4).

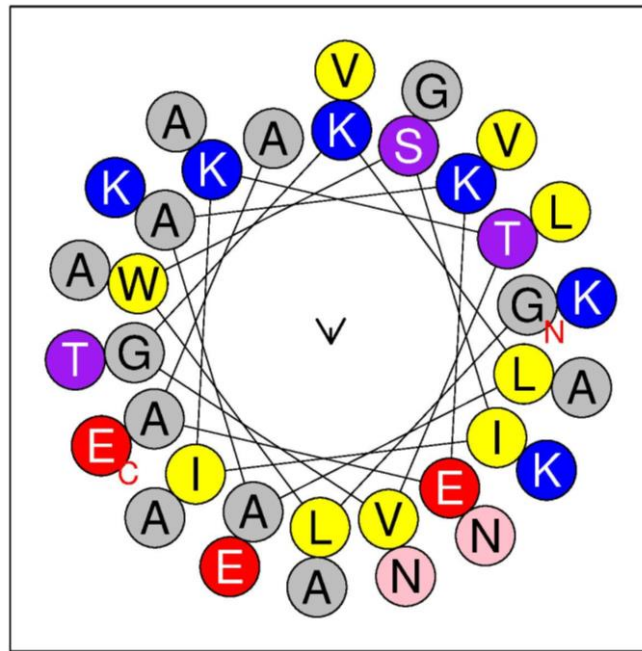


Figura 3. Predicción de rueda helicoidal del péptido sintético DMS-CC1. Los residuos hidrofóbicos/ no polares están en amarillo y los residuos polares en azul (básico) y rojo (ácido). La flecha indica el momento hidrofóbico neto.

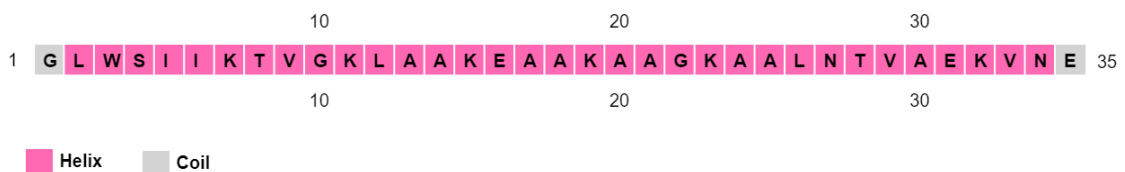


Figura 4. Predicción de la estructura secundaria del péptido DMS-CC1 mediante PSIPred. Los residuos de color rosado representan la formación de un α -hélice en la secuencia y el color gris los residuos que no tienen una conformación definida.

Así mismo, se comparó la secuencia de nucleótidos del péptido dermaseptina CC1 en la base de datos NCBI (Blast/n nucleótido-nucleótido) la cual arrojó un total de 65 secuencias de péptidos que compartían similitud, de estas se escogieron las 5 primeras secuencias (Tabla 2) de las cuales la dermaseptina PD2 (DMS-PD-2) correspondiente a la especie *Pachymedusa dactinicolor* obtuvo el valor E más alto ($9e-102$) con una cobertura y porcentaje de identidad de 95 % y 86,76 % respectivamente. En cuanto a la base de datos Uniprot se usó la herramienta Blastn (nucleótido-nucleótido) que arrojó 250 resultados, de estos se escogieron los 10 primeros (Tabla 3) de las cuales la dermaseptina B2 (DMS-B2) perteneciente a la especie *Phyllomedusa bicolor* obtuvo el valor E más alto ($1.9 e-45$) con un porcentaje de identidad del 85 %.

DMS-B4 . . . A . . . - - . C A C

301 350

DMS-CC1 A T A A T T T T - G C C A A A C C T A T A T T A A A G C A T A T T A A A C T A A A A A A A A A A A

DMS-PD- . . G . C . G . - T T C - G C A . . - G

2

DMS-PD- . . G . . . G A - T . C G C A C A G . . . - - - - -

3-3

DMS-AA- . . G . . . G . - T . C A G . . . - - - - -

3-6

DMS-CA- G . A . G T G A

1

DMS-B4 G . - . G G G T - - - - -

	#Acceso	Especie
DMS-CC1	A A A A A A A A A A A A A	<i>Cruziohyla calcarifer</i>
DMS-PD-2 - - - - - LN890479.1	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>
DMS-PD-3-3	- - - - - AJ005191.1	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>
DMS-AA-3-6	- - - - - AJ005188.1	<i>Agalychnis annae</i>
DMS-CA-1 MF955847.1	<i>Phyllomedusa camba</i>
DMS-B4	- - - - - Y16565.1	<i>Phyllomedusa bicolor</i>

. = Aminoácidos conservados, - = Gaps, Subrayado substitutiones sinónimas □, substitutiones no sinónimas □.

Tabla 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de DMS-CC1 con otros péptidos pertenecientes a la familia dermaseptina de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.

#Acceso	Péptido	Especie	1 Péptido señal																				22	
	DMS-CC1	<i>Cruziohyla calcarifer</i>	M	A	F	L	K	K	S	L	F	L	V	L	F	L	G	L	V	S	L	S	I	C
P31107	DMS-B2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
B6HY15	Adenoregulina	<i>Agalychnis callidryas</i>	L
Q7T3K9	DMS-S6	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	.	D	I	F	I	S
Q90ZK3	DMS-B7	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	.	.	S
O93453	DMS-DA3	<i>Agalychnis dacnicolor</i>
O93226	DMS-A5	<i>Agalychnis annae</i>
Q90ZK5	DMS-B8	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Q1EJP5	DMS-H4	<i>Pithecopus azureus</i>	.	.	.	M	M
J7H8J4	DMS-1	<i>Pithecopus nordestinus</i>	I	.	A	M
		<i>Pithecopus</i>
P84596	DMS-H3	<i>hypochondrialis</i>	M
			23 Espaciador ácido																				44	
	DMS-CC1	<i>Cruziohyla calcarifer</i>	E	E	E	K	R	E	H	E	D	E	E	E	Q	E	D	D	D	Q	S	E	E	K
P31107	DMS-B2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	N	E	.	.	.	M	.
B6HY15	Adenoregulina	<i>Agalychnis callidryas</i>	N	E	.	.	.	M	.
Q7T3K9	DMS-S6	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	N	.	.	.	D	E
Q90ZK3	DMS-B7	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	N	E	.	.	.	M	.
O93453	DMS-DA3	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	N	E
O93226	DMS-A5	<i>Agalychnis annae</i>	N	E	.	.	.	M	.
Q90ZK5	DMS-B8	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	N	E	.	.	.	M	.
Q1EJP5	DMS-H4	<i>Pithecopus azureus</i>	N	.	.	A	K	E	.	.	.	M	.
J7H8J4	DMS-1	<i>Pithecopus nordestinus</i>	N	G	E	.	.	.	M	.
		<i>Pithecopus</i>	N
P84596	DMS-H3	<i>hypochondrialis</i>	N	.	.	L	E	.	.	.	M	.

			45	46	Péptido maduro												66									
	DMS-CC1	<i>Cruziohyla calcarifer</i>	R	G	L	W	-	S	I	I	K	T	V	G	K	L	A	A	K	E	A	A	K	A		
P31107	DMS-B2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	K	.	.	E	.	.	.	E	.	.	.	A		
B6HY15	Adenoregulina	<i>Agalychnis callidryas</i>	.	.	M	.	.	.	K	.	.	E	A	.	.	A	.	.	.	A		
Q7T3K9	DMS-S6	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	K	.	.	.	A	.	.	E	.	.	.	A		
Q90ZK3	DMS-B7	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	N	.	.	.	A	.	.	E	.	.	.	A	.	L	.	.		
O93453	DMS-DA3	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	.	.	M	.	.	.	K	.	.	N	A	.	.	A	.	.	.	A	S	K	.	.		
O93226	DMS-A5	<i>Agalychnis annae</i>	.	.	M	.	.	.	T	.	R	N	.	.	.	S	.	.	.	A	.	N	L	P		
Q90ZK5	DMS-B8	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	K	.	.	E	A	.	.	-	-	-	.	A	.	L	T	.		
Q1EJP5	DMS-H4	<i>Pithecopus azureus</i>	T	.	.	N	.	.	.	-	-	-	.	.	.	I	.	.		
J7H8J4	DMS-1	<i>Pithecopus nordestinus</i>	T	.	.	N	.	.	.	-	-	-	.	.	.	I	.	.		
		<i>Pithecopus</i>	T	.	.	N	.	.	.	-	-	-	.	.	.	I	.	.		
P84596	DMS-H3	<i>hypochondrialis</i>	T	.	.	N	.	.	.	-	-	-	.	.	.	I	.	.		
			67																							
	DMS-CC1	<i>Cruziohyla calcarifer</i>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	N	T	V	A	E	K	V	N	E	G	*							
P31107	DMS-B2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	G	A	.	S	.	A	.	G	.	Q	*							
B6HY15	Adenoregulina	<i>Agalychnis callidryas</i>	D	V	.	S	G	A	I	G	.	Q	*							
Q7T3K9	DMS-S6	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	A	.	S	.	A	I	G	.	Q	*							
Q90ZK3	DMS-B7	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	G	A	.	T	D	A	.	G	.	Q	*							
O93453	DMS-DA3	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	G	A	.	S	.	A	L	G	.	Q	*							
O93226	DMS-A5	<i>Agalychnis annae</i>	.	-	G	A	I	S	.	A	.	G	.	Q	*							
Q90ZK5	DMS-B8	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	G	A	.	S	D	A	.	G	.	Q	*							
Q1EJP5	DMS-H4	<i>Pithecopus azureus</i>	G	-	-	-	-	A	L	G	.	Q	*							
J7H8J4	DMS-1	<i>Pithecopus nordestinus</i>	G	-	-	-	-	A	L	G	.	Q	*							
		<i>Pithecopus</i>	G	-	-	-	-	A	L	-	-	-	*							
P84596	DMS-H3	<i>hypochondrialis</i>	G	-	-	-	-	A	L	-	-	-	*							

. = aminoácidos conservados, *= codon stop, AGKAAL = motivo consenso conservado, subrayado las regiones variables

3.2 Síntesis y purificación de dermaseptina CC1

Se obtuvo aproximadamente 189 mg de péptido sintético usando la técnica de síntesis en fase sólida con el grupo protector FMOC con una pureza de 79 % (Figura 5), la cual fue obtenida por el HPLC y una masa molecular de $[M+H^+] = 3549,1$ Da obtenida mediante MALDI-TOF MS (Figura 6).

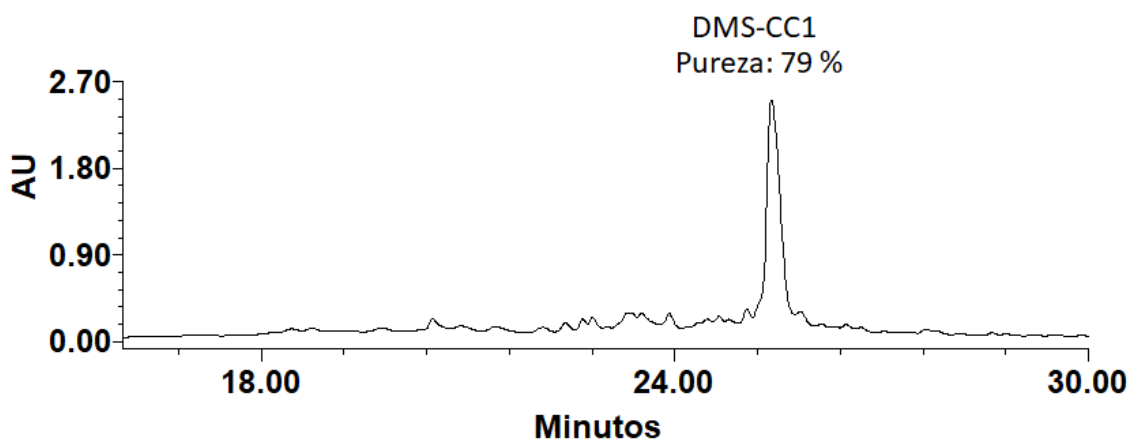


Figura 5. Pureza de la dermaseptina CC1 sintetizada evaluada mediante HPLC. En el eje X se encuentra el tiempo de retención en minutos del péptido. En el eje Y se encuentra la absorbancia (AU) a una longitud de onda de 214 a 280 nm.

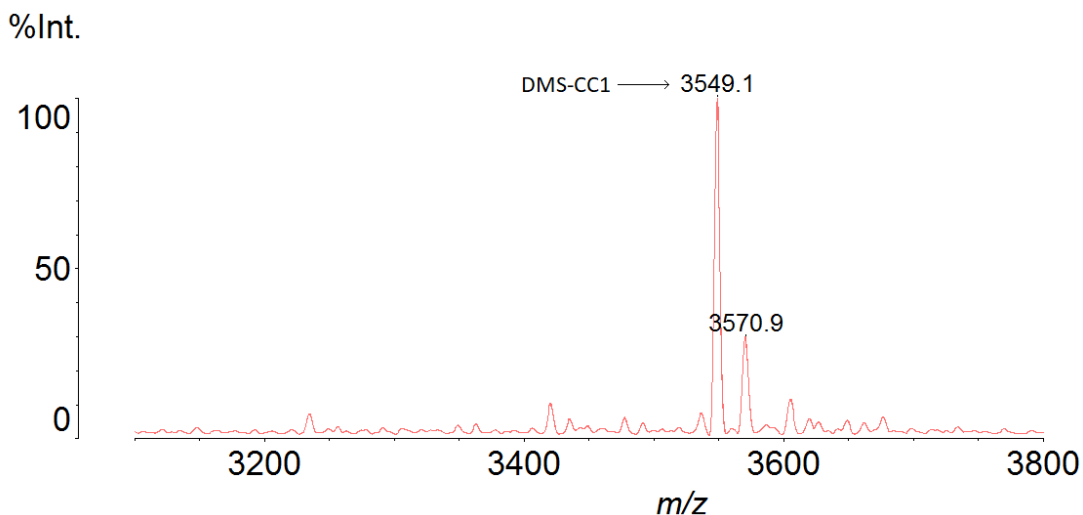


Figura 6. Análisis de masas del producto de síntesis del péptido dermaseptina-CC1 obtenido mediante MALDI-TOF MS. La masa molecular 3570.9 representa la formación de un aducto de sodio.

En cuanto a la purificación del péptido, por cromatografía FLASH se obtuvieron 38,23 mg de péptido puro con una pureza de 99,9 % evaluada por HPLC (Figura 7) y una masa molecular de $[M+H^+] = 3549,4$ Da obtenida mediante MALDI-TOF MS (Figura 8).

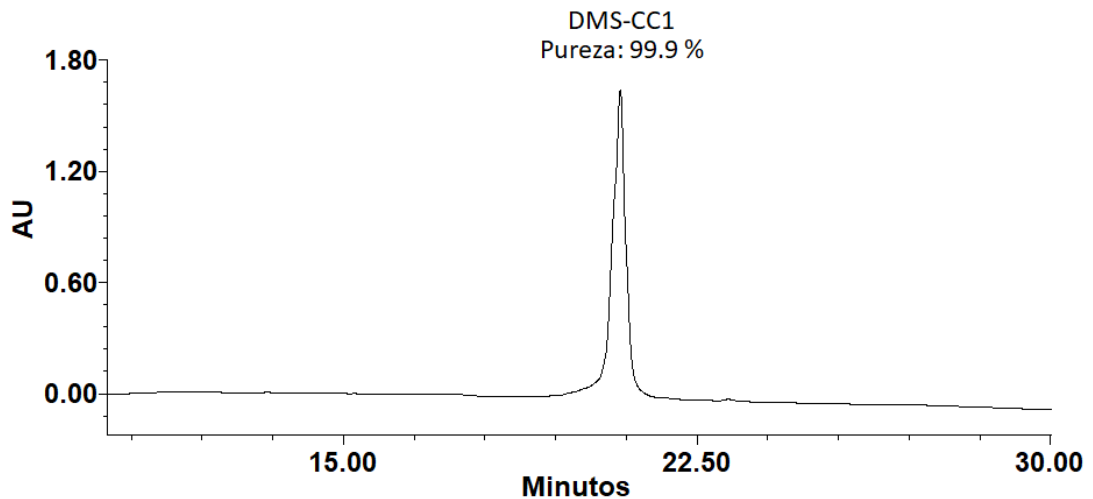


Figura 7. Pureza de la dermaseptina CC1 purificada por cromatografía FLASH. En el eje X se encuentra el tiempo de retención en minutos del péptido. En el eje Y se encuentra la absorbancia (AU) a una longitud de onda de 214 a 280 nm.

%Int.

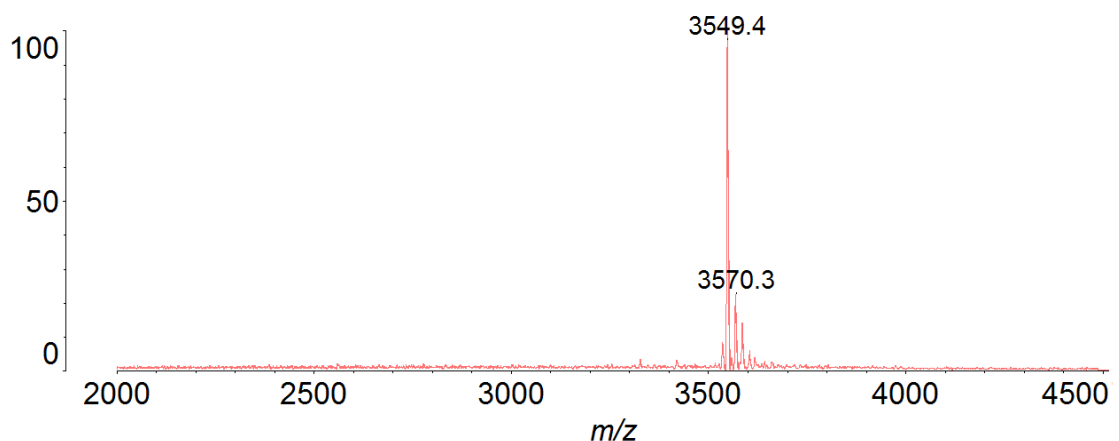


Figura 8. Análisis de masas del péptido puro dermaseptina-CC1 obtenido mediante MALDI-TOF MS. La masa molecular 3570.3 representa la formación de un aducto de sodio.

3.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC)

El péptido sintético dermaseptina CC1 con 99,9 % de pureza mostró un espectro de actividad antimicrobiana amplio contra los microorganismos usados en el ensayo con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 2,25 μM contra *E. coli*, 9,02 μM contra *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, 36,07 μM contra *C. albicans* y 72,13 μM contra *S. aureus* (Figura 9). En cuanto a la concentración bactericida mínima (MBC) del péptido DMS-CC1, este mostró 4,51 μM contra *E. coli*, 9,02 μM contra *K. pneumoniae* y > 144,26 μM contra *S. aureus*, *C. albicans* y *P. aeruginosa*.

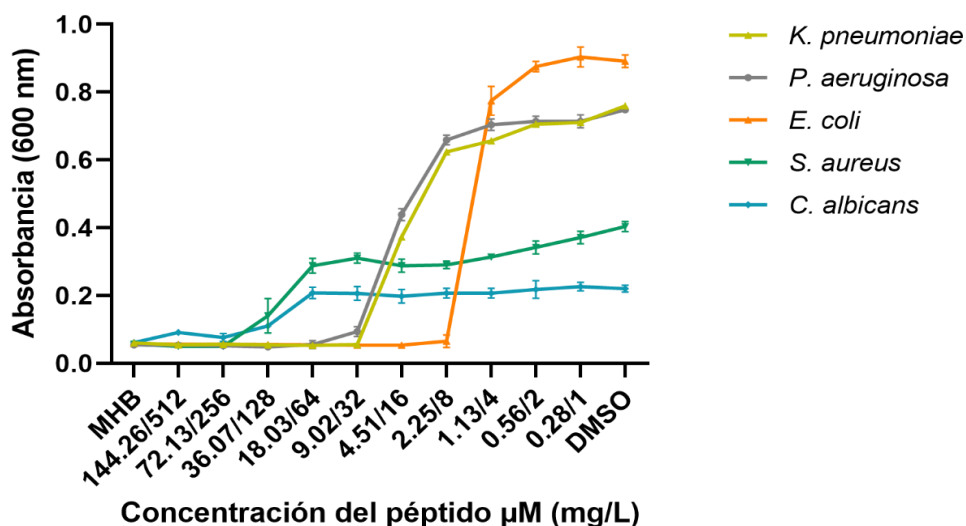


Figura 9. MIC de la dermoceftina CC1 contra *S.aureus*, *E.coli*, *C.albicans*, *K.pneumoniae* y *P. aeruginosa*. MHB (Mueller Hinton Broth) corresponde al control negativo y DMSO (Dimetilsulfóxido) al control positivo.

3.4 Hemólisis

Se mostró actividad hemolítica para las cuatro primeras diluciones del péptido como son 144,26 μM (512 mg/L), 72,14 μM (256 mg/L), 36,07 μM (128 mg/L) y 18,03 μM (64 mg/L) con un porcentaje de hemólisis de 52, 19, 4 y 1 % respectivamente (Figura 10).

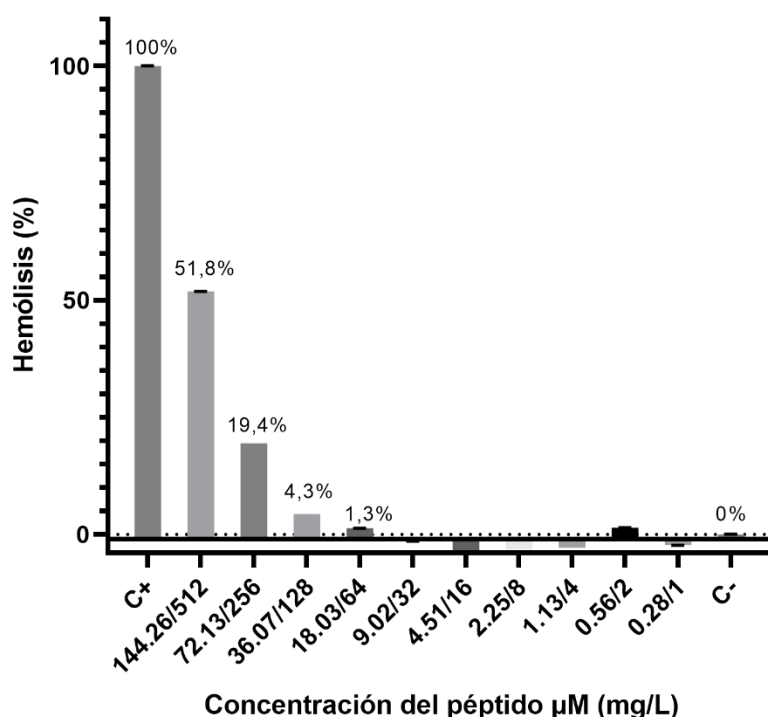


Figura 10. Actividad hemolítica del péptido sintético DMS-CC1. C (+) corresponde al control positivo (Triton X-100) y C (-) al control negativo (PBS). En la parte superior de las barras se presentan los porcentajes de hemólisis para cada concentración y controles.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis bioinformáticos

Los resultados de Blast/n muestran que la dermaseptina CC1 de la especie *C. calcarifer* comparte 86,76 % de identidad con la dermaseptina PD-2, perteneciente a la especie *Pachymedusa dactinolor*. Como se esperaba, al comparar estas dos secuencias se evidenció que tanto el péptido señal como la región acídica poseen sitios conservados y el péptido maduro sitios variables con 12 sustituciones no sinónimas. En este sentido, recordando que el péptido maduro es el que interactúa con los microorganismos, las sustituciones no sinónimas, que cambian un aminoácido por otro, representan una mejora para algunas propiedades fisicoquímicas como lo es la carga neta positiva que interfiere en la actividad antimicrobiana [42].

En cuanto a los resultados de Blast/p la secuencia de aminoácidos de la dermaseptina-CC1 alcanzó el 85 % de identidad con la dermaseptina B2 perteneciente a la especie *Phyllomedusa bicolor*. Esta comparación provee información de las características que comparten los péptidos pertenecientes a la familia de las Dermaseptinas, así la dermaseptina CC1 posee un triptófano conservado (W) en la tercera posición y un motivo consenso conservado (AGKAAL) en la región media del péptido maduro [3]. En base a las similitudes compartidas tanto de la secuencia de nucleótidos como de aminoácidos se puede evidenciar que la dermaseptina CC1 identificada por Proaño (2016) forma parte de la familia de las dermaseptinas pero que no es idéntica a ninguna otra, siendo este el primer reporte [31].

4.2 Propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana de la dermaseptina CC1

Los péptidos antimicrobianos identificados en especies de anfibios son altamente variados en la longitud de la secuencia, estructura, propiedades fisicoquímicas y función tanto en especies distantes como relacionadas entre sí [42], por lo cual, relacionar estas características con la actividad antimicrobiana es complejo. Sin embargo, hay características que para la familia de las dermaseptinas son de mayor importancia para

la actividad antimicrobiana como son: poseer carga catiónica, tener anfipaticidad y poseer una conformación α -hélice en su estructura [43, 44].

La cationicidad es una característica fisicoquímica principal para la actividad antimicrobiana, usualmente los péptidos con características antimicrobianas poseen carga neta entre +3 y +9 que les permite interactuar con las membranas cargadas negativamente (45, 46). Esta carga negativa de las bacterias permite una interacción con el péptido con carga positiva, lo que da lugar a la desintegración de la membrana celular y altera las actividades fisiológicas de la bacteria actuando ya sea con actividad bactericida o bacteriostática [47,35].

En este caso, la dermaseptina CC1 posee una carga neta +3 que le proporcionó actividad antimicrobiana para bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. El hecho de que actué en ambas clases de bacterias se puede explicar debido a la carga negativa de la membrana bacteriana, ya sea por la presencia de lipopolisacáridos en la membrana externa de las Gram negativas o por el ácido teicoico de la pared externa de las Gram positivas [48]. En cuanto a las levaduras, estas también poseen una membrana con carga negativa compuesta principalmente por fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico que permiten la interacción con el péptido cargado positivamente [45, 46, 49].

Por otro lado, como se esperaba la dermaseptina CC1 tuvo mayor actividad antibacteriana para las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*). Esta selectividad del péptido se puede inferir que se da por la composición de la pared bacteriana. En este caso la pared de las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa con lipopolisacáridos (carga negativa), periplasma con oligosacáridos (carga negativa), la pared de peptidoglicanos y la membrana interna [50]. Así, en este caso el péptido catiónico interactúa con los lipopolisacáridos y desplaza a los iones de Mg^{+} que usualmente neutralizan parcialmente la carga negativa de la bacteria [51]. Al hacer esto los lipopolisacáridos cargados más negativamente permiten que el péptido neutralice la carga en un parche de la membrana externa lo que crea aberturas en la misma y permiten la entrada del péptido [52]. Una vez que el péptido ingresa a la membrana citoplasmática, interacciona con esta ya que posee carga

negativa en su superficie, esta segunda interacción permite la inserción del péptido y el consecuente daño a la membrana (Figura 11) [52].

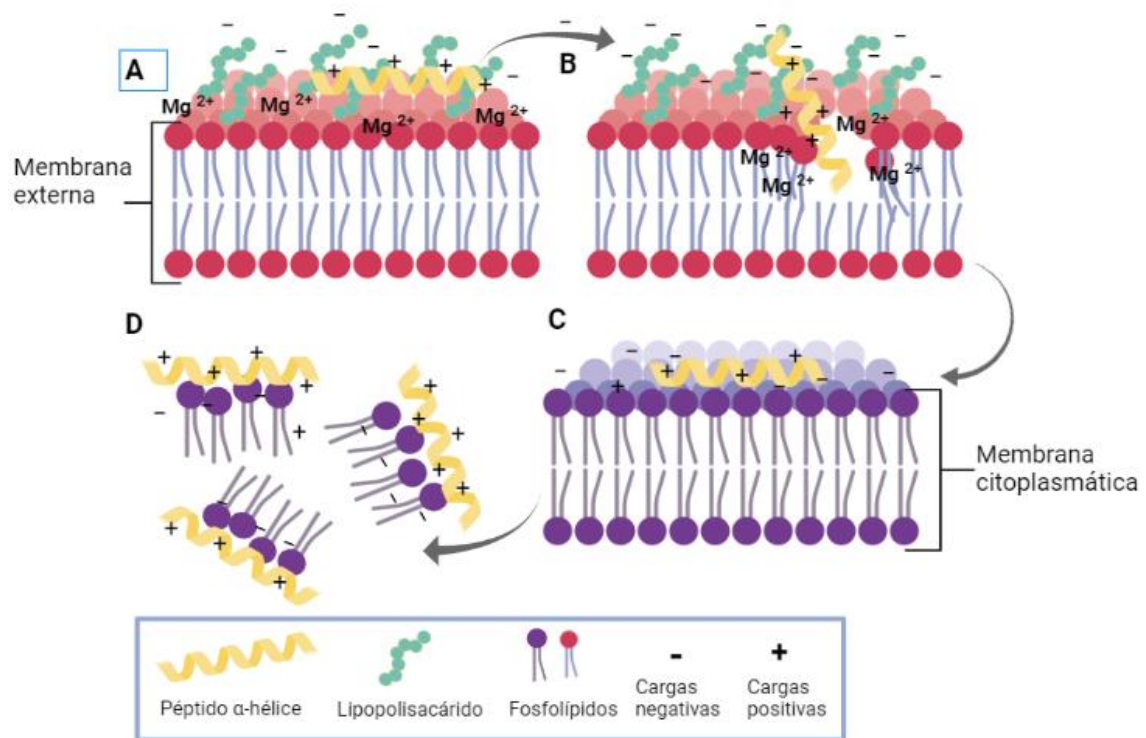


Figura 11. Mecanismo de acción de las dermaseptinas sobre las bacterias Gram negativas. A: El péptido catiónico interactúa con la membrana externa bacteriana que contiene lipopolisacáridos (LPS) e iones de Mg^{2+} . B: El péptido desplaza los iones de Mg^{2+} e interactúa con los LPS cargados negativamente neutralizando la carga a través de un parche en la membrana externa generando una abertura que permite el ingreso del péptido a la membrana interna. C: El péptido interactúa con la membrana citoplasmática y D: causa daño en la membrana al interactuar con los fosfolípidos [52]. Adaptada de Hancock (2001).

En cuanto a la conformación α -hélice en el péptido, esta es importante en los péptidos antimicrobianos ya que esta se vuelve estable al entrar en contacto con la bicapa lipídica de las bacterias [47, 53]. Añadido a esto, es primordial que la α -hélice sea anfipática, es decir que posea un extremo hidrofóbico y otro hidrofílico [53,54]. El péptido al poseer un extremo hidrofílico puede unirse con la superficie acuosa de la membrana bacteriana y el extremo hidrofóbico unirse en la superficie no polar de la membrana interna bacteriana [54]. En el caso de la dermaseptina CC1, esta cumple con las características previamente descritas, debido a que conforma una estructura α -hélice en un 97 % de sus residuos y es anfipática con un 51 % de residuos hidrofóbicos como (Val) V, (Ala) A, (Ile) I, (Leu) L y (Trp) W que aseguran alta afinidad por la membrana [55].

4.3 Toxicidad de la dermaseptina CC1

La actividad hemolítica se emplea para evaluar la toxicidad de los péptidos antimicrobianos sobre las células de los mamíferos, por lo cual esta actividad debe ser baja o nula cuando un péptido es un candidato terapéutico [55]. En esta investigación la dermaseptina CC1 no mostró hemólisis para las concentraciones de MIC para *E. coli* (2,25 μM), *K. pneumoniae* (9,02 μM) y *P. aeruginosa* (9,02 μM); mientras que para el MIC de *S. aureus* (72,13 μM) y *C. albicans* (36,07 μM) tuvo porcentajes bajos de hemólisis siendo 19,4 % y 4,3 %, respectivamente. Este bajo porcentaje de hemólisis se da debido a la composición de la membrana de las células eucariotas [46]. Los glóbulos rojos poseen una membrana externa compuesta principalmente por fosfatidilcolina zwitteriónica, esfingomiélin y fosfatidiletanolamina que no poseen carga; mientras que en la membrana interna se encuentran lípidos como la fosfatidilserina y fosfatidilinositol los cuales poseen carga negativa. Así, esta organización con cargas expuestas hacia el interior impiden que los péptidos antimicrobianos interactúen fuertemente con las células eucariotas [46].

Estas características fisicoquímicas y actividad biológica se evidenciaron en la dermaseptina B2 la cual fue la dermaseptina con más porcentaje de identidad en cuanto a secuencia nucleotídica. Este péptido mostró actividad antibacterial para bacterias Gram negativas con un MIC de 0,8 μM para *E. coli* y 3.1 μM para *P. aeruginosa*; y bacterias Gram positivas con un MIC de 0,7 μM para *S. aureus*, sin presentar hemólisis en eritrocitos de ratas [56]. En cuanto a la dermaseptina PD-2 que mostró mayor similitud en la secuencia de aminoácidos, esta presentó un MIC de 5 μM tanto para *E. coli* como *S. aureus* y 10,1 μM para la levadura *C. albicans*; sin presentar actividad hemolítica en eritrocitos de caballo [57]. Las dos dermaseptinas, tanto la dermaseptina B2 como PD-2 poseen una estructura alfa hélice anfipática en un 100 % de su secuencia y son catiónicas, además en ambos estudios no se mostró selectividad entre bacterias Gram positivas y Gram negativas [56,57]. Al comparar estos valores con la dermaseptina CC1 del presente estudio se tiene un MIC con 2,25 μM para *E. coli*, 72.13 μM para *S. aureus* y 36,07 μM para *C. albicans*; con baja hemólisis en eritrocitos humanos y diferencias de selectividad hacia estos microorganismos.

En cuanto a las bacterias resistentes a ampicilina empleadas en esta investigación, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, solo se encontró estudios relacionados a la dermaseptina PD-2 en especies no resistentes. En la dermaseptina PD-2 se ha descrito un MIC de 8 μ M para *P. aeruginosa* (Gram-negativa) y 32 μ M para *K. pneumoniae* (Gram negativa), al comparar estos valores con la dermaseptina CC1 se tiene un MIC de 9,02 μ M para ambas bacterias [58]. Referente a estas dos bacterias se ha descrito que son especies que tienden a secretar una matriz extracelular que limita la actividad de los péptidos antimicrobianos, por lo que se podría inferir que la dermaseptina CC1 es capaz de superar esta barrera y dañar la membrana bacteriana [19].

Los datos anteriores permiten identificar a la dermaseptina CC1 como un péptido antimicrobiano con selectividad para las bacterias Gram negativas independientemente de su resistencia a antibióticos. Por otro lado, es claro que las características en los péptidos que conforman una α -hélice anfipática en su estructura y cationicidad influyen en la actividad antimicrobiana. Además también se puede inferir que esta dermaseptina presenta un rango bajo de toxicidad comparable con los péptidos dermaseptina PD-2 y B2, sin embargo, es necesario aclarar que en los métodos empleados y la diferencia en los eritrocitos en estos ensayos de hemólisis difieren en relación a la dermaseptina CC1 que emplea eritrocitos humanos; debido a que aunque sean células provenientes de mamíferos se ha demostrado que la hemólisis de los péptido difieren en relación a los eritrocitos de cada especie [55, 59].

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En esta tesis se reporta la dermaseptina CC1 como un péptido perteneciente a la familia de las dermaseptinas con un porcentaje de similitud de 86 % a través de Blast, y con la organización estructural de su precursor: un péptido señal y espacio ácido conservados; y un péptido maduro con el triptófano en la tercera posición y un motivo consenso conservado (AGKAAL) en la región media.

Los ensayos empleados en este estudio mostraron actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y patógenos fúngicos representados por un MIC de 2,25 μM contra *E. coli*, 9,02 μM contra *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, 36,07 μM contra *C. albicans* y 72,13 μM contra *S. aureus*. Además de presentar un MBC de 4,51 μM contra *E. coli*, 9,02 μM contra *K. pneumoniae* y >144,26 μM contra *S. aureus*, *C. albicans* y *P. aeruginosa*. En cuanto a la toxicidad, este péptido no fue hemolítico para la concentración donde se encontró MIC para las bacterias Gram-negativas y un porcentaje bajo de hemólisis (4-19 %) para las concentraciones de MIC de *S. aureus* y *C. albicans*.

Los resultados del análisis de las propiedades fisicoquímicas muestran una α -hélice anfipática, con un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos mayor al 50 % con carga neta +3, lo que sugiere que las características fisicoquímicas deben tener una relación estrecha para que se dé el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos, y en este caso la dermaseptina CC1.

En este estudio se demuestra el potencial biomédico de la dermaseptina CC1 dentro del problema emergente relacionado con la resistencia bacteriana a antibióticos. Las características fisicoquímicas de este péptido le brindan actividad biológica contra microorganismos patógenos de importancia mundial como son *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Finalmente, con base en esta información sería necesario enfocar nuevos estudios en evaluar esta actividad contra bacterias con diferentes perfiles de resistencia, además de evaluar cómo las características fisicoquímicas de la dermaseptina CC1 le permiten especificidad frente a las bacterias Gram negativas.

REFERENCIAS

1. MOR A, NICOLAS P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur J Biochem.* 1994;219: 145–154. doi:10.1111/J.1432-1033.1994.TB19924.X
2. Nicolas P, El Amri C. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2009;1788: 1537–1550. doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.09.006
3. Nicolas P, Amiche M. The Dermaseptins. *Handb Biol Act Pept.* 2006; 295–304. doi:10.1016/B978-012369442-3/50048-9
4. Mechkarska M, Coquet L, Leprince J, Auguste RJ, Jouenne T, Mangoni ML, et al. Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Trinidadian leaf frog *Phyllomedusa trinitatis* (Phyllomedusidae). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2018;28: 72–79. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.06.006
5. Frost DR. *Cruziophyla calcarifer* (Boulenger, 1902). In: *Amphibian Species of the World: an Online Reference.* Version 6.1 [Internet]. 2021 [cited 23 Feb 2022]. doi:doi.org/10.5531/db.vz.0001
6. Amiche M, Seon AA, Pierre TN, Nicolas P. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1999;456: 352–356. doi:10.1016/S0014-5793(99)00964-3
7. Mor A, Delfour A, Nicolas P, Van Nguyen H, Migliore-Samour D. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry.* 1991;30: 8824–8830. doi:10.1021/BI00100A014
8. UniProt. dermaseptin in UniProtKB. [cited 5 Jan 2022]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=dermaseptin&sort=score>
9. Bartels EJM, Dekker D, Amiche M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. *Front Pharmacol.* 2019;10: 1421. doi:10.3389/FPHAR.2019.01421/BIBTEX

10. Bergaoui I, Zairi A, Tangy F, Aouni M, Selmi B, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptin S(4) and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. *J Med Virol*. 2013;85: 272–281. doi:10.1002/JMV.23450
11. Lorin C, Saidi H, Belaid A, Zairi A, Baleux F, Hocini H, et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*. 2005;334: 264–275. doi:10.1016/J.VIROL.2005.02.002
12. Fakhri TM. Dermaseptin-Based Antiviral Peptides to Prevent COVID-19 through In Silico Molecular Docking Studies against SARS-CoV-2 Spike Protein. *Pharm Sci Res*. 2020;7: 65–70. doi:10.7454/PSR.V7I4.1079
13. Strahilevitz J, Shai Y, Mor A, Nicolas P. Spectrum of Antimicrobial Activity and Assembly of Dermaseptin-b and Its Precursor Form in Phospholipid Membranes. *Biochemistry*. 2002;33: 10951–10960. doi:10.1021/BI00202A014
14. 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
15. De Lucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Walsh TJ. Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Med Mycol*. 1998;36: 291–298. doi:10.1080/02681219880000461
16. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquina F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C, et al. Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog *Agalychnis spurrelli*. *J Mol Model*. 2019;25. doi:10.1007/S00894-019-4141-1
17. Jouenne T, Mor A, Bonato H, Junter GA. Antibacterial activity of synthetic dermaseptins against growing and non-growing *Escherichia coli* cultures. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42: 87–90. doi:10.1093/JAC/42.1.87
18. Navon-Venezia S, Feder R, Gaidukov L, Carmeli Y, Mor A. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:

689–694. doi:10.1128/AAC.46.3.689-694.2002/ASSET/634D0FE6-B72A-4943-8EC7-DE1F9728FFA2/ASSETS/GRAPHIC/AC0320523003.JPEG

19. Chen J, Hao D, Mei K, Li X, Li T, Ma C, et al. In Vitro and In Vivo Studies on the Antibacterial Activity and Safety of a New Antimicrobial Peptide Dermaseptin-AC. Asempa TE, editor. *Microbiol Spectr.* 2021;9. doi:10.1128/SPECTRUM.01318-21

20. Charpentier S, Amiche M, Mester J, Vouille V, Le Caer JP, Nicolas P, et al. Structure, Synthesis, and Molecular Cloning of Dermaseptins B, a Family of Skin Peptide Antibiotics *. *J Biol Chem.* 1998;273: 14690–14697. doi:10.1074/JBC.273.24.14690

21. El-Dirany R, Shahrour H, Dirany Z, Abdel-Sater F, Gonzalez-Gaitano G, Brandenburg K, et al. Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against Leishmania and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules.* 2021;11. doi:10.3390/BIOM11070984

22. Krugliak M, Feder R, Zolotarev VY, Gaidukov L, Dagan A, Ginsburg H, et al. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44: 2442–2451. doi:10.1128/AAC.44.9.2442-2451.2000

23. Ghosh JK, Shaool D, Guillaud P, Cicéron L, Mazier D, Kustanovich I, et al. Selective Cytotoxicity of Dermaseptin S3 toward Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the Underlying Molecular Basis *. *J Biol Chem.* 1997;272: 31609–31616. doi:10.1074/jbc.272.50.31609

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. Yang Z, Zheng J, Chan C-F, Wong ILK, Heater BS, Chow LMC, et al. Targeted delivery of antimicrobial peptide by Cry protein crystal to treat intramacrophage infection. *Biomaterials.* 2019;217: 119286. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119286

26. Ron SR, Read M, Pazmiño-Armijos. *Cruziophyla calcarifer*. En: Anfibios del Ecuador. Version 2021.0. [Internet] Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del

Ecuador. 27 Aug 2018 [cited 23 Jan 2022]. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Cruziophyla%20calcarifer>

27. Mauricio Ortega-Andrade HI, Rodes Blanco M, Cisneros-Heredia ID DF, Guerra Arévalo N, Gabriela López de Vargas-Machuca ID K, Sánchez-Nivicela JC, et al. Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. 2021. doi:10.1371/journal.pone.0251027

28. GBIF.org (31 January 2022) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.y7mtgd>

29. IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020. *Cruziophyla calcarifer*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T151594717A3027869. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T151594717A3027869.en>

30. Proaño-Bolaños C. Ocurrencia de compuestos antimicrobianos en secreciones de la piel de 21 especies de anfibios ecuatorianos y purificación parcial de los péptidos de *Agalychnis litodryas*. 2004

31. Proaño Bolaños C del C. Unravelling skin secretion peptidomes of *Cruziophyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* and *Hypsiboas picturatus* (HYLIDAE). Queen's University Belfast. 2016.

32. Cuesta SA, Reinoso C, Morales F, Pilaquina F, Morán-Marcillo G, Proaño-Bolaños C, et al. Novel antimicrobial cruzioseptin peptides extracted from the splendid leaf frog, *Cruziophyla calcarifer*. *Amino Acids*. 2021;53: 853–868. doi:10.1007/S00726-021-02986-W

33. World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. Available: www.paprika-annecy.com

34. World health Organization. The top 10 causes of death. 2020 [cited 2 Jan 2022]. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

35. Jamrozik E, Selgelid MJ, Jamrozik E, Selgelid MJ. Drug-Resistant Infection: Causes, Consequences, and Responses. 2020; 3–18. doi:10.1007/978-3-030-27874-8_1

36. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018 . 2018. Available: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
37. Ross J, Larco D, Colon O, Coalson J, Gaus D, Taylor K, et al. Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Fam Rural*. 2020;5. doi:10.23936/PFR.V5I1.144
38. Instituto Ecuatoriano Nacional. Estadísticas Vitales. 2020. Available: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Defunciones_Generales_2020/2021-06-10_Principales_resultados_EDG_2020_final.pdf
39. Eisenberg JNS, Goldstick J, Cevallos W, Trueba G, Levy K, Scott J, et al. In-roads to the spread of antibiotic resistance: regional patterns of microbial transmission in northern coastal Ecuador. *J R Soc Interface*. 2012;9: 1029. doi:10.1098/RSIF.2011.0499
40. Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, Rajeev M, Rasambainarivo F, Rice BL, et al. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol* 2021. 2021; 1–13. doi:10.1038/s41579-021-00639-z
41. Dhingra S, Rahman NAA, Peile E, Rahman M, Sartelli M, Hassali MA, et al. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Front Public Heal*. 2020;8: 531. doi:10.3389/FPUBH.2020.535668/BIBTEX
42. Tennessen JA. Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J Evol Biol*. 2005;18: 1387–1394. doi:10.1111/J.1420-9101.2005.00925.X
43. Duda TF, Vanhoye D, Nicolas P. Roles of Diversifying Selection and Coordinated Evolution in the Evolution of Amphibian Antimicrobial Peptides. *Mol Biol Evol*. 2002;19: 858–864. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A004143
44. Tan Y, Chen X, Ma C, Xi X, Wang L, Zhou M, et al. Biological Activities of Cationicity-Enhanced and Hydrophobicity-Optimized Analogues of an Antimicrobial Peptide,

Dermaseptin-PS3, from the Skin Secretion of *Phyllomedusa sauvagii*. *Toxins (Basel)*. 2018;10: 320. doi:10.3390/TOXINS10080320

45. Fernández-Vidal M, Jayasinghe S, Ladokhin AS, White SH. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *J Mol Biol*. 2007/05/22. 2007;370: 459–470. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.016

46. Ciumac D, Gong H, Hu X, Lu JR. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *J Colloid Interface Sci*. 2019;537: 163–185. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103

47. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res*. 2019;11: 3919. Available: /pmc/articles/PMC6684887/
doi:10.1046/J.1365-2672.92.5S1.19.X

48. Stark M, Liu LP, Deber CM. Cationic Hydrophobic Peptides with Antimicrobial Activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46: 3585. Doi:10.1128/AAC.46.11.3585-3590.2002

49. Rautenbach M, Troskie AM, Vosloo JA. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie*. 2016;130: 132–145. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.013

50. Denyer SP, Maillard J-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 2002;92: 35S-45S.

51. Groisman EA, Hollands K, Kriner MA, Lee EJ, Park SY, Pontes MH. Bacterial Mg²⁺ Homeostasis, Transport, and Virulence. *Annu Rev Genet*. 2013;47: 625. Doi:10.1146/ANNUREV-GENET-051313-051025

52. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2001;1: 156–164. Doi:10.1016/S1473-3099(01)00092-5

53. Stark M, Liu L-P, Deber CM. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3585–3590. Doi:10.1128/AAC.46.11.3585-3590.2002
54. Fernández-Vidal M, Jayasinghe S, Ladokhin AS, White SH. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *J Mol Biol.* 2007/05/22. 2007;370: 459–470. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.016
55. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep.* 2020;10: 13206. doi:10.1038/s41598-020-69995-9
56. Galanth C, Abbassi F, Lequin O, Ayala-Sanmartin J, Ladram A, Nicolas P, et al. Mechanism of Antibacterial Action of Dermaseptin B2: Interplay between Helix–Hinge–Helix Structure and Membrane Curvature Strain. *Biochemistry.* 2009;48: 313–327. doi:10.1021/bi802025a
57. Shi D, Hou X, Wang L, Gao Y, Wu D, Xi X, et al. Two Novel Dermaseptin-Like Antimicrobial Peptides with Anticancer Activities from the Skin Secretion of *Pachymedusa dactylophora*. *Toxins (Basel).* 2016;8: 144. doi:10.3390/toxins8050144
58. Zhu H, Ding X, Li W, Lu T, Ma C, Xi X, et al. Discovery of two skin-derived dermaseptins and design of a TAT-fusion analogue with broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity on healthy cells. *PeerJ.* 2018;2018: e5635. doi:10.7717/PEERJ.5635/SUPP-1
59. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Reports* 2020 101. 2020;10: 1–13. doi:10.1038/s41598-020-69995-9