



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA
SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus nanay* (BUFONIDAE)**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: YANILETH FERNANDA LÓPEZ TACOAMAN

TUTOR: PhD. CAROLINA PROAÑO-BOLAÑOS

Napo, Ecuador

2022

**DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y
RESPONSABILIDAD**

Yo, Yanileth Fernanda López Tacoaman con documento de identidad N° 1600603649, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 09 de noviembre de 2022

Firma:



Yanileth Fernanda López Tacoaman

C.I: 1600603649

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Yanileth Fernanda López Tacoaman, con documento de identidad N° 1600603649, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus nanay* (BUFONIDAE), de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÒRGANICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 09 de noviembre de 2022

Firma:



Yanileth Fernanda López Tacoaman

C.I: 1600603649

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: "Estudio del potencial antimicrobiano de la secreción cutánea de *Atelopus nanay* (Bufonidae)", en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Yanileth Fernanda López Tacoaman, 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 Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 09 de noviembre de 2022

Firma:



PhD. Carolina del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 1714818760

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, la cual abrió sus puertas para formar a estudiantes de excelencia en la Amazonia Ecuatoriana en la cual crecí, con equipos de excelencia y profesionales excepcionales.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación profesional por enseñarnos a creer en nuestros sueños, a ser mejores personas y profesionales de los cual enorgullecerse. Especialmente a mi directora de tesis la PhD. Carolina Proaño, por transmitirme sus conocimientos y dedicación en la guía continua en este trabajo.

A los técnicos de laboratorio Giovanna Morán y Joel Medina por el continuo apoyo técnico e investigativo de este proyecto de titulación.

A mis amigos por ser un apoyo a lo largo de estos años y hacer de este tiempo más disfrutable, especialmente a Leo Camino por apoyarme en los momentos más difíciles.

Agradezco a mi familia, a mi madre y abuela por ser la fuerza motora de mi vida, por el amor incondicional, la continua inspiración y apoyo en cada momento para que este sueño pueda hacerse realidad. Especialmente a mi madre por nunca dejar que me rinda.

DEDICATORIA

*A mi madre, abuela y familia por el amor,
confianza y apoyo incondicional en cada
momento de mi vida.*

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y

RESPONSABILIDAD.....ii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR ..iv

AGRADECIMIENTOS.....v

DEDICATORIAvi

TABLA DE CONTENIDO.....vii

INDICE DE TABLAS.....x

INDICE DE FIGURASxi

RESUMENxiii

ABSTRACTxiv

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN1

1.1 Antecedentes1

1.1.1 *Péptidos antimicrobianos*1

1.1.1.1 *Características fisicoquímicas*1

1.1.1.2 *Mecanismos de acción*2

1.1.2 *Diversidad de péptidos antimicrobianos de anfibios*.....3

1.1.3 *Péptidos antimicrobianos de la familia Bufonidae*.....3

1.1.4 *Biomoléculas en el género Atelopus*4

1.2 Planteamiento del problema.....4

1.3 Justificación5

1.4 Objetivos de investigación7

Objetivo General7

Objetivos Específicos7

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO7

2.1 Extracción de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*7

2.2 Fraccionamiento de la secreción cutánea de *A. nanay* por RP-HPLC.....8

2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC.....8

2.4 Análisis por MALDI-TOF MS8

2.5 Espectrometría de masas en tándem de la secreción de *A. nanay*.....9

2.5.1 *Secreción cutánea*.....9

2.5.2 *Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana*10

2.5.3	<i>Análisis de los espectros de masas en el software Mascot Distiller</i> ...	10
2.6	Clonaje molecular de la secreción cutánea de <i>Atelopus nanay</i>	11
2.6.1	<i>Extracción de ARNm de la secreción</i>	11
2.6.2	<i>Construcción de la librería de ADNc</i>	12
2.6.3	<i>Amplificación rápida de ADNc (RACE PCR)</i>	13
2.6.4	<i>Diseño de primers</i>	13
2.6.5	<i>Visualización de productos de RACE-PCR por electroforesis</i>	14
2.6.6	<i>Purificación de productos de RACE PCR</i>	15
2.6.7	<i>Ligación de productos de RACE PCR con vector pGEM-T easy</i>	15
2.6.8	<i>Transformación bacteriana y selección de colonias</i>	15
2.6.9	<i>Aislamiento de ADN recombinante</i>	16
2.6.10	<i>Amplificación de ADN recombinante de colonias mediante PCR y visualización de los productos de PCR por electroforesis</i>	16
2.7	Secuenciación por método de Sanger	16
2.8	Análisis bioinformáticos de las secuencias	17
2.8.1	<i>Propiedades fisicoquímicas de las secuencias</i>	17
2.8.2	<i>Análisis de las secuencias en modelos de predicción de actividad antimicrobiana</i>	17
2.8.3	<i>Modelamiento de la estructura 3D</i>	18
2.8.4	<i>Acoplamiento molecular</i>	18
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS		18
3.1	Extracción secreción cutánea <i>Atelopus nanay</i>	18
3.2	Fraccionamiento de la secreción cutánea de <i>A. nanay</i> por RP-HPLC	19
3.3	Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC	19
3.4	MALDI-TOF MS	21
3.5	Identificación de péptidos mediante MS/MS	22
3.5.1	<i>Secreción cutánea</i>	22
3.5.2	<i>Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana</i>	26
3.6	Clonaje molecular	35
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		53
4.1	Fraccionamiento de la secreción cutánea de <i>Atelopus nanay</i>	53
4.2	Primer estudio antimicrobiano en <i>Atelopus nanay</i>	53
4.3	MALDI-TOF MS de las fracciones con actividad antimicrobiana	54
4.4	Identificación de posibles péptidos mediante MS/MS	56
4.4.1	<i>Secreción cutánea</i>	56

4.4.2	<i>Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana</i>	59
4.5	Identificación de posibles péptidos mediante clonaje molecular.....	61
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la Máster Mix de retro transcripción: Construcción de la librería de ADNc.	12
Tabla 2. Primers forward empleados en RACE PCR.	14
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC.....	20
Tabla 4. Péptidos similares encontrados en <i>A. nanay</i> mediante MS/MS.....	25
Tabla 5. Secuencias peptídicas similares en fracciones con actividad antimicrobiana con el método MS ^e mediante MS/MS	28
Tabla 6. Péptidos similares encontrados en las fracciones antimicrobianas con el método DDA-2 mediante MS/MS.....	34
Tabla 7. Traducción de las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación Sanger y análisis en la herramienta blast/p.	37
Tabla 8. Comparación de las 8 secuencias peptídicas con Blast/p.	39
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de las 8 secuencias peptídicas de <i>A. nanay</i>	49
Tabla 10. Análisis en 9 modelos de predicción de AMPs de las nuevas secuencias peptídicas	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Atelopus nanay</i> . A) <i>Atelopus nanay</i> vista lateral B) <i>Atelopus nanay</i> vista frontal C) Mapa de distribución de <i>A. nanay</i>	6
Figura 2. Cromatograma de HPLC de fase reversa de la secreción cutánea de <i>Atelopus nanay</i>	19
Figura 3. Espectro de masa de la fracción antimicrobiana 68.....	22
Figura 4 Cromatograma de la secreción cutánea de <i>A. nanay</i> con el método MS ^e	24
Figura 5. Cromatograma de la secreción de <i>A. nanay</i> con el método DDA.	25
Figura 6. Cromatograma y espectro de masas de la fracción antimicrobiana #73.	32
Figura 7. Espectro de masa de la fracción antimicrobiana #152 con método DDA. ...	33
Figura 8. Cromatograma y espectro de masas de la fracción antimicrobiana #84 empleando el método DDA.	34
Figura 9. Alineamiento de secuencias peptídicas entre Andersonin-M2, M1 y M3 y Arlequinin-AN 1-8.....	45
Figura 10. Marco de lectura abierto de las secuencias nucleotídicas obtenidas de <i>A. nanay</i> (Arlequinin-AN1-8).....	48
Figura 11. Modelos tridimensionales de Arlequinin-AN3.....	51
Figura 12. Interacciones de acoplamiento molecular entre Arlequinin-AN3 y la membrana bacteriana y la membrana eucariota	52

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Espectro de MALDI-TOF MS de la secreción cutánea completa de *A. nanay*.
- Anexo 2.** Espectros masa mediante MALDI-TOF MS de las fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana de *A. nanay*. (1-28) Rango de masa de 1000-3500 Da.
- Anexo 3.** Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana analizadas por espectrometría de masas en tándem con el método MS^e.
- Anexo 4.** Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana analizadas por espectrometría de masas en tándem con el método DDA.
- Anexo 5.** Péptidos reportados en especies de la familia Bufonidae. Base de datos (AMP_bufonidae)

RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) de las secreciones de la piel de los anfibios son moléculas bioactivas que actúan como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos y constituyen candidatos potenciales para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. En el Ecuador, existen especies en peligro de extinción como *Atelopus nanay* (Bufonidae) cuyos componentes cutáneos no han sido caracterizados. Existe evidencia de la presencia de AMPs en otras especies de bufónidos por lo cual la especie en estudio podría ser un candidato para descubrir nuevas moléculas. En esta investigación se caracterizó la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *A. nanay* y se determinó la estructura primaria de 8 péptidos antimicrobianos putativos empleando clonaje molecular y espectrometría de masas en tándem. De esta manera se identificaron 28 fracciones de la secreción que presentaron actividad en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y se presume que dicha actividad podría deberse a la presencia de péptidos similares a temporinas, andersoninas y triptofilinas. Por otro lado, se identificaron 8 péptidos nuevos denominados Arlequinin-AN1-8 caracterizada por su región ácida conservada (IKQWYQ) similar a la de los péptidos Andersonin M1-3, seguido por el sitio de procesamiento RR y la secuencia del péptido maduro que inician con una valina. El análisis bioinformático predice que Arlequinin-AN3 podría tener actividad antimicrobiana, mientras no se logró identificar la actividad de los otros péptidos restantes. Esto nos demuestra que *A. nanay* es una especie con potenciales farmacológicos que merece una evaluación y exploración de mayor profundidad.

Palabras clave: AMPs, secreción cutánea, actividad antimicrobiana, Arlequinin-AN

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) from amphibian skin secretions are bioactive molecules that act as the first line of defence against pathogenic microorganisms and are potential candidates for the development of new therapeutic alternatives. In Ecuador, there are endangered species such as *Atelopus nanay* (Bufonidae) whose skin components have not been characterized. There is evidence of the presence of AMPs in other bufonid species, so the species under study could be a candidate for the discovery of new molecules. In this research, the antimicrobial activity of *A. nanay* skin secretion was characterized and the primary structure of 8 putative antimicrobial peptides was determined using molecular cloning and tandem mass spectrometry. In this way, 28 secretion fractions were identified that showed activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, and it is presumed that this activity could be due to the presence of peptides like temporins, andersonins, and tryptophilins. On the other hand, 8 novel peptides named Arlequinin-AN1-8 were identified, characterized by their conserved acidic region (IKQWYQ) like Andersonin M1-3 peptides, followed by the RR processing site and the sequence of the mature peptide starting with a valine. Bioinformatic analysis predicts that Arlequinin-AN3 might have antimicrobial activity, while the activity of the other remaining peptides could not be identified. This shows that *A. nanay* is a species with pharmacological potential that deserves further evaluation and exploration.

Keywords: AMPs, skin secretion, antimicrobial activity, Arlequinin-AN

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son conocidos como la primera línea de defensa del sistema inmune innato de los animales ante el ataque de patógenos (virus, bacterias, hongos y parásitos) [1–3]. Los AMPs no solo presentan actividad antimicrobiana sino otras funciones biológicas, entre ellas: inmunomoduladores, antiproliferativos, hipoglucémicos, anticancerígenos, inhibidores de lipopolisacáridos, actividad cicatrizante, entre otras [4]. En eucariotas, la mayoría de los AMPs están codificados por genes específicos, que se expresan constitutivamente a niveles basales y se transcriben rápidamente después de la inducción por contacto o exposición a patógenos invasores. Por lo tanto, se pueden encontrar simultáneamente una variedad de diferentes AMPs en respuesta a estímulos patógenos en diferentes órganos [5].

1.1.1.1 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas de los AMPs son considerablemente importantes para poder determinar la actividad antimicrobiana, estas incluyen: tamaño, carga neta positiva, flexibilidad, estructura secundaria, hidrofobicidad, y anfipaticidad. Los cambios marginales en la secuencia de residuos de péptidos normalmente van seguidos de cambios importantes en la actividad antimicrobiana [6]. Los AMPs generalmente contienen de 10 a 50 residuos de aminoácidos y tienen un tamaño de 2 a 9 kDa [7–10], el tamaño tiene efecto en su estructura secundaria y por tanto en su mecanismo de acción y citotoxicidad. Sin embargo, también, los hace candidatos a optimización estructural y a síntesis química para potenciar su actividad biológica [1,8–10]. En su gran mayoría poseen carga positiva debido a la presencia de múltiples residuos de lisina y arginina, lo que favorece la interacción entre estos péptidos y las membranas citoplasmáticas microbianas. Sin embargo, aunque es menos común, también hay AMP aniónicos, sobre todo en las plantas [5]. A pesar de que la mayoría sean lineales, tienen la inclinación a adoptar una conformación α -helicoidal anfipática en el entorno de una vesícula fosfolipídica o en un disolvente mimético al de la membrana, como

trifluoroetanol-agua al 50% [11]. Por otro lado, otros AMPs también pueden ser cíclicos debido a la presencia de puentes disulfuro para estabilizar las láminas β y por la presencia de pequeñas estructuras de anillo encerradas por un enlace tio-éter. [1,5,12]. Son hidrófobos, debido a la presencia de al menos 50% de aminoácidos apolares tiene influencia en la selectividad y actividad de los AMPs [13,14].

1.1.1.2 *Mecanismos de acción*

Los AMPs presentan diferentes mecanismos de acción. Las interacciones moleculares de algunos AMP y los microorganismos dependen de la variedad de dianas, en particular las bacterias Gram positivas y Gram negativas [6]. Generalmente, los mecanismos de acción de los AMP se pueden clasificar en dos grupos básicos: (i) los mecanismos disruptivos, que están asociados con la lisis de la membrana; y (ii) los mecanismos no disruptivos de la membrana, que se centran en neutralizar los objetivos intracelulares [15]. Independientemente del grupo propuesto, el primer paso de cualquier mecanismo es la interacción molecular entre el AMP y la membrana citoplasmática. La fuerza impulsora de dicha interacción es la fuerza electrostática que presenta el AMP, que normalmente es catiónico, y la superficie polianiónica de las bacterias [6,16]. Los AMP generalmente inhiben el crecimiento de los patógenos al interactuar con los fosfolípidos de la membrana, lo que da como resultado la permeabilización de la membrana y la posterior ruptura.

Los mecanismos disruptivos se presentan en cuatro modelos clásicos: (i) el modelo Toroidal; (ii) el modelo Alfombra; (iii) el modelo Agregado; y (iv) el modelo Barrel. Todos los modelos no son mutuamente excluyentes, lo que permite que un único AMP pueda presentar una estrategia de impactos múltiples basada en dos o más mecanismos simultáneos [16,17]. Los mecanismos no disruptivos se basan en que el AMP atraviesa la membrana debido a las características combinadas de la secuencia de AMP y la composición de la membrana, y la inhibición de algunas reacciones del metabolismo celular, lo que provoca la muerte celular. Hay dos formas diferentes en que un AMP ingresa a la célula. Una de las formas en las que los AMP ingresan en la célula es por la translocación espontánea a través de la membrana. En este método, denominado método de Shai-Matsuzaki-Huang, un AMP α -helicoidal se une en paralelo a la membrana. Los residuos hidrofóbicos frente a la membrana permiten la internalización de parte de los AMP y el cambio de su organización a un modo transversal formando

poros toroidales [6,15,16]. Luego que el péptido se encuentra en el citoplasma los AMP pueden apuntar a una variedad de sitios intracelulares, secuencias tanto promotoras como codificantes, sitios de unión de ARNm, sitios reguladores de enzimas y sitios de preplegado de proteínas. Estas interacciones inhibitorias implican el bloqueo de la transcripción del ADN y / o la traducción del ARN, o el plegamiento incorrecto de proteínas, lo que desencadena el fallo de las vías metabólicas y la muerte celular [17].

1.1.2 Diversidad de péptidos antimicrobianos de anfibios

La piel de los anfibios (ranas y sapos) es una fuente extraordinariamente rica de AMPs [18]. En las últimas décadas se han reportado más de mil péptidos antimicrobianos (AMPs) provenientes de la secreción cutánea de especies de anfibios. Generalmente, cada especie de anfibio puede expresar su propio repertorio de AMPs (típicamente, 10-20 péptidos) con diferentes secuencias, tamaños y espectro de acción, lo que implica una divergencia muy rápida, incluso entre especies estrechamente relacionadas. Según la base de datos ADP3 existen 1.021 péptidos antibacterianos y 505 péptidos antifúngicos encontrados en anfibios (ver APD3 <http://aps.unmc.edu/AP/> ingresado el 16 de julio de 2022) [19]. Los AMPs encontrados en los anfibios se han caracterizado en catorce familias pertenecientes tanto a Archaeobatrachia como a Neobatrachia, donde se han encontrado más de 40 familias de péptidos sobre la base de las similitudes de secuencia [20]. Sin embargo, este número puede estar infravalorado porque muchos péptidos descritos en la bibliografía no aparecen en la APD3. Además, se han descrito varios péptidos huérfanos, que no se parecen a ningún miembro de las otras familias de péptidos. Para una lista completa de todos los AMPs de piel de anfibios conocidos, véase también la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

1.1.3 Péptidos antimicrobianos de la familia Bufonidae

Los estudios realizados en la familia Bufonidae han obtenido péptidos y proteínas antimicrobianas y anticancerígenas de la piel y el tracto gastrointestinal de algunas especies de *Bufo*, *Duttaphrynus*, y *Rhinella* [21]. Se identificaron dos péptidos derivados de la catelicidina designados como BG-CATH (37) y BG-CATH (5-37) a partir del ADN del sapo asiático *Bufo gargarizans*. Se descubrió que ambos péptidos inhiben las bacterias acuáticas *Vibrio splendidus*, *Streptococcus iniae* y *Aeromonas hydrophila* que generalmente se encuentran en el hábitat de este anfibio [22]. Recientemente, se

descubrió mediante el empleo de técnicas transcriptómicas y peptidómicas que el extracto acuoso de la secreción de *B. gargarizans* contiene una gran cantidad de péptidos únicos, 23 de los cuales mostraron propiedades defensivas [23]. Se identificaron péptidos antimicrobianos de las familias buforina, kassinina, temporina, peroniina y rugosauperoilina a partir del ADN de la piel de *Rhinella diptycha*. Se detectó actividad caseinolítica que confirma la actividad de la proteasa en las secreciones cutáneas del anfibio [24]. Además, se predijeron ocho péptidos con actividades antimicrobianas potenciales a partir de la secuencia de ADN de las histonas H2A de *Duttaphrynus melanostictus* y *Phrynooidis asper*. El análisis *in silico* reveló que estos péptidos muestran una cara cargada positivamente, agregación de membranas celulares bacterianas y ausencia de sitios de escisión para la alfa-quimotripsina, lo que sugiere una actividad antimicrobiana prometedora [25]. Adicionalmente, el uso de especies de anfibios en el tratamiento de enfermedades por grupos humanos de diferentes culturas evidencia su importancia en la medicina tradicional. Entre las 47 especies de anfibios reportadas como utilizadas en prácticas etnomedicinales, 15 especies son miembros de la familia Bufonidae [26].

1.1.4 Biomoléculas en el género *Atelopus*

Se han descrito toxinas con actividad antimicrobiana del género *Atelopus* como las zetekitoxinas (alcaloides potentes expulsadas por *Atelopus zeteki*) aún no caracterizadas [27]. Además, se han encontrado tetrodotoxinas en casi todas las especies de *Atelopus* estudiadas para buscar alcaloides [28–32]. Aparte de alcaloides también se han hecho búsquedas de esteroides donde se han encontrado una gran variedad en la familia Bufonidae, sin embargo, no existen estudios de péptidos en el género *Atelopus* [33,34]. A pesar de que esta familia ha sido escasamente prospectada en péptidos se han encontrado unos pocos en otros géneros de los Bufónidos como *Bufo bufo* y *Rhinella marina* [35].

1.2 Planteamiento del problema

Durante años se han usado para combatir microorganismos patógenos salvando millones de vidas, pero la automedicación sin prescripción médica y la suspensión del tratamiento, han dado lugar a la aparición de microorganismos multirresistentes [36]. En la mayoría de los casos las infecciones multirresistentes terminan en muerte, lo que

anualmente suma alrededor de 700 000 muertes a nivel mundial [37]. En EE. UU. los costes de hospitalización por infecciones de bacterias multirresistentes oscilan entre los \$1900 millones con 11 852 muertes y 448 224 días de hospitalización en 2017 para 87 509 pacientes ancianos[38]. Por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud publicó en el año 2017 una lista de doce patógenos resistentes a los antibióticos para los cuales la búsqueda de nuevos antimicrobianos es prioritario [39]. El problema de resistencia microbiana a los antibióticos también se refleja en Ecuador. El Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) ha reportado casos de resistencia microbiana a diferentes antibióticos, en *Escherichia coli* (ampicilina y cefepime), *Klebsiella pneumoniae* (cefazolina, cefotaxima, ceftazidima y nitrofurantoina), *Staphylococcus aureus* (melitina, clindamicina y rifampicina) y *Pseudomonas aeruginosa* (gentamicina) [40]. El 50% de 55.106 casos ingresados hospitalariamente por infecciones a bacterias resistentes registrados en los años 2014-2018 corresponden a infecciones por *E. coli* [41]. Por otro lado, las bacterias resistentes a los antibióticos ya no son solamente un problema intra-hospitalario, sino también se ha convertido en una transmisión comunitaria [42]. Esto provoca mayor preocupación en la comunidad, sobre todo en países en vías de desarrollo en los que la mayoría de las infecciones están relacionadas a la pobreza, falta de saneamiento y falta de agua potable[36]. Bajo esta creciente problemática, es imperativo la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica. Una opción prometedora para combatir la resistencia de los microorganismos son los péptidos antimicrobianos debido a que presentan un mecanismo de acción no específico que desintegra la membrana o inhibe sus ciclos bioquímicos, lo que permite que los microorganismos no generen resistencia. Esta ventaja promete a los AMPs como un candidato potencial para reemplazar a los antibióticos y controlar la creciente resistencia bacteriana actual.

1.3 Justificación

La aparición de cepas resistentes a los antibióticos ha renovado el interés en el desarrollo de nuevos enfoques para el diseño de antibacterianos y antifúngicos basados en péptidos que sean menos dañinos para las células huésped [43,44]. Los AMPs se consideran cada vez más como posibles agentes terapéuticos[45]. Debido a que, la muerte celular del agente infeccioso no implica la unión a receptores específicos en la membrana celular, sino más bien una interacción no específica con los fosfolípidos de membrana a diferencia de los compuestos bioactivos comunes [44]. En consecuencia,

el desarrollo de resistencia a los péptidos antimicrobianos tiene lugar a tasas de órdenes de magnitud inferiores a las observadas para los antibióticos convencionales.

Atelopus es el género más grande de los Bufónidos con 97 especies descritas hasta la fecha [46] que se distribuyen en desde Costa Rica hasta Bolivia. En las últimas tres décadas, de las 97 especies de *Atelopus* descritas hasta el momento, tres (3%) están extintas, 66 (68%) se consideran en peligro crítico, seis (6%) en peligro y otras cinco (5%) vulnerables [47]. El Ecuador registra 25 especies del género *Atelopus*, de las cuales 18 son endémicas. *Atelopus nanay*, es una de las especies endémica de Ecuador descrita en el 2002, actualmente en peligro crítico de extinción [48,49]. Se distribuye en las estribaciones suroccidentales de la Cordillera de los Andes de Ecuador en la provincia del Azuay (Figura 1) [48]. La especie aún no ha sido estudiada, pero se encuentra enmarcada dentro del Proyecto de Conservación de Anfibios y sus Recursos Genéticos (PARG) que pretende estudiar los compuestos bioactivos de los anfibios para su conservación. Esta especie podría ser un posible candidato para descubrir nuevos compuestos bioactivos por los antecedentes peptidomimicos encontrados en los Bufónidos descritos previamente. El estudio de esta especie es de vital importancia debido a su estado de conservación, ya que podría ser la última oportunidad de descubrir sus compuestos bioactivos.

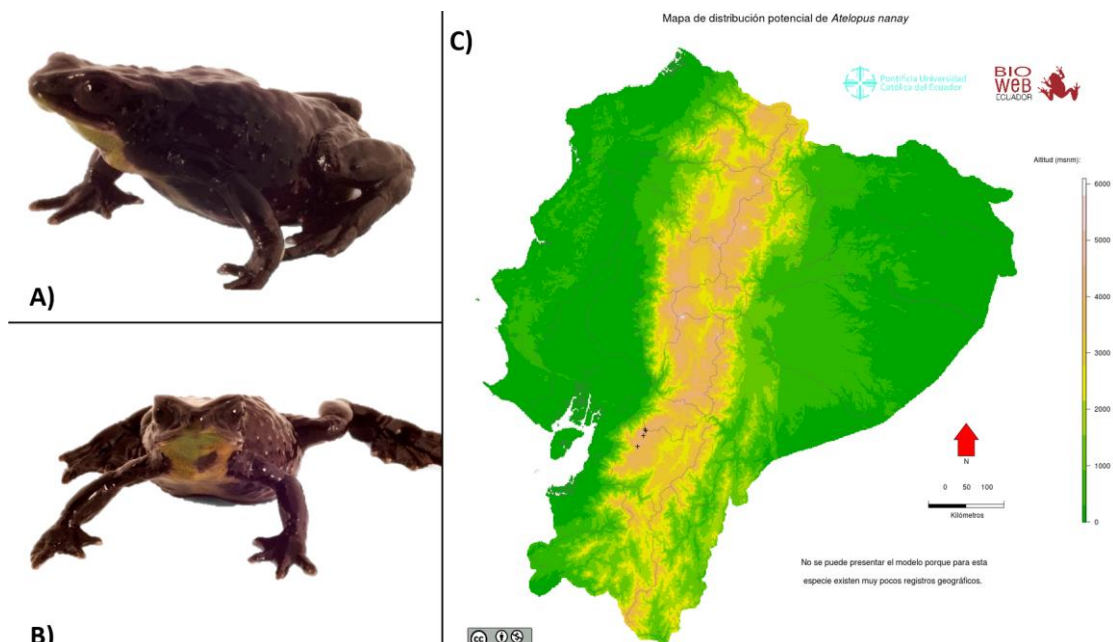


Figura 1. *Atelopus nanay*. A) *A. nanay* vista lateral (fotografía tomada por Luis A. Coloma), B) *A. nanay* vista frontal (fotografía tomada por Luis A. Coloma), C) Mapa de distribución de *A. nanay*. Fuente: Ron, 2022.

1.4 Objetivos de investigación

Objetivo General

Caracterizar la actividad antimicrobiana y la estructura primaria de al menos un péptido proveniente de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*.

Objetivos Específicos

1. Fraccionar los compuestos de la secreción cutánea de *A. nanay* y analizar su actividad antimicrobiana.
2. Determinar las posibles familias de péptidos presentes en la secreción y las fracciones con actividad antimicrobiana mediante espectrometría de masas en tándem.
3. Determinar la estructura primaria de al menos un péptido de la secreción cutánea de *A. nanay* a través de clonaje molecular.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Extracción de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*

En este estudio se emplearon nueve especímenes adultos machos de *Atelopus nanay* (colectados un mes previo a la extracción), proporcionados por el Zoológico-Bioparque Amaru (Cuenca-Ecuador). La secreción de la piel de cada uno de los nueve especímenes se obtuvo mediante la estimulación de la zona dorsal, aplicando masajes que provocaron estrés en el animal y posterior liberación de los compuestos de interés en la superficie de la piel. Las secreciones se colectaron mediante lavados con agua destilada en dos tubos cónicos estériles de 50 mL. El primero con un pool de secreciones de 4 especímenes y el segundo con un pool de 5 especímenes. Posteriormente, las muestras se transportaron en refrigeración al laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiám, donde fueron liofilizadas y conservadas a -20 °C hasta su análisis [50,51]. Las ranas fueron regresadas a sus terrarios sin daño evidente.

2.2 Fraccionamiento de la secreción cutánea de *A. nanay* por RP-HPLC

Una alícuota de secreción cutánea liofilizada (correspondiente a 4.6 mg) se disolvió en 150 µL de tampón A (99,95% H₂O, 0,05% de ácido trifluoroacético), se clarificó por centrifugación y se filtró con una membrana de 0.22 µm. Posteriormente, se inyectaron 100 µL en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con detector UV/Vis (2489), Bombas e inyector (2545), Colector de fracciones III (Waters, USA) acoplado con una columna analítica Phenomenex Jupiter C18 (300°A, 5mm, 4,6 x 250 mm). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 90% tampón A (99,95% de H₂O, 0,05% de ácido trifluoroacético) a un 100% de tampón B (99,95% de acetonitrilo, 0,05% de ácido trifluoroacético) en 240 min a un flujo de 1 ml/min. La detección se realizó a 214 y 280 nm y se recolectaron 240 fracciones. Se prepararon alícuotas de 500µL de las 240 fracciones y se almacenaron a 4°C [50,51].

2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC de la secreción cutánea de *A. nanay*

Las 240 fracciones obtenidas por HPLC fueron analizadas mediante ensayos de actividad antimicrobiana. Primero, se concentraron 500 µl de cada fracción en un concentrador de vacío y se resuspendieron en 20 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Se prepararon placas de agar Mueller Hinton (MHA) con *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Candida albicans* (ATCC 10231) en una concentración de 1x10⁶ UFC/ml y se realizaron agujeros sobre el agar con una pipeta Pasteur estéril [52]. Se probó la actividad de cada fracción contra los tres microorganismos por triplicado. Para esto, se transfirieron 2 µl de cada fracción a tres orificios de cada placa conteniendo los microorganismos antes mencionados. El DMSO se utilizó como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas y se registraron las zonas de inhibición de crecimiento como actividad antimicrobiana.

2.4 Análisis por MALDI-TOF MS de la secreción y las fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana

Las masas moleculares de los compuestos en cada fracción y la secreción se determinaron 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) en modo de detección reflectrón empleando matriz de ácido α -Cyano-4-hydroxycinnámico (CHCA). Sobre una placa para MALDI-TOF, se dejaron secar dos microlitros de muestra más 1 μ l de matriz (10 mg/ml) y se analizaron posteriormente en un rango de 1000-3500 Da con un poder de láser de 40V, recolectando un total de 500 perfiles. Los espectros de masas se analizaron en el programa Shimadzu Biotech MALDI-MS y se obtuvieron las masas moleculares en una gráfica de intensidad vs masa/carga [50].

2.5 Espectrometría de masas en tándem de la secreción cutánea y de las fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana de *A. nanay*.

2.5.1 Secreción cutánea

La secreción cutánea fue analizada mediante un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (QTOF) marca Waters Modelo XEVO G2-XS QTof. Se diluyó 1 mg de la secreción cutánea en el tampón A (99,90% de H₂O, 0,1% de ácido fórmico), se filtró en una membrana de 0,22 μ m y se inyectó directamente a una columna de UPLC (Waters Acquity UPLC BEH C8 1,7 μ m; 2,1 \times 50 mm) conectado al espectrómetro de masa. El gradiente de elución lineal se formó desde el 95% del tampón A hasta el 100% del tampón B (19,9% de H₂O, 80% de acetonitrilo, 0,1% de ácido fórmico) durante 23 min a un flujo de 0.2 ml/min [50]. El análisis de masas se realizó en modo iones positivos con espectros adquiridos en análisis sensitivo. Las condiciones se basaron en un voltaje de cono de muestra de 50 V, una temperatura de fuente de 80 °C, una temperatura de desolvatación de 450 °C, un caudal de gas de desolvatación de 900 Lh- 1 y caudal del gas del cono de 30 L/h. Se utilizó el método de análisis de datos MS^e (+1) y adquisición tradicional dependiente de datos (DDA) (+1,+2,+3,+4). Los parámetros para la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en MS^e fueron rango de masas de 300-2000 Da y energía de colisión en rampa 30-60V. En la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con DDA, se analizó el rango m/z 50-2000 Da con un umbral de 5x10⁵, una condición de tiempo de escáner de la MS survey de 0.5 s, 10 iones MS/MS máximos a partir de un único barrido de MS survey, tiempo de escaneo de 0.5 s en formato continuo con un threshold de 5000 y una energía de colisión en rampa de C (-) 6-9V y C (+) 40-80 V [53]. El análisis de masas se realizó en modo de barrido completo, luego se seleccionaron los iones peptídicos con un threshold de 5x10⁵ para su fragmentación

por disociación inducida por colisión (CID), para generar iones *b* y *y* que se detectaron en un segundo análisis de masas. La configuración del detector y la calibración se realizaron a través del software MassLynx™ (Waters). Se utilizó el péptido K8K10 (VKGVGKVKLKAVSKL) diseñado a partir de CZS-1 de la secreción de *Cruziophyla calcarifer* como péptido conocido [50]. El error del equipo se calculó con la fórmula de la masa real del péptido conocido menos la masa observada o leída dividido para la masa real por 1000000. El análisis de los espectros de masas se realizó en el programa Mascot Distiller 2.7.1 (Matrix Science).

2.5.2 Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana

Las fracciones con actividad antimicrobiana fueron analizadas en el mismo equipo de espectrometría de masas en tándem de la sección 2.5.1. La preparación de muestra consistió en una inyección directa de las fracciones en la columna de UPLC-MS/MS, sin necesidad de filtración. Los parámetros en los que se utilizó el equipo fueron los mismos que se describieron en la sección 2.5.1 para MS^e en todas las fracciones. Los parámetros utilizados para DDA son los mismos parámetros descritos en la sección 2.5.1 en las fracciones 51, 52, 54, 57, 58, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 94 y 152, al cual se denominó DDA1. Adicionalmente se realizó otro método DDA para las fracciones 53, 55, 62, 67, 69, 79, 82, 83 y 84, al cual se denominó DDA2. El DDA2 consistió en analizar un rango *m/z* 50-2000 Da con un umbral de 1000, una condición de tiempo de escáner de la MS survey de 0.5 s, 25 iones MS/MS máximos a partir de un único barrido de MS survey, tiempo de escaneo de 0.5 s en formato continuo con un threshold de 1000 y una energía de colisión en rampa de C (-) 6-9V y C (+) 30-60 V. No se realizaron análisis de la fracción 49 debido a que el contenido se agotó en los ensayos de actividad antimicrobiana. El instrumento se calibró con leucina y se controló con el software MassLynx™ (Waters) y el análisis de datos se realizó con Mascot Distiller 2.7.1 (Matrix Science).

2.5.3 Análisis de los espectros de masas en el software Mascot Distiller

Los espectros de masa se analizaron con el programa Mascot Distiller. Este programa puede procesar los datos tanto de DDA como de MS^e. Primero, se realizó una detección de picos a los espectros de masa ajustando la distribución isotópica ideal a los datos experimentales. Esta distribución ideal se predijo a partir de la composición elemental

esperada para un péptido con una composición de aminoácidos promedio en ese punto de la escala de masas. Luego, el perfil de la distribución ideal se ajustó variando la masa, la resolución, la intensidad y el estado de carga, para maximizar la correlación con los datos experimentales. Una vez que se obtuvo el mejor ajuste, el pico se agregó a la lista de picos y la señal correspondiente se restó del espectro. El proceso se repitió hasta que se ajustaron todos los picos significativos. El estado de carga se determinó automáticamente y la lista de picos solo contuvo picos monoisotópicos, incluso cuando la relación señal/ruido fue deficiente o la distribución isotópica no se resuelve por completo. El alisado no fue necesario ni deseable. La detección de picos también se realizó tomando solo un rango del espectro de masas en picos preponderantes del espectro. Una vez procesados los picos se escogió la herramienta análisis en todos los picos y se colocó los parámetros de búsqueda: base de datos (Swiss-Prot, DADP y AMP_bufonidae), sin corte enzimático, tolerancia del péptido (± 1 Da), tolerancia de los iones fragmento (± 1 Da), carga (+2, +3, +4), instrumento (ESI-QUAD-TOF). Las bases de datos usadas fueron Swiss-Prot, péptidos defensivos de anfibios (DADP) (<http://split4.pmfst.hr/dadp/>; ingresado el 21 de octubre de 2021) con 2571 entradas correspondientes a 1923 secuencias diferentes de péptidos de anuros incluidos AMPs y otros péptidos de defensa [54] y una base de datos propia realizada manualmente con la recopilación de los péptidos antimicrobianos de la familia Bufonidae reportados en la literatura, denominada AMP_bufonidae. Posteriormente, el programa arrojó los resultados de similitud entre los espectros de masas y los péptidos de las bases de datos. Este proceso se realizó para ambos métodos de análisis.

2.6 Clonaje molecular de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*

2.6.1 Extracción de ARNm de la secreción

La extracción del ARNm de la secreción cutánea de *A. nanay* se realizó utilizando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ (DynaL Biotec, UK) con las especificaciones del kit. Primero, se diluyeron 3.3 mg de la secreción liofilizada en 1 ml de tampón de lisis/unión celular en un tubo de 1,5 mL. 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. Luego, el ARNm 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 [52].

2.6.2 Construcción de la librería de ADNc

El sistema GoScript™ Reverse Transcription System se empleó para sintetizar la primera cadena de 3' ADNc mediante transcripción reversa con su respectivo protocolo. Se incubaron 4ul de ARNm extraídos en el punto 7.6.1 para el 3'ADNc y 1 µl del primer 3'CDS (20 µM) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'; V=A, C, o G, N=A, T, C, o G). Para el 5'ADNc se realizaron 2 alícuotas. La primera de 3 µl del ARNm con 1 µl del primer 5'CDS (20 µM) (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'; V=A, C, o G, N=A, T, C, o G) y la segunda con 2 µl del ARNm con 1 µl del primer 5'CDS. Se incubaron en el termociclador por 5 min a 70°C seguidos de 5 min en hielo. A esta reacción se añadieron 15 µl de máster mix (Tabla 1) y se adicionaron 5 µl de 3'ADNc. Se prepararon 5 réplicas de esta librería de ADNc y se colocaron en el termociclador en el proceso de incubación a 25 °C por 5 min, extensión a 42 °C por 60 min e incubación a 70 °C por 7 min.

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

Reactivos	Volumen (µl)	
	1 Rx	5 Rx
H ₂ O PCR	5,8	29
Go Script 5X buffer	4	20
MgCl ₂ (1,5 a 5 mM)	3,2	16
dNTPs mix (10mM)	1	5
Go Script Retro transcriptasa	1	5
Volumen final	15	75

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022

Se realizó una purificación de las dos alícuotas del punto 2.6.2 de 5'ADNc con el kit Purelink con el fin de eliminar residuos de la anterior reacción realizada con el kit GoScript. Los tubos fueron concentrados después de la purificación. Se resuspendieron los tubos con 13 µl de agua PCR. Se utilizó un Máster mix compuesto de 4 µl de terminal transferasa 5x buffer, 1.6 µl de dCTP (20 mM), 0.35 µl de terminal deoxynucleotidyl T, 1.05 µl de H₂O PCR y 13 µl de 5'ADNc purificado para una reacción. El proceso se realizó durante 120 min a 37°C y durante 10 min a 70 °C, con el fin de obtener el 5'ADNc con citocinas adicionales al extremo 5' de la cadena de ADN (5'ADNc_C).

Posteriormente, se preparó un Máster mix compuesto de 17.75 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl 5X buffer green, 1 µl dNTPs, 1 µl primer SMART II, 0.25 µl Go Taq y 20 µl 5' ADNc purificado para una reacción, con el fin de realizar la extensión a partir del extremo 5' del ADN (5'ADNc_C). Se colocaron los tubos en un termociclador con los parámetros de desaturación inicial a 95 °C por 2 min, hibridación a 48 °C por 5 min, extensión a 72 °C por 30 min y preservación a 4 °C.

2.6.3 Amplificación rápida de ADNc (RACE PCR)

A partir de las librerías de ADNc se realizaron 5' y 3'-RACE PCR para obtener las secuencias nucleotídicas precursoras de los péptidos antimicrobianos que transcriben *A. nanay* [50]. Cada reacción estuvo compuesta de 9.4 µl de H₂O, 4 µl de 5X buffer green, 0.4 µl dNTPs (10mM), 0.5 µl primer forward (20 µM), 0.5 µl primer reverse (20 µM), 0.2 µl de GoTaq ADN polimerasa (Promega) y 5 µl de la librería de ADNc (5' ó 3'). Las reacciones se realizaron con diferentes temperaturas de hibridación, según el primer forward empleado (Tabla 2). Como primer reverso se utilizó el Nested Universal Primer (NUP) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'). Los parámetros de la corrida fueron desaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, annealing a 4 temperaturas diferentes dependiendo del primer por 0.5 minutos durante 40 ciclos, extensión a 72 °C por 10 minutos y preservación a 4 °C.

2.6.4 Diseño de primers

Los primers forward (Tabla 2) fueron diseñados en Primer-BLAST (NCBI) a partir de diferentes regiones conservadas de péptidos antimicrobianas descritos en el Orden Anura y por secuencias peptídicas encontradas en el análisis del espectro de masas en tándem de la secreción cutánea realizado en el punto 2.5. Se utilizó el primer reverse Nested Universal Primer (NUP) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') [50,52]. El primer Temporin-1Tb se diseñó basado en la secuencia del precursor nucleotídico del péptido Temporin 1Tb de *Rana temporaria* (número de acceso P79874). Los demás primers fueron recopilados de artículos científicos que realizaban clonaje molecular en anfibios para la búsqueda de AMPs.

Tabla 2. Primers forward empleados en RACE PCR.

Primer	Secuencia	Tm 1 (°C)	Tm 2 (°C)	Tm 3 (°C)	Tm 4 (°C)	Referencia
Random	Secuencia no conocida, número de catálogo: C1181	46	50	53	55	Kit Promega
PSA	5'- CAGCACTTTCTGAATTACAAGACC AA-3'	60	62	-	-	[50]
PDS	5'- CAGCACTTTCTGAATTACAAGACC AA-3'	60	62	59	61	[52]
CCAL	5'- TAGACCAAACATGGCTTTCCTGA-3'	53	55	-	-	[50]
DEG S1	5'- ACTTTCYGAWTTRYAAGMCCAAAB ATG-3'	52	54	56	-	[55]
DEG S2	5'- CCMRWCATGKCTTTCHTDAAGAAA TCT-3'	55	57	59	-	[56]
DER S1	5'- TGACCTTCAGTACCCAGCACTTTC- 3'	51	53	-	-	[57]
DER S2	5'- GTGGTACATAATTGATAATTGTGC T-3'	53	-	-	-	[57]
Temporin 1Tb	5'-CTGCTGCTGCTGTTTTTTC-3'	51	53	-	-	Diseño propio
Brevinin 2GHk	5'- CCMRWCATGKCTTTCHTDAAGAAA TCT -3'	53	55	-	-	[58]
Ranatuer in 2PLx	5'-GAWYYAYYHRAGCCYAAADATG -3'	51	53	-	-	[59]

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

2.6.5 Visualización de productos de RACE-PCR por electroforesis

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Se cargaron 3 µl de cada producto de PCR, su respectivo control negativo y el marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Promega, USA) [50]. Las condiciones de la corrida de electroforesis fueron de 400 mAmp, 70 V por 60 minutos. Para visualizar las bandas de ADN, el gel fue teñido en una solución de 5 µl de Diamond Nucleic Acid Dye (Promega) en 50 ml de TBE 1X con agitación orbital (Orbit LS, Labnet) durante 40 minutos y se visualizó el gel en un fotodocumentador marca Enduro GDS touch 1302 (Labnet, USA) con luz azul.

2.6.6 Purificación de productos de RACE PCR

Los productos de PCR de la sección 2.6.4 fueron purificados utilizando el protocolo PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™, USA) para eliminar los dímeros de dNTPs y restos de primers que se producen durante la reacción de PCR con las especificaciones del protocolo del kit. Se mezclaron 60 µl de producto de PCR y 240 µl de tampón de unión B2 del kit y se colocaron en la columna del kit acoplada a un tubo colector. Se centrifugó por 1 min a 10000 x g y el líquido que atravesó la columna fue descartado. Luego, se colocó la columna de regreso al tubo de colección y se adicionaron 650 µl de tapón de lavado W1 a la columna. Se centrifugó por 1 min a 10000 x g y se descartó nuevamente el líquido. Se realizó una última centrifugación a velocidad máxima por 3 min antes de descartar el tubo de colección para eliminar todo el tampón residual. La elución del ADN purificado se realizó con 50 µl de Tris-HCl (10 mM a pH=8,5). Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a velocidad máxima por 2 min. La concentración y pureza del ADN purificado se analizó en el NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermofisher, USA). El ADN se concentró por centrifugación al vacío y se almacenó a -20°C.

2.6.7 Ligación de productos de RACE PCR con vector pGEM-T easy

El producto de PCR purificado del paso anterior fue resuspendido en 5 µl de agua destilada estéril. La reacción de ligación se preparó con 2.5 µl de 2X Rapid ligation buffer, 0.5 µl de pGEM-T easy vector, 0.5 µl de T4 DNA ligasa (2 weiss units/ µl) y 1.5 µl de producto de PCR purificado. Luego, la reacción se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y a 4°C durante toda la noche.

2.6.8 Transformación bacteriana y selección de colonias

La transformación bacteriana del producto de ligación con el vector pGEM-T Easy se realizó en las cepas *E. coli* JM109 y *E. coli* DH5α. Primero, las células competentes almacenadas a -80°C fueron descongeladas sobre hielo. Luego, se transfirieron 2,3µl de la reacción de ligación del paso anterior y 50 de las células competentes a un microtubo y se incubó la mezcla en hielo por 20 min. Luego, se transfirieron rápidamente a 42°C por 50 segundos para provocar el shock térmico y se regresó al hielo por 2 min.

Las muestras se incubaron en 950 µl de medio SOC a 37 °C con agitación a 150 rpm por 2h y 30 min. Luego, se sembraron 100 µl del cultivo en al menos 4 placas de agar MacConkey suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Las placas se incubaron por 18 h a 37°C [50]. Doce horas después, 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).

2.6.9 Aislamiento de ADN recombinante

La extracción del ADN recombinante se realizó mediante la técnica de hervido [50]. Para lo cual se resuspendió cada colonia estriada en 20 µl de agua estéril. La lisis bacteriana se provocó incubando las muestras a 100°C por 5 min y luego se indujo shock térmico en hielo por 5 min. Los lisados se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante.

2.6.10 Amplificación de ADN recombinante de colonias mediante PCR y visualización de los productos de PCR por electroforesis

El ADN recombinante se amplificó por PCR utilizando los primers Forward M13F (5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCCAC-3') y Reverse M13R (5'-TGTGAGCGGATAACAATTTTCAC-3') [50]. Se preparó un máster mix compuesto por 15.5 µl de H₂O PCR, 5 µl de 5X buffer green, 0.5 µl de dNTPs (10 µM), 1.25 µl de primer forward M13, 1.25 µl de primer reverse M13, 0.25 µl de enzima GoTaq polimerasa y 1.25 µl de ADN recombinante. La reacción de PCR se realizó utilizando los parámetros de denaturación inicial a 94 °C por 1 min, 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 0.5 min, annealing a 55 °C por 0.5 min, extensión a 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X como se detalla en la sección 2.6.5.

2.7 Secuenciación por método de Sanger

Se seleccionaron los productos clonados con un peso mayor a 500 pb y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a la Universidad de las Américas (Quito, Ecuador).

2.8 Análisis bioinformáticos de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron en el software de acceso libre MEGA 11. 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” como inicio de la secuencia insertada en las lecturas forward (con el primer M13F) y se eliminaron las secuencias después de la cola de poli A en la secuencia insertada. Se identificó la secuencia “TAG TGA T” en las lecturas reverse (con el primer M13R). Se realizó un alineamiento básico local en BLAST/n con las secuencias nucleotídicas limpias. Posteriormente se tradujeron a secuencia de aminoácidos y se realizó un alineamiento básico local en un BLAST/p. Se compararon las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología con los filtros de organismo Amphibian y posteriormente con el filtro *Odorrana*, debido a las coincidencias encontradas en espectrometría de masas con péptidos de dicho género.

2.8.1 Propiedades fisicoquímicas de las secuencias

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) [50], la masa molecular teórica, hidrofobicidad y carga se obtuvo en Bachem Peptide Calculator [55] (<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptidecalculator/>).

2.8.2 Análisis de las secuencias en modelos de predicción de actividad antimicrobiana

Se analizaron las secuencias peptídicas en modelos de predicción antimicrobiana desarrollados en los últimos 10 años como CAMPR3 con los algoritmos Support vector machine (SVM), Random Forest, Artificial Neural Network (ANN) y Discriminant Analysis (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>) [56], Sense the Moment (<http://portoreports.com/stm/%3e>) [57], Anti-Microbial Activity Predictor (AMAP) (<http://faculty.pieas.edu.pk/fayyaz/software.html>) [58], Antimicrobial Peptide Scanner vr.2 (<https://www.dveltri.com/ascan/>) [59] y IA4AMP: Identify Anti-microbial Peptides in

IA (<https://axp.iis.sinica.edu.tw/AI4AMP/>) [60]. Adicionalmente, se realizaron tres predicciones con modelamientos donde se comparan 54 propiedades fisicoquímicas de los péptidos analizados a partir del paquete modlamp. Los algoritmos utilizados fueron: Random Forest, Support vector machine (SVM) y Stochastic Gradient Boosting (SGB) [61]. En esta tesis se denominará al modelamiento como: AMP Prediction AR.

2.8.3 Modelamiento de la estructura 3D

La estructura tridimensional de los análogos peptídicos se obtuvo mediante la herramienta I-TASSER y el modelo tridimensional obtenido se validó mediante un gráfico de Ramachandran [62] con el software BIOVA Discovery Studio.

2.8.4 Acoplamiento molecular

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular para determinar el posible mecanismo de acción de Arlequinin-AN3. Se mimetizó una membrana bacteriana Gram positiva utilizando el servidor CHARMM-GUI [63]. Este modelo contiene una bicapa lipídica con lípidos POPG y POPE en una proporción de 3: 1, respectivamente [64]. La membrana eucariota mimetizada utilizada fue POPC, una fosfatidilcolina, en una proporción (C16:0, 18:1) [65]. La estructura tridimensional del péptido fue obtenida en el paso 2.8.3. Finalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular entre la membrana bacteriana y de eucariota con el péptido utilizando Patchdock [66]. La energía de interacción entre las membranas y Arlequinin-AN3 se expresó como energías atómicas de contacto (kcal / mol) [67].

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Extracción secreción cutánea *Atelopus nanay*

Se obtuvieron un total de 8.93 mg de secreción liofilizada de los nueve especímenes adultos machos de *A. nanay*, distribuidos en dos alícuotas. La primera alícuota (4.6 mg) fue obtenida de un pool de 4 especímenes y la segunda alícuota (4.33 mg) de un pool de 5 especímenes.

3.2 Fraccionamiento de la secreción cutánea de *A. nanay* por RP-HPLC

Se detectaron dieciséis picos a 214 y 280 nm, evidencia de la presencia de péptidos y proteínas en dichas fracciones (Figura 2). Los siete picos correspondientes a las fracciones 0, 22, 46, 53, 72, 76 y 93, con una absorbancia de 280 nm, tres (0, 53, 72) superan las 2.4 UA y cuatro (22, 46, 76, 93) son menores a 0.4 UA. Por otro lado, nueve picos (0, 22, 46, 53, 72, 76, 84, 93, 152) fueron detectados con absorbancia de 214 nm. Cuatro de ellos (0, 53, 72, 93) sobrepasan los 0.6 UA y los otros cinco (22, 46, 76, 84, 152) son menores a 0.4 UA. Los siete picos detectados en 280 nm se superponen con los picos detectados en 214 nm. Sin embargo, en 214 nm se observaron dos picos adicionales correspondientes a los picos 84 y 152. Por otro lado, los tres picos con mayor intensidad de UA (0, 72, 76) absorbancias luz UV a 214 y 280nm.

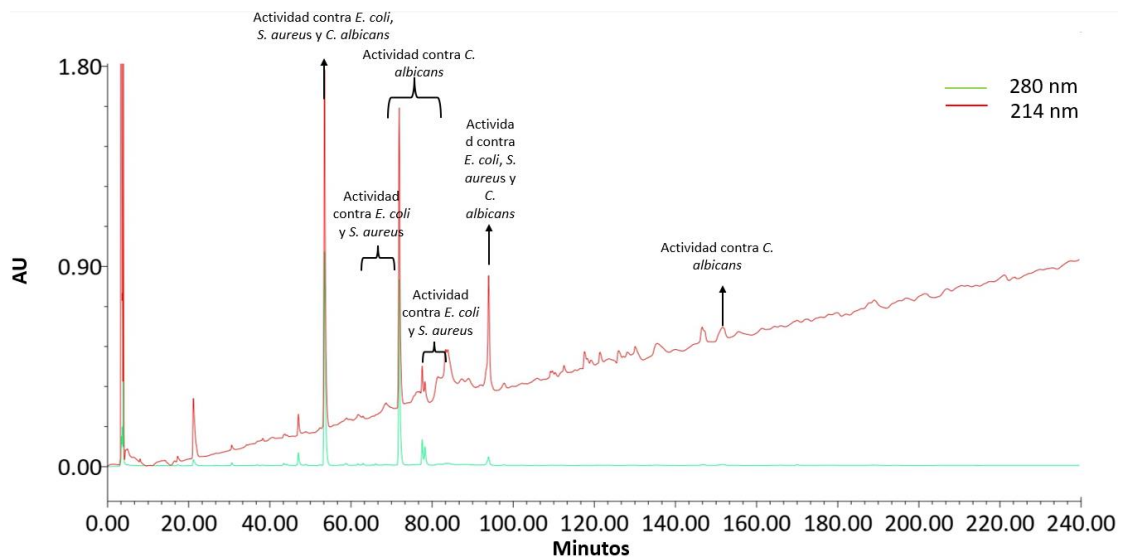


Figura 2. Cromatograma de HPLC de fase reversa de la secreción cutánea de *A. nanay* fraccionada durante 240 minutos con detección UV dual a 214 nm (línea roja) y 280 nm (línea verde). Las fracciones con actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* se identificaron dentro del cromatograma. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

3.3 Ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de RP-HPLC

Los ensayos de actividad antimicrobiana demostraron que 28 fracciones (Tabla 3), señaladas en la Figura 2, presentaron actividad. Las fracciones 52 y 94 presentaron actividad de amplio espectro, es decir, contra bacterias Gram negativas (*E. coli*), Gram

positivas (*S. aureus*) y levaduras (*C. albicans*). Las fracciones 49 y 62 fueron selectivas para *E. coli* y las fracciones 53, 54 y 55 para *S. aureus*, mientras que las fracciones 51 y 83 fueron capaces de actuar contra las dos bacterias. Por otro lado, 19 de las fracciones (57, 58, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 84 y 152) presentaron actividad contra la levadura *C. albicans* solamente. Es interesante notar que las fracciones 57, 64, 65, 66, 67, 68, 80 y 84 comparten actividad contra *E. coli* y *C. albicans*.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las fracciones de HPLC de la secreción cutánea de *A. nanay*

Número	Número Fracción RP-HPLC	Actividad antimicrobiana			Masa/carga preponderante MALDI-ToF MS (Da)
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
1	49	+	-	-	1420.38
2	51	+	+	-	3331.83 / 2596.64
3	52	+	+	+	2850.54 / 3331.93
4	53	-	+	-	2585.27 / 1275.91
5	54	-	+	-	2464.64 / 1361.42
6	55	-	+	-	1282.65 / 1546.78
7	57	+	-	+	2626.27 / 3052.13
8	58	-	-	+	1243.50 / 1549.51
9	62	+	-	-	1158.46 / 1482.28
10	64	+	-	+	1749.57 / 1284.88
11	65	+	-	+	1255.94 / 1791.50 / 2468.30
12	66	+	-	+	1862.95 / 2551.69 / 1485.45
13	67	+	-	+	1423.05 / 1717.55
14	68	+	-	+	1136.07 / 1439.90 / 2039.41
15	69	-	-	+	2707.30

16	70	-	-	+	3015.40 / 1833.45
17	72	-	-	+	1823.26 / 1165.28
18	73	-	-	+	2061.41 / 2940.01
19	74	-	-	+	1488.61 / 1977.44
20	76	-	-	+	2778.67 / 2495.85
21	77	-	-	+	1866.33 / 2286.46
22	79	-	-	+	2309.48 / 2598.38
23	80	+	-	+	2182.02 / 3356.92
24	82	-	-	+	2719.71 / 3352.65 / 2395.31
25	83	+	+	-	3248.21 / 2913.23
26	84	+	-	+	2830.82 / 2478.40
27	94	+	+	+	*
28	152	-	-	+	2666.23 / 1457.04

(*) No existe una masa preponderante, (+) actividad antimicrobiana positiva, (-) actividad antimicrobiana negativa. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

3.4 MALDI-TOF MS

Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF MS de la secreción y las fracciones con actividad antimicrobiana identificaron compuestos que presentaron un rango de masa/carga de 1000 a 3.500 Da (Tabla 3, Anexo 1). Se observan dos relaciones masa/cargas preponderantes correspondientes a 1987.22 Da y 2089.18 Da, las cuales podrían pertenecer a masas de péptidos presentes en la secreción.

Se realizó un análisis manual con las masas teóricas de los péptidos de los Bufónidos (Anexo 5) con respecto a las masas preponderantes y no se encontraron coincidencias. Al buscar familias de péptidos antimicrobianos reportados en Bufónidos con masas entre 1000 a 3500 Da y actividad antibacteriana en bases de datos ADP3 y CAMPR3, se encontraron las siguientes familias de péptidos: Aurein (1600-2500 Da), Brevinin (1200-2600 Da), Phylloseptina (1600-3000 Da), Temporin (1100-3000 Da), Ranatuerin (1300-3500 Da), Cruzioseptina (1900-2800 Da), Dermaseptin (2000-3500 Da), Caerin (2000-

3000 Da), Tigerinin (1000-2800 Da), Buforin (1500-3000 Da), Uperin (1000-2900 Da), Citropin (1000-2000 Da), Japonicin (2500-3500 Da), Nigrocin (2000-3000 Da), Ranacyclin (15000-2700 Da). Al filtrar en las bases de datos por actividad específica contra *C. albicans* y el mismo rango de masas anterior, se identificaron las siguientes familias: Dermaseptin (2000-3500 Da), Brevinin (1200-2600 Da), Temporin (1100-3000 Da), Ranatuerin (1300-3500 Da), Nigrocin (2000-3000 Da), Caeridin (2000-3000 Da), Ranacyclin (1900-3500 Da), Riparin (1100-1800 Da), Cruzioseptina (1900-2800 Da), Phylloseptina (1600-3000 Da) y Japonicin (2500-3500 Da), lo que podría sugerir la presencia de péptidos en dichas fracciones.

Posteriormente, se realizó un análisis manual entre las masas teóricas de los péptidos de Bufónidos (Anexo 5) con los resultados de las relaciones masa/carga de las fracciones detectadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS. En el análisis se encontró solamente el ion padre +1 del péptido Temporin-GH (número de acceso P84858) proveniente de *Rhinella diptycha* (Figura 3) en la fracción antimicrobiana 68.

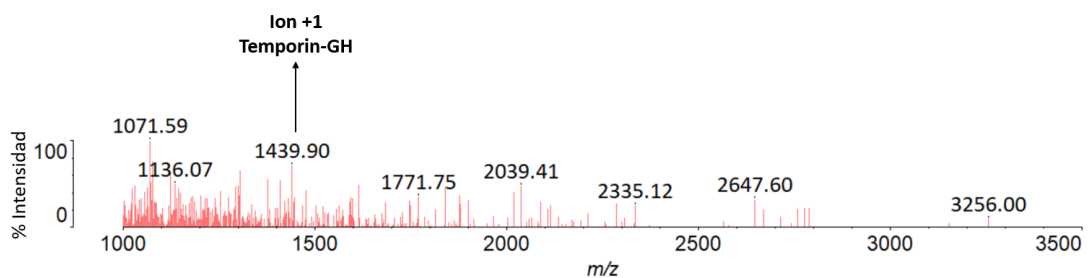


Figura 3. Espectro de masa de la fracción antimicrobiana 68. La flecha denota el ion +1 del péptido Temporin-GH obtenido por MALDI-TOF MS. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

3.5 Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem en la secreción cutánea y fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana de *A. nanay*.

3.5.1 Secreción cutánea

La secreción cutánea de *A. nanay* sometida al análisis de espectrometría de masas en tándem utilizando el sistema UPLC-MS/MS mostró coincidencias con cinco péptidos en las tres bases de datos ingresadas. Los péptidos Temporin-1BYa, Bas-ah, Ranatuerin-

2Ra, Riparin-1.3 (Figura 5-8) se encontraron con el método de adquisición MS^e y el péptido Rubellidin-4.2/4.3 (Figura 10) se encontró con el método DDA. El score de identificación con el software Mascot Distiller de cada uno de los péptidos demuestra similitud, pero no identificación.

En la figura 4 y 5 sección A, se pueden observar los cromatogramas con el método MS^e y DDA respectivamente, la flecha indica los picos en los que se encontraron las coincidencias con los péptidos. El péptido Temporin-1BYa se encontró con la base de datos de SwissProt, mientras que los péptidos Riparin-1.3 y Rubellidin-4.2/4.3 se encontraron con la base de datos DADP. Finalmente, los péptidos Bas-ah y Ranatuerin-2Ra se encontraron con la base de datos AMP_bufonidae. Las características estructurales y fisicoquímicas de las secuencias con coincidencias se pueden observar en la Tabla 4.

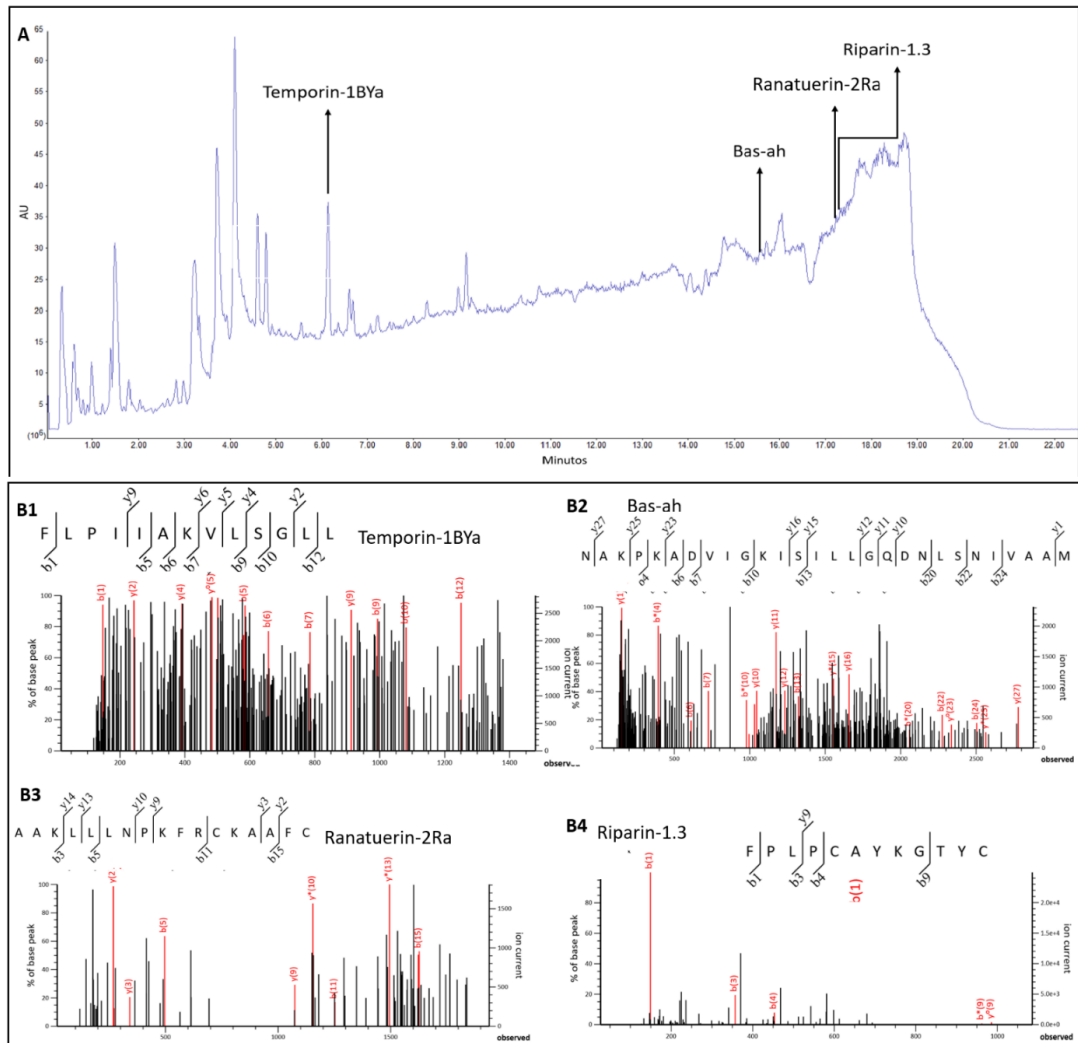


Figura 4. Cromatograma de la secreción cutánea de *A. nanay* con UPLC-MS/MS con el método MS^e. Las flechas denotan los puntos donde el programa Mascot Distiller encontró péptidos similares a Temporin-1BYa, Bas-ah, Ranatuerin.2Ra y Riparin-1.3. B1) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Temporin-1BYa. 15/48 iones fragmento en los picos más intensos. Ion score: 13%. B2) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Bas-ah. 21/145 iones fragmento en los picos más intensos. Ion score: 6.3%. B3) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Ranatueron-2Ra. 10/58 iones fragmento en los picos más intensos. Ion score: 2%. B4) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Riparin-1.3. 5/44 iones fragmento en los picos más intensos. Ion score: 0.4%. Los iones en rojo denotan las coincidencias encontradas por el programa Mascot Distiller entre los péptidos de la base de datos y el espectro de la secreción cutánea. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

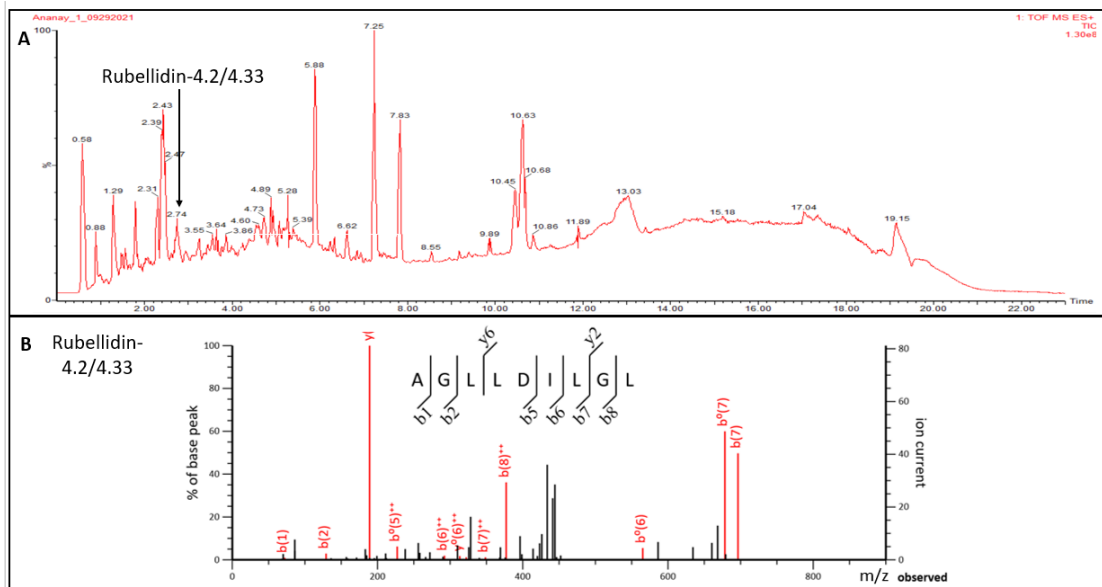


Figura 5. Cromatograma de la secreción de *A. nanay* con UPLC-MS/MS con el método DDA. Las flechas denotan los puntos donde el programa Mascot Distiller encontró un péptido similar a Rubellidin-4.2/4.3. B) Espectro de masa de iones fragmento *b* y del péptido Rubellidin-4.2/4.3. 11/48 iones fragmento en los picos más intensos. Ion score: 7%. Los iones en rojo denotan las coincidencias encontradas por el programa Mascot Distiller entre los péptidos de la base de datos y el espectro de la secreción cutánea. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

Tabla 4. Péptidos similares encontrados en la secreción cutánea de *A. nanay* mediante espectrometría de masas en tándem.

Péptido similar	Secuencia	Método de Adquisición	Base de datos	iones fragmento	Ion identificado	Masa /Carga experimental	Masa /Carga Teórica (Da)	Score	# Accesos
Temporin-1BYa	FLPIIAKVL SGLL	MS ^e	SwissProt	15	(+1)	1383.55	1382.89	13.1	P8416
Riparin-1.3	FPLPCAYKGT YC	MS ^e	DADP	5	(+1)	1362.51	1361.61	1.9	P86126
Basah	NAKXKADVIGKIS ILLGQDNLSNIVA AM	MS ^e	AMP_bu fonida e	21	(+1)	2892.64	2892.61	6.3	*

Rana tueri n- 2Ra Rube llidin- 4.2/4 .3	AAKLLLNPkFRC KAAFC	MS ^e	AMP_b ufonida e	10	(+1)	1893. 96	1893. 04	1. 8	P8 60 20
	AGLLDILGL	DDA	DADP	11	(+2)	883.4 9	883.5 3	7. 1	P8 20 75

(*) No existe información de ese segmento. Los segmentos se compararon con la rampa de energía de colisión de 30-60 V. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

3.5.2 Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana

Los análisis de espectrometría de masas en tándem de las fracciones antimicrobianas se realizaron por dos métodos de adquisición de datos MS^e y DDA. Se realizó un solo set de datos con MS^e debido a la poca cantidad de muestra. Se encontraron 43 coincidencias en 23 de las fracciones antimicrobianas (51, 52, 53, 54, 55, 58, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 80, 82, 83, 84, 94). El análisis mostró 23 coincidencias con la base de datos DADP y 20 coincidencias con la base de datos de SwissProt. Todos los péptidos fueron identificados con el ion precursor con carga (+1). Las masas/carga de los péptidos similares están en un rango de 793.45 a 2899.66 Da. Las familias de péptidos que más se encontraron en las fracciones antimicrobianas son las Tryptophyllin (10 totales, 5 correspondiente a T1, 4 a 1 y 1 a PbT-1, en las fracciones 53, 55, 54, 65, 66, 68, 70, 71, 73, 80), Temporinas (8 totales, 2 correspondientes a 1DYa, 1 a 1SPb, 1 a CDYb, 1 a ECa, 1 a K, 1 a OM2 y 1 a SN3, en las fracciones 52, 53, 66, 67, 71, 83, 94) y Bradykinin (5 totales, 4 correspondientes a AR-10 y 1 a Pnor-7, en las fracciones 54, 73, 74, 77, 94). Las Ranatachykinin (2 totales correspondientes a C, en las fracciones 58, 74), Dermorphin (2 totales, fracción 69), Caeridin (2 totales correspondientes a 1.4, fracciones 82, 84), Andersonin (2 totales, 1 correspondiente a K1 y 1 a P, fracciones 51, 94) y los demás péptidos se encontraron en menor proporción.

El puntaje (score) de trece de las 43 coincidencias es mayor a 10 (3, 6, 10, 17, 20, 24, 26, 30, 31, 36, 38, 39, 40) y uno mayor a 25 correspondiente a la concordancia 23. Un score aceptable para hablar de una identificación debería ser mayor a 60 puntos. Los resultados con un score mayor a 10 corresponden a las familias de péptidos: Tryptophyllin (Tryptophyllin-T1, Tryptophyllin-like peptide PbT-1), Litorin (Rhodei-litorin), Dermorphin (Dermorphin), Venom peptide, Bradykinin (Bradykinin-like peptide AR-10), Dynastin (Dynastin-2), Odorranain (Odorranain-V-RA2), Rubellidin (Rubellidin-4.1),

Caeridin (Caeridin-1.4) y Temporin (Temporin-1SPb). El resultado con un puntaje superior a 25 fue encontrado en la coincidencia 23 de la fracción 73. El resultado fue una coincidencia con un péptido similar a la Periviscerokinin-2 identificado en *Mastotermes darwiniensis* (Figura 6).

Tabla 5. Secuencias peptídicas encontradas en fracciones con actividad antimicrobiana de *A. nanay* obtenidas con el método MS^e mediante MS/MS.

Número	Fracción	Nombre del péptido similar	Secuencia	Base de datos	Iones fragmento	Ion identificado	Masa/carga Experimental (Da)	Masa/Carga Teórica (Da)	Ion score
1	51	Andersonin-K1	GMRLTYNRPCYATKKT KEM	DADP	3	(+1)	2402.06	2403.22	6.4
2	52	Temporin-1DYa	FIGPIISALASLFG	DADP	3	(+1)	1404.85	1404.80	4
3	53	Tryptophyllin-T1	RPPSWIPK	DADP	3	(+1)	979.47	979.56	11
4	53	Temporin-ECa	FLPGLLAGLL	DADP	4	(+1)	1012.51	1012.63	5
5	54	Bradykinin-like peptide AR-10	APVPGLSPFR	DADP	7	(+1)	1039.5191	1039.58	4
6	54	Tryptophyllin-like peptide PbT-1	EPPPWWVPV	SwissProt	3	(+1)	919.47	919.48	11
7	55	Brevinin-2AH2	GFLDKVKEF GKTAAKSVAQ GLLNAASCKLAKTC	DADP	4	(+1)	3396.61	3396.82	8
8	55	Tryptophyllin-T1	RPPSWIPK	DADP	6	(+1)	979.47	979.56	7

9	58	Ranatachykinin-C	HNPASFIGLM	SwissProt	9	(+1)	1085.56	1085.53	7
10	64	Rhodei-litorin	QLWATGHFM	SwissProt	5	(+1)	1089.51	1089.51	14
12	66	Tryptophyllin-1	KPPAWVP	DADP	4	(+1)	793.52	793.45	7
13	66	Temporin-SN3	FISGLIGGLMKAL	DADP	4	(+1)	1317.77	1318.77	7
14	67	Temporin-1DYa	FIGPIISALASLFG	SwissProt	8	(+1)	1405.12	1404.80	6.2
15	67	Temporin-CDYb	ILPILAPLIGLL	DADP	5	(+1)	1220.53	1220.81	4.6
16	68	Tryptophyllin-1	GPIPWQR	SwissProt	3	(+1)	853.36	852.46	7
17	69	Dermorphin	YAFGYPS	SwissProt	3	(+1)	803.36	803.35	10
18	69	Dermorphin	YAFGYPS	SwissProt	3	(+1)	803.36	803.35	8
19	70	Tryptophyllin-T1	RPPSWIPK	DADP	3	(+1)	979.50	979.56	5
20	71	Venom peptide 2	IWSGIQSAF	SwissProt	6	(+1)	1007.49	1007.51	10
21	71	Temporin-K	LLPNLLKSL	SwissProt	4	(+1)	1123.42	1122.74	6
22	71	Tryptophyllin-T1	RPPSWIPK	DADP	4	(+1)	980.49	979.56	5
23	73	Periviscerokinin	GSSGLIPMPRV	SwissProt	7	(+1)	1112.55	1112.60	33

-2

24	73	Bradykinin-like peptide AR-10	APVPGLSPFR	SwissProt	6	(+1)	1039.50	1039.58	11
25	73	[Val1,Hyp2,Thr6]-bradykinyl-Gln,Ser	VPPGFTPFRQS	SwissProt	8	(+1)	1232.61	1231.63	5
26	73	Tryptophyllin-T1	RPPSWIPK	DADP	3	(+1)	980.49	979.56	12
27	74	Bradykinin-like peptide AR-10	APVPGLSPFR	SwissProt	6	(+1)	1040.54	1039.58	7
28	74	Ranatachykinin-C	HNPASFIGLM	SwissProt	3	(+1)	1083.55	1085.53	7
29	75	Bombinin-like peptides 3	GIGAAILSAGKSALKGLA KGLAEHF	DADP	12	(+1)	2378.36	2380.04	6
30	77	Dynastin-2	GLLSSLGLNL	SwissProt	6	(+1)	985.49	985.58	13
31	77	Bradykinin-related peptide Pnor-7	VPPKGVSM	SwissProt	4	(+1)	814.39	813.44	11
32	77	Probradykinin-2	VPPGFTPFRQT	DADP	5	(+1)	1245.61	1245.65	6
33	80	Tryptophyllin-1	GPIPWQR	DADP	7	(+1)	852.31	852.46	6
34	82	Caeridin-1.4	GLLDGLLGGLGL	SwissProt	8	(+1)	1096.45	1096.65	6

35	82	Antimicrobial peptide	SIGAKILGGVKTFFKGAL KELASTYLQ	DADP	14	(+1)	2899.24	2899.66	6
36	83	Odorranain-V-RA2	GLISGKSVKGS	DADP	5	(+1)	1144.56	1144.68	11
37	83	Temporin-OM2	LLPIVDNLLYG	DADP	4	(+1)	1454.79	1454.87	6
38	84	Rubellidin-4.1	GLGDILG	SwissProt	12	(+1)	1039.50	1039.62	22
39	84	Caeridin-1.4	GLLDG	SwissProt	12	(+1)	1096.42	1096.65	20
40	94	Temporin-1SPb	FLSAITSLG	DADP	4	(+1)	1375.85	1374.84	11
41	94	Andersonin-P	VVEKMFKKFRCGLSGND C	DADP	3	(+1)	2059.92	2060.00	6
42	94	Bradykinin-like peptide AR-10	APVPGLSPFR	DADP	8	(+1)	1039.55	1039.58	5
43	94	Alyteserin-2a	ILGKLLSTAAGLLSNL	DADP	13	(+1)	1582.73	1582.97	4

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022

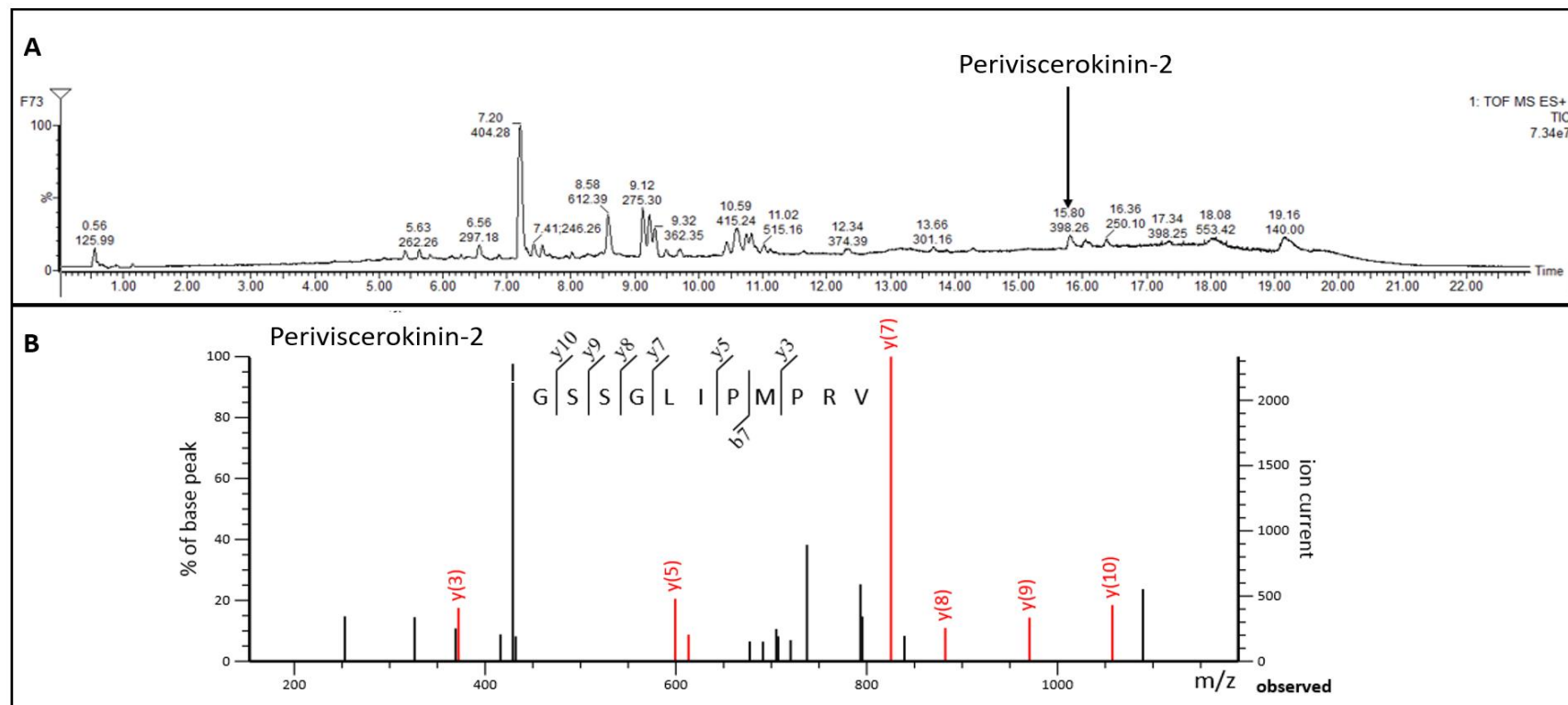


Figura 6. Cromatograma y espectro de masas de la fracción antimicrobiana #73. A) Cromatograma de la fracción 73 en el cromatógrafo líquido de ultra alta definición acoplado a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) con el método MSⁿ. Las flechas denotan los puntos donde el programa Mascot Distiller encontró un péptido similar a Periviscerokinin-2. B) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Periviscerokinin-2. Los iones en rojo denotan las coincidencias encontradas por el programa Mascot Distiller entre los péptidos de la base de datos y el espectro de la fracción 73. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

Las fracciones con actividad antimicrobiana se analizaron con dos sets diferentes en DDA. El primer set de fracciones antimicrobianas con el método DDA-1 (51, 52, 54, 57, 58, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 94 y 152) mostró una coincidencia con un péptido en la base de datos DADP en la fracción 152. El péptido similar se denomina Odorranain-A-OA12 proveniente de *Odorrana yunnanensis* (Figura 7). La figura denota los iones padres +2, +3 y +4, sin embargo, no existen coincidencias con los iones fragmento *b* y *y*. El error del equipo con este método fue de 598.101463 ppm.

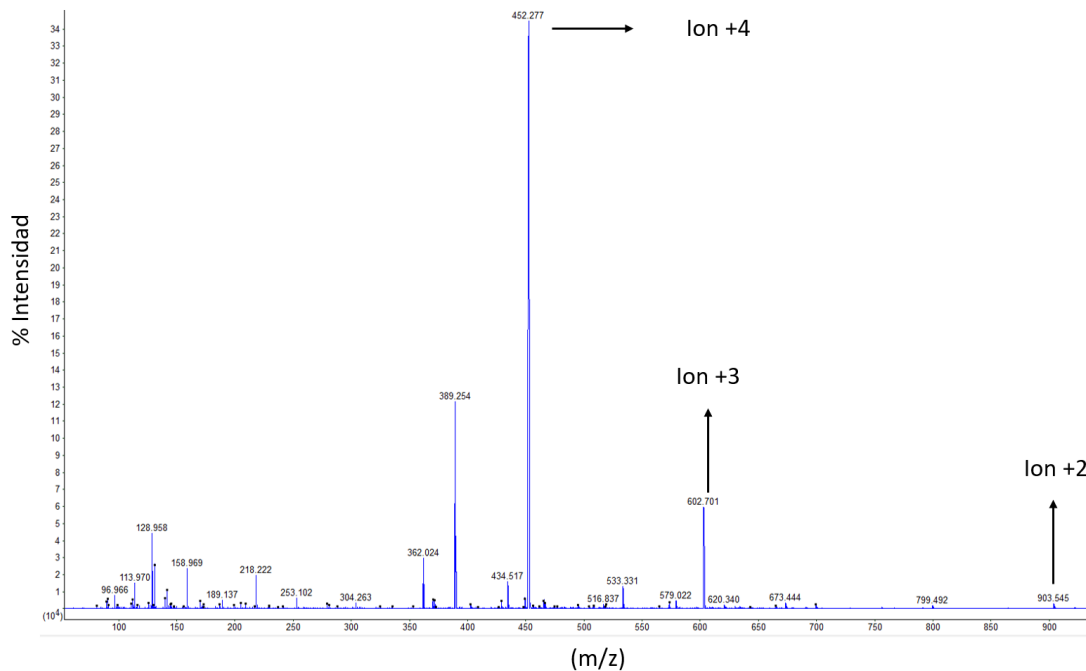


Figura 7. Espectro de masa de la fracción antimicrobiana #152 con método DDA. Las flechas denotan los iones padres +2 (903.54), +3 (602.70) y +4 (452.27) del péptido Odorranain-A-OA12. (Deconvolución 1805.08). **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

El segundo set de fracciones analizadas fueron las fracciones 53, 55, 62, 67, 69, 79, 82, 83 y 84. Se encontraron 3 coincidencias en 3 de las fracciones antimicrobianas (55, 79, 84) del total de las fracciones analizadas (Tabla 6). Las 3 coincidencias se encontraron con la base de datos de SwissProt. Las relaciones masa/carga de los péptidos similares están en un rango de 728.44 a 1039.63 Da. Los péptidos encontrados fueron Dynastin-1 y Rubellidin-4.1. Los dos primeros resultados correspondientes a las fracciones 55 y 79, tienen similitud con el péptido Dynastin-1 con un score mayor a 10, identificado en *Limnodynastes interioris*, mientras que el tercer resultado correspondiente a la fracción 84 tiene coincidencia con el péptido Rubellidin-4.1 con un score mayor a 25 (Figura 8)

identificado en *Litoria rubella*. Los dos péptidos Dynastin-1 fueron identificados con el ion precursor (+4) y Rubellidin-4.1 con el ion precursor (+2).

Tabla 6. Péptidos similares encontrados en las fracciones antimicrobianas con el método DDA-2 mediante espectrometría de masas en tándem.

Número	Fracción	Péptido similar	Secuencia	Base de datos	iones fragmento	Ion identificado	Masa Experimental (Da)	Masa Teórica (Da)	Ion score
1	55	Dynastin-1	GLLSGLGL	Swiss Prot	2	(+4)	727.96	728.44	11
2	79	Dynastin-1	GLLSGLGL	Swiss Prot	2	(+4)	727.96	728.44	16
3	84	Rubellidin-4.1	GLGDILGLLGL	Swiss Prot	25	(+2)	1038.64	1039.63	37

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

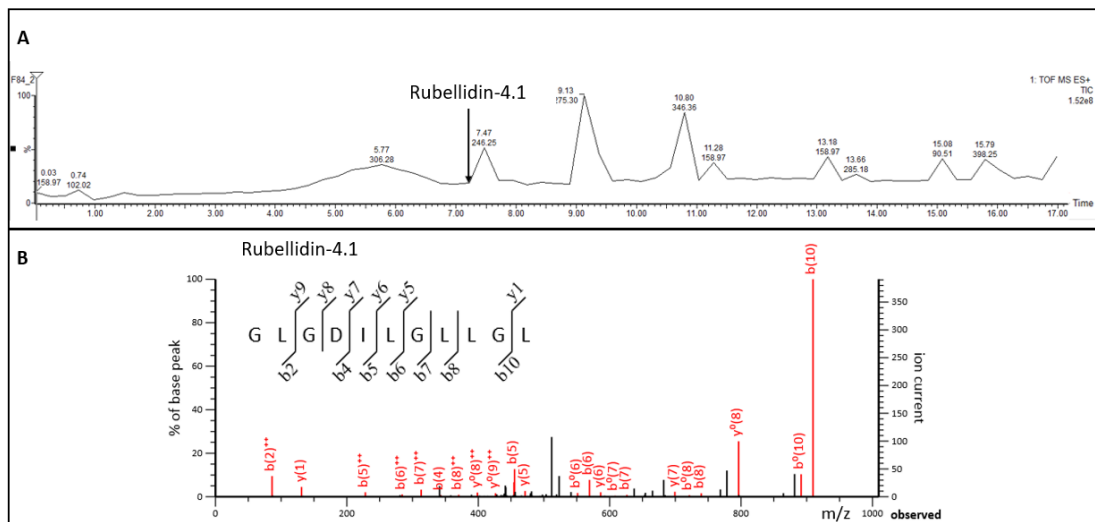


Figura 8. Cromatograma y espectro de masas de la fracción antimicrobiana #84 empleando el método DDA. A) Cromatograma de la fracción 84 en el cromatógrafo líquido de ultra alta definición acoplado a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) con el método DDA-2. Las flechas denotan los puntos donde el programa Mascot Distiller encontró un péptido similar a Rubellidin-4.1. B) Espectro de masa de iones fragmento *b* y *y* del péptido Rubellidin-4.1. Los iones en rojo denotan las coincidencias encontradas por el programa Mascot Distiller

entre los péptidos de la base de datos y el espectro de la fracción 84. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

3.6 Clonaje molecular

Los primers utilizados en esta sección fueron realizados en base a los péptidos de la Tabla 4, debido a que no se conocen péptidos identificados en el género *Atelopus*. El clonaje molecular dio como resultado bandas de 400-700pb de los cuatro primers. Se obtuvieron 100 colonias para cada par de primers (400 clones totales), de las 400 colonias analizadas solo 24 tenían amplificaciones mayores a 400 pb. Los 24 ADNc con amplificaciones mayores a 400 pb fueron enviadas a secuenciar.

Se envió a secuenciar un total de 21 amplificaciones de RACE PCR entre 50 y 550 pb de las cuales solo 18 tuvieron una lectura óptima (picos marcados y sin ruido) en la secuenciación. De los 18 ADNc analizados, 12 ADNc codifican 18 secuencias de aminoácidos que pueden ser nuevos péptidos, a partir de la biblioteca de ADNc construida a partir de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*.

Los marcos de lectura abiertos de estas secuencias contenían entre 54 y 565 nucleótidos. Las nuevas secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando la base de datos del NCBI blast/n. La secuencia 40 con el primer 5'Random mostró un porcentaje de identidad del 100% con un 5% de cobertura y $5e-05$ de valor E con una preprodermaseptina (579 pb) denominada *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* mRNA for preprodermaseptin H3(dpp-H3 gene) (número de acceso AM269412), proveniente de *Pithecopus azureus*. El resto de las secuencias no mostraron homología con secuencias peptídicas de anfibios reportadas previamente en el NCBI.

La traducción de nucleótidos a aminoácidos se realizó en tres marcos de lectura con el software MEGA 11. Las secuencias y el resultado del blast/p se detallan en la Tabla 7. Se escogieron todas las secuencias cuyo valor E fuera menor a 1. En resumen, todas las secuencias tienen un valor E menor a 10^{-6} , siendo la secuencia número 15 la única en acercarse con un valor E de 4×10^{-5} . Los mejores resultados del porcentaje de identidad fueron las secuencias 4, 6, 8, 9, 10, 14, 17 y 18 con un 100% de identidad y las secuencias 10 y 15 con un 100% de cobertura.

De las 18 secuencias encontradas, según la base de datos del NCBI, cinco (1, 3, 13, 15 y 16) tienen regiones cortas de homología con proteínas hipotéticas. Ocho (4, 6, 9, 10, 11, 14, 17 y 18) tienen homología con el péptido andersonin-M1, andersonin-M2 y andersonin-M3. Cuatro (2, 5, 7 y 12) secuencias tienen homología con productos proteicos sin nombre. La secuencia número 8 tiene homología con un precursor peptídico antimicrobiano denominado Brevinin-1E-OG6 (número de acceso ABG76229.1) proveniente de *Odorrana grahami* con un porcentaje de identidad del 100%, un query cover del 40% y un valor E de 0.28.

Tabla 7. Traducción de las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación Sanger y análisis en la herramienta blast/p.

#	Nombre	Primers	Secuencia	Péptido similar	Coverage (%)	Porcentaje de identidad (%)	Valor E	# Acceso
1	M13-D94	DERS1-NUP	MTSLFHIFLFFFYS	Charged multivesicular body protein 6-A-like	71	76.92	0.028	XP_040190873.1 ADP06184.1
2	M13-T25	Temporin 1Tb-NUP	IKQWYQRRVKKQQQNH	Andersonin-M2, M3, M1 peptide precursor	52	100	0.004	ADP06185.1 ADP06181.1
3	M13-T54	Temporin 1Tb-NUP	ITALPPAYSALIPLLKQWYQRRVKKQQQNH	Andersonin-M2, M3 peptide precursor	25	100	0.34	ADP06184.1 ADP06185.1 ADP06184.1
4	M13-R19	Random-NUP	IKQWYQRRVRGRAVGICLPSGALCKCS	Andersonin-M2, M3, M1 peptide precursor	33	100	0.016	ADP06185.1 ADP06181.1
5	M13-R47	Random-NUP	IKQWYQRRVRGWDL	Andersonin-M2 peptide precursor	100	75	0.002	ADP06184.1
				Andersonin-M3 peptide precursor	64	100	0.003	ADP06185.1
				Andersonin-M1 peptide precursor	100	68.75	0.029	ADP06181.1

6	M13-R49	Random-NUP	IKQWYQRRVEFFVRCVA	Andersonin-M2, M3 peptide precursor	82	71.43	0.003	ADP06184.1
7	M13-R55	Random-NUP	LRLVFIIFLLLSSSLLFFRLCVDTTA	Unnamed protein product	57	73.33	0.0588	ADP06185.1 CAF491072.2.1
8	M13-R55	Random-NUP	LSSGINAEYAGTAHDFPLPSLLFPLAHLTPSRL HHLSPPVFQPPLLPTLR	Hypothetical protein GDO86_018832	68	42.86	0.082	KAG843208.1.1
9	M13-R55	Random-NUP	IKQWYQRRVRGHGS	Andersonin-M2, M3 peptide precursor	64	100	0.003	ADP06184.1 ADP06185.1 ADP06181.1
10	M13-R55	Random-NUP	LSSSFTAFSSCSLNSVSSSSSFSSCLPASSSS DSALIPL	Hypothetical protein GDO78_020703	100	58.33	4e-05	KAG946060.9.1
11	M13-D25	DERS1-NUP	IKQWYQRRVLFFFFFFFFFSPPPFFFFGGKKPP KKGKKKKGGPPPPQKTKKKKKGGGVFFQKGP PHFIIFKGEKKKGF	Hypothetical protein AB205_004417.0	23	83.33	4e-07	PIO37225.1
12	M13-T80	Temporin-1Tb-NUP	IKQWYQRRVRGRKSSYLGSQRLICADNVKPR RR	Andersonin-M2 peptide precursor	25	100	0.37	ADP06184.1
13	M13-R71	Random-NUP	IKQWYQRRVPGKRSET	Andersonin-M2 peptide precursor	53	100	0.048	ADP06184.1

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

Se realizaron los alineamientos de las secuencias 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 y 13 que presentaron similitud con los péptidos Andersonin M2, M1 y M3 con la herramienta Alignments del blast/p (Tabla 8). Los alineamientos se realizaron con las tres mejores coincidencias dadas por el algoritmo de Blast/p. Los porcentajes de identificación varían de 71.43 a 100, los valores e varían entre 0.34 a 0.002 y los valores de query cover varían

de 25 a 100 con los péptidos Andersonin-M. Estos resultados nos indican que las ocho secuencias son similares para las Andersonin M, por lo que se realizó un alineamiento de las ocho secuencias con la secuencia completa de los péptidos Andersonin-M (Figura 9).

Tabla 8. Comparación de las ocho secuencias peptídicas con las mejores coincidencias del Blast/p.

Proteína	Organismo	Secuencia									Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso
		*	*	*	*	*	*	*	*	*				
#2 M13-T25	<i>Atelopus nanay</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V				
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	52	0.004	ADP06184.1
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	52	0.004	ADP06185.1
Andersonin-M1 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	K	R	V	88.89	52	0.066	ADP06181.1

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia													Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso			
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
#3 M13-T54	<i>Atelopus nanay</i>	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	K	K	Q	Q	Q	Q	N	H				

Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	25	0.34	ADP06184.1								
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	25	0.34	ADP06185.1								
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H-like	<i>Xenopus laevis</i>				Y	Q	R	N	V	G	K	Q	Q	Q	Q	K	H	76.92	41	0.77	XP_018123710.1

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia										Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso					
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*									
#4 M13-R19	<i>Atelopus nanay</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V										
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	33	0.016	ADP06184.1						
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	100	33	0.016	ADP06185.1						
Andersonin-M1 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	K	R	V	88.89	33	0.24	ADP06181.1						

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia													Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso			
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
#5 M13-R47	<i>Atelopus nanay</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	R	-	-	G	W	D	L				
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	A	I	Y	G	R	D	L	75	100	0.002	ADP06184.1
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V								100	64	0.003	ADP06185.1
Andersonin-M1 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	K	R	V	A	I	Y	G	R	D	L	68.75	100	0.029	ADP06181.1

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia													Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso	
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
#6 M13-R49	<i>Atelopus nanay</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	E	F	F	V	R				
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I	K	Q	W	Y	Q	R	R	V	A	I	Y	G	R	71.43	82	0.003	ADP06184.1

Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R V A I Y G R	71.43	82	0.003	ADP06185.1
Andersonin-M1 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q K R V A I Y G R	64.29	82	0.047	ADP06181.1

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia	Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso
#9 M13-R55	<i>Atelopus nanay</i>	I K Q W Y Q R R V				
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R V	100	64	0.003	ADP06184.1
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R V	100	64	0.003	ADP06185.1
Andersonin-M1 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q K R V	88.89	64	0.040	ADP06181.1

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia	% Identificación	Query cover (%)	E value	# Acceso
		* *				

#12 M13-T80	<i>Atelopus nanay</i>	I K Q W Y Q R R	V R G R K S S Y L						
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R	- - - - - - - -	100	25	0.37	ADP06184.1		
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R	- - - - - - - -	100	25	0.37	ADP06185.1		
NK-tumor recognition protein isoform X3	<i>Rana temporaria</i>	- - - - Y D	R R S R S R R S S Y S	64.71	53	2.4	XP_040208151.1		

*sitios conservados

Proteína	Organismo	Secuencia	Porcentaje de Identificación (%)	Query cover (%)	E value	# Acceso
#13 M13-R71	<i>Atelopus nanay</i>	I K Q W Y Q R R V P G K R S E T				
Andersonin-M2 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R V	100	53	0.048	ADP06184.1
Andersonin-M3 peptide precursor	<i>Odorrana yunnanensis</i>	I K Q W Y Q R R V	100	53	0.048	ADP06185.1

hypothetical protein	<i>Xenopus</i>	I K Q W Y Q R	K I C G K - - - -	72.73	73	0.76	CAF4980314.1
XELAEV_18021491mg	<i>laevis</i>						

*sitios conservados. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

El análisis de las ocho secuencias que presentaron similitud con Andersonin M2, M1 y M3 al cambiar el filtro de organismo de “Amphibia” a “Odorrana” en el blast/p, los valores de e se acercan más a 0. Para la secuencia 4 el valor pasa de 0.004 a 3e-06, la secuencia 6 pasa de 0.34 a 3e-04, la secuencia 9 pasa de 0.016 a 1e-05, la secuencia 10 pasa de 0.002 a 1e-06, la secuencia 11 pasa de 0.003 a 2e-06, la secuencia 14 pasa de 0.003 a 2e-06, la secuencia 17 pasa de 0.37 a 2e-05 y la secuencia 18 pasa de 0.048 a 3e-06. Una vez analizadas las secuencias de aminoácidos con las coincidencias del blast/p, se realizó un alineamiento en el programa Jalview con el algoritmo Clustal Omega (Figura 9). Donde conservation significa conservación del alineamiento total menos 25%, quality significa calidad de alineamientos basándose en puntuación de blosum62, consensus significa porcentaje de identidad y occupancy significa número de posiciones alineadas.

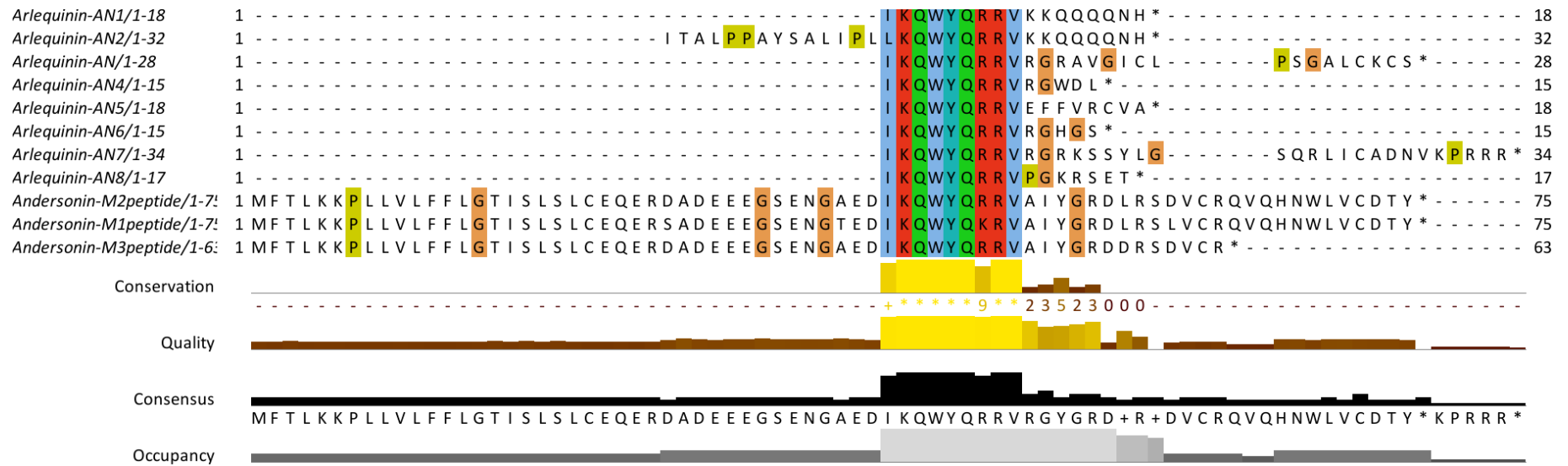


Figura 9. Alineamiento de secuencias peptídicas entre Andersonin-M2, M1 y M3 y las secuencias Arlequinin-AN 1-8 del clonaje molecular de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*. Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

En la literatura no se ha reportado la diferenciación del marco de lectura abierto de los péptidos Andersonin M2, M1 y M3. Sin embargo, con la información de las características de cada región de un péptido y con el alineamiento (Figura 9) se predice que la región donde tienen mayor similitud con las secuencias 4, 6, 9, 10, 11, 14, 17 y 18 pertenecen a la región ácida (aminoácidos 41-46), la región de corte (aminoácidos 47-48) y solo el primer aminoácido de inicio del péptido maduro (aminoácido 49) (Figura 9). Al realizar el marco de lectura abierto de dichas secuencias se separaron las diferentes regiones en: zona ácida (subrayada), el sitio putativo de corte enzimático RR (negrita y cursiva), el péptido maduro (color gris claro) y el codón de finalización está marcado con un asterisco (Figura 10). Los nombres de las secuencias de péptidos encontradas se escogieron debido a que *Atelopus nanay* es denominada comúnmente como Arlequín triste.

Arlequinin AN-1

I K Q W Y Q R R V K K Q Q Q Q N H *

```

1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAAAAAACAGCAGCAGCAGAATCACTAG
  * I R G R L Q V D H M G E L P T R W
55 TGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGG
  M H S L S I L * C H L N S L A * S W
109 ATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACTAAATAGCTTGGCGTAATCATGG
  S G L F P V *
163 TCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAA
  
```

Arlequinin-AN2

R R R M L P A A M A A A G I R F C C

```

1 GACGTRCGCATGCTCCC GGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTCTGCTGCT
  C C F F F G A F S G F F L P P S R L
55 GCTGTTTTTTCTTTGGTGCCTTCAGTGGCTTTTTTTTACCTCCTTCTCGGCTTG
  D I V R T N K P L G P * I T A L P P
109 ACATTTGTCCGCACAAATAAGCCTTTGGGACCCTAAATAA CTGCTCTTCCCTCCCG
  A Y S A L I P L L K Q W Y Q R R V K
163 CGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAAAA
  K Q Q Q Q N H *
  
```

Arlequinin-AN3

I K Q W Y Q R R V R G R A V G I C L

```

1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGCGAGCAGTAGGAATATGTTTG
  P S G A L C K C S * S K V K G S * *
55 CCTTCCGGTGCCTATGCCAAATGTTTCGTAGTCGAAGGTGAAAGGTTCTAGTAA
  S S I C G T T G L A K I L V I T P I
109 TCATCAATCTGCGGCACCA CCGGGTTGGCGAAGATTTTGGTTATTACGCCCATC
  L L P R R G R I L P F T S R T Q P P
163 TTGTTGCCAGACGCGGGCGTATCTTGCCATTACATCACGCACCCAGCCGCCT
  C H S A L I P L L N H * * I R O R L
217 TGCCACTCTGCGTTGATACCACTGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGGCCGCTG
  Q V D H M G E L P T R W M H S L S I
271 CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATT
  L * C H L N S L A * S W S * L F P V
325 CTATAGTGTCACTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTG
  *
379 TGA
  
```

Arlequinin-AN4

I K Q W Y Q R R V R G W D L * S G K
1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGTGGGATCTCTAATCTGGGAAG
I L H A S G Q R S S C A T T P E P V
55 ATTCTACATGCTTCTGGGCAACGAAGCTCGTGTGCTACAACTCCTGAGCCCGTG
F C N N R S H C S E N L V H R N * K
109 TTCTGCAACAACAGAAGCCACTGTCAGTGAGAACCCTGGTGCACCGCAACTAGAAA
V A P V L H N * R K A R A * Q * T P
163 GTAGCCCTGTTCTTCACTAGAGAAAAGCCCGTGCATAGCAATGAACACCC
S A A K N K * I * K K N S V G O Q A
217 AGTGCAGCCAAAAATAAATAGATTTAAAAGAAAAACAGTGTGGGTCCCAGGCT
P D C S D S A G L E * D Q G L C V D
271 CCAGACTGTTCTGATTCAGCAGGCTGGAGTAGGACCAAGACTCTGCGTTGAT
T T A * S L V N S R P P A G R P Y G
325 ACCACTGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGG
R A P N A L D A *
379 AGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAG

Arlequinin-AN5

I K Q W Y Q R R V E F F V R C V A *
1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTCGAGTTTTTCGTGCGATGCGTTCGCGTGA
T H C T R M K N G P I H F N G A F H
55 ACGCATTGCACTCGCATGAAAAACGGACCCATTCAATTTCAATGGGGCTTTTTCAC
M G V F F S L N A I A Y S K K R S M
109 ATGGGCGTTTTTTTTTCACTGAACGCAATCGCGTACAGTAAAAAACGCAGCATG
L Y I L R L A R I D T H A P I E M N
163 CTCTATATTTTGCCTCTGCACGCATGACACGCACGCACCCATTGAAATGAAT
G A A C K T H C T ? I D I R V O C E
217 GGGGCTGCATGCAAAACGCATTGCACTCARATTGACATCCGAGTGCAATGCGAG
F H A W F P * R *
271 TTTTCATGCATGGTTTTCCATAGAGATGA

Arlequinin-AN6

I K Q W Y Q R R V R G H G S * L S S
1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGCACGGCTCATGACTTTCCTCT
S F T A F S S C S L N S V S S S S
55 TCCTTCACTGCTTTTTCTCTTGCTCACTTAACTCCGTCTCGTCTTCATCATCT
F S S C L P A S S S S D S A L I P L
109 TTCTCCTCCTGTCTTCCAGCCTCCTCTTCTTCCGACTCTGCGTTGATACCACTG
? ? ? ? Y ? R ? V S R ? G T L ?
163 CTWAAKCRRTKKTATCARCGCRGAGTGAGCAGGGGGACCTTGCRGTGCCCTGCR
D F N L * R R ? V L L M V V F O T V
217 GATTTAATCTATGACGGCGTARTGTGTTACTAATGGTAGTCTTTGGGACTGTG
V P A L F R S L T R S S R V L C V D
271 GTCCCAGCTCTTTCAGGTCATTGACCAGGTCCTCCCGCTACTCTGCGTTGAT
T T A * ? L V ? S R P P A G R P Y G
325 ACCACTGCTTAATCRCTAGTGARTTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGG
R A P N A L D A *
379 AGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAG

Arlequinin-AN7

I K Q W Y Q R R V R G R K S S Y L G
1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGAGGAAGAGCAGTTATTTAGGG
S Q R L I C A D N V K P R R R * K K
55 TCCCAAAGGCTTATTTGTGCGGACAATGTCAAGCCGAGAAGGAGGTAAAAAAA
A T E G T K E K T A A A E S L V N S
109 GCCACTGAAGGCACCAAAGAAAAAACAGCAGCAGCAGAATCACTAGTGAATTCG
R P P A G R P Y G R A P N A L D A *
163 CGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAG
L E Y S I V S P K * L G V I M O I A
217 CTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
V S C V K L L S A H K
271 GTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAA

Arlequinin-AN8

```
1  I K Q W Y Q R R V P G K R S E T * S
* F T K K Q T E Y S S I L E T S K F
55 TGATTCACAAAAAAGCAGACAGAGTATTCCTCTATATTGGAAACTAGCAAATTT
T Q F T A A Q L T L E V S E N F Q E
109 ACTCAATTCACTGCAGCTCAGTTAACATTAGAGGTCAGCGAGAATTTCCAAGAG
L L M A F F L S L Q Y Q T D F L D V
163 CTCCTAATGGCATTTTTCTCTTTACAATATCAAACCTGATTTCTGGATGTA
N I C F K S D N F V D N * C K O A I
217 AACATATGCTTCAAATCTGACAACTTTGTGGACAACTAATGTAAAGAAGCAATA
* T Q L L P L R S I T S T V S F Q I
271 TAGACTCAATTAATACTACCGCTTCGGAGCATAAATTCAACAGTTAGCTTTTCAGATT
P Y C H D L D Q H *
325 CCTTATTGCCATGACTTGGATCAGCATTGA
```

Figura 10. Marco de lectura abierto de las secuencias nucleotídicas de Arlequinin-AN 1-8 de las amplificaciones de RACE PCR clonado de la secreción de *A. nanay* y su correspondiente traducción a secuencia de aminoácidos. La zona ácida del péptido está subrayado simple, el péptido maduro está marcado de gris, el sitio de corte está marcado en negritas, el codón de terminación está marcado por un asterisco. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

Las propiedades fisicoquímicas de las nuevas secuencias se observan en la Tabla 9. El tamaño de las secuencias peptídicas está en un rango de 6 a 25 aminoácidos. Las secuencias no tienen estructura de alfa-hélice. Los péptidos Arlequinin-AN3 y Arlequinin-AN5 tienen los valores más altos de hidrofobicidad de 0.55 y 0.82. Por otro lado, la hidrofobicidad de los péptidos Arlequinin-AN1 y Arlequinin-AN2 es negativa. La carga neta de Arlequinin-AN4 y Arlequinin-AN5 es 0, Arlequinin-AN6 y Arlequinin-AN8 es +1, Arlequinin-AN1 y Arlequinin-AN2 es de +2, mientras que de Arlequinin-AN3 es de +3 y de Arlequinin-AN7 es +7. Las masas moleculares teóricas tienen un rango entre 611.31-2914.62 Da.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de las nuevas secuencias peptídicas de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*.

Péptido	Secuencia de Aminoácidos	#AAs	Alfa hélice (%)	Hidrofobicidad (H)	Carga neta (z)	Masa molecular Teórica (Da)	Masa molecular Experimental (Da)
Arlequinin-AN1	¹ CCCCCCCC ₉ VKKQQQNH	9	0	0.56	+2	1136.60	1136.59
Arlequinin-AN2	¹ CCCCCCCC ₉ VKKQQQNH	9	0	0.56	+2	1136.60	1136.59
Arlequinin-AN3	¹ ETTCEEEECC ^T T ^C EEET ^C ₁₉ VRGRAVGICLPSGALCKCS	19	0	0.553	+3	1888.97	1888.98
Arlequinin-AN4	¹ CCCCCC ₆ VRGWDL	6	0	0.354	0	744.39	744.38
Arlequinin-AN5	¹ CCCCCCCC ₉ VEFFVRCVA	9	0	0.827	0	1068.54	1068.54
Arlequinin-AN6	¹ CCCCCC ₆ VRGHGS	6	0	0.133	+1	611.31	611.32
Arlequinin-AN7	¹ ETTC ^C CCCC ^C CT ^E EEEE ^H TT ^C CCCC ₂₅ VRGRKSSYLGSQRLICADNVKPRRR	25	4	0.057	+7	2914.62	2914.60
Arlequinin-AN8	¹ CCCCCCCC ₈ VPGKRSET	8	0	0.067	+1	872.47	872.46

*Alpha helix (H); Random coil (C); Beta turn (T); Extended strand (E). Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022

Tabla 10. Análisis en diferentes modelos de predicción de actividad antimicrobiana de las secuencias peptídicas de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*.

Secuencia	CAMPR3 Support Vector Machine (SVM)	CAMPR3 Random Forest	CAMPR3 Artificial Neural Network (ANN)	CAMPR3 Discriminant Analysis	Sense the Moment	Anti-Microbial Activity Predictor (AMAP)	Antimicrobial Peptide Scanner vr.2	IA4AMP: Identify Anti-microbial Peptides in IA	AMP Prediction AR Random Forest	AMP Prediction AR Support Vector Machine (SVM)	AMP Prediction AR Stochastic Gradient Boosting
Arlequinin-AN1	0.128	0.2755	NAMP	0.445	0.35	0.42	0.0911	0.013	0,208	0,000698133	0,006746
Arlequinin-AN2	0.128	0.2755	NAMP	0.445	0.35	0.42	0.0911	0.013	0,208	0,000698133	0,006746
Arlequinin-AN3	0.871	0.97	AMP	0.973	0.18	2.96	1.0	0.96	0,888	0,891659517	0,918628
Arlequinin-AN4	0.058	0.3285	NAMP	0.00	0.89	0.35	0.3204	0.025	0,478	0,481951491	0,514937
Arlequinin-AN5	0.002	0.37	NAMP	0.008	1.28	0.21	0.8628	0.71	0,5	0,480248245	0,284122
Arlequinin-AN6	0.011	0.297	NAMP	0.000	0.81	1.66	0.5307	0.073	0,68	0,950565224	0,849862
Arlequinin-AN7	0.317	0.64	AMP	0.745	0.16	0.76	0.0028	0.031	0,73	0,806081569	0,900172
Arlequinin-AN8	0.002	0.27	NAMP	0.002	0.34	-0.93	0.1266	0.052	0,598	0,667684385	0,729368

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022

Los resultados de las predicciones de actividad antimicrobiana de los ocho fragmentos de secuencias peptídicas se encuentran enmarcadas en la Tabla 10. Los valores cercanos a 1 son los que tienen mayor probabilidad a considerarse AMPs. Se utilizaron ocho de los modelos más usados y los desarrollados en los últimos años con mejoras estadísticas para corroborar que la probabilidad sea lo más cercana a la realidad posible. Siete de los ocho modelos predicen que el péptido Arlequinin-AN3 es un posible AMP. Los demás péptidos no muestran más del 50 % de probabilidad para ser AMPs.

La estructura 3D del péptido Arlequinin-AN3 fue modelada por I-TASSER (Figura 11). El péptido muestra una estructura no definida con conformación según SOPHMA de random coil, beta turn y extended strand. Por otro lado, los modelos tridimensionales fueron analizados por el diagrama de Ramachandran (herramienta disponible en BIOVA Discovery Studio). Los resultados demuestran que los residuos de los péptidos se encuentran en las regiones favorables o permitidas, indicando la alta confiabilidad estructural de los modelos.

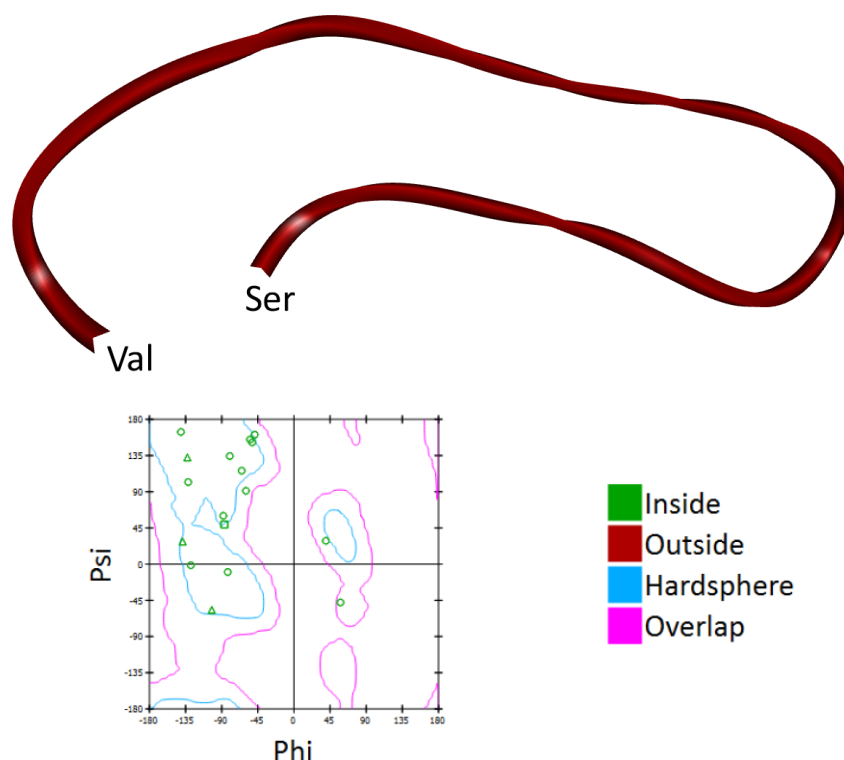


Figura 11. Modelos tridimensionales de Arlequinin-AN3 obtenidos mediante I-TASSER y gráfico de Ramachandran visualizado mediante BIOVA Discovery Studio. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

El estudio de acoplamiento molecular muestra que existe una interacción y una alta afinidad entre Arlequinin-AN3 y las membranas bacteriana y eucariota mimetizadas (Figura 12). El valor de docking del complejo péptido/membrana fue de -154.99 kcal/mol para la membrana bacteriana y -41.63 kcal/mol para la membrana eucariota.

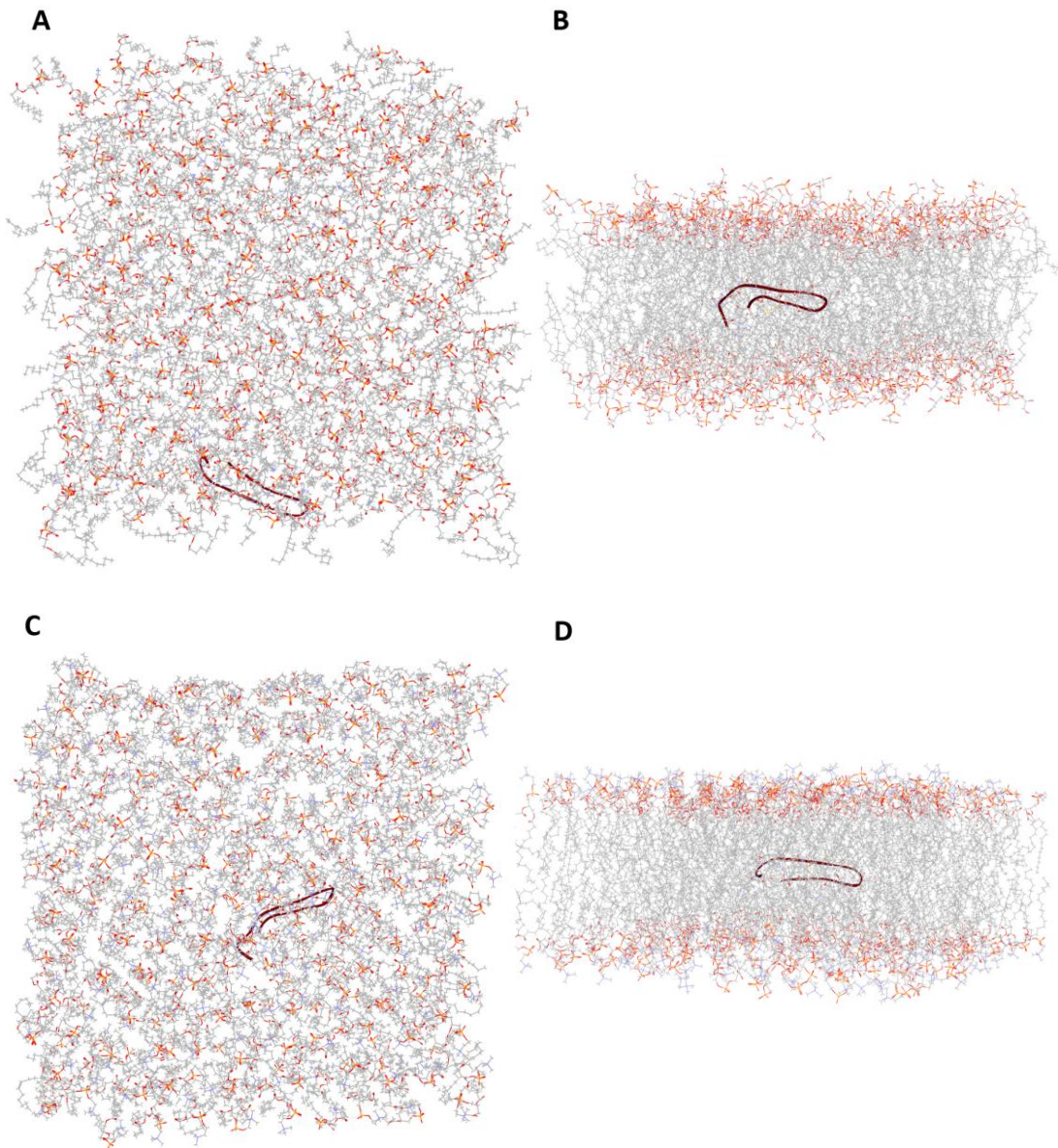


Figura 12. Interacciones de acoplamiento molecular entre Arlequinin-AN3 (color rojo oscuro) y la membrana bacteriana(A-B) y la membrana eucariota (C-D). A-C) vista superior del complejo péptido membrana y B-D) vista lateral. El valor de patchdock es de -154.99 kcal/mol para la membrana bacteriana y -41.63 kcal/mol para la membrana eucariota en atomic contact energies (ACE). **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fraccionamiento de la secreción cutánea de *Atelopus nanay*

La Figura 2 de la corrida cromatográfica muestra la presencia de 16 picos con las dos absorbancias en unidades de absorbancia altas. Esto demuestra que en la muestra se detectaron enlaces peptídicos y anillos aromáticos que están presentes en proteínas por lo que es un claro indicio de que estas fracciones tienen péptidos en su composición bioquímica. El fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) es una de las técnicas más importantes para la separación de proteínas y péptidos. Esta técnica ayuda a separar los compuestos presentes en toda la secreción por su naturaleza polar y por su alta compatibilidad con la espectrometría de masas. Esto debido a que reduce la supresión de iones en MS y mejora la detección de compuestos [68], por lo que la RP-HPLC es una herramienta indispensable en la investigación proteómica [69]. 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 con anillos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) [52]. La cuantificación de todos los péptidos presentes en un pool de muestras puede llevarse a cabo mediante la determinación de los enlaces peptídicos, ya que éstos están presentes en todos los péptidos. Específicamente, los electrones π del enlace peptídico están hasta cierto punto deslocalizados en tres átomos: el nitrógeno, el carbono y el oxígeno del péptido. A bajas longitudes de onda (180-220 nm), la transición π a π^* del enlace peptídico absorbe la luz [70]. Por otro lado, la cuantificación a 280 nm es un método ampliamente usado en péptidos de grandes longitudes debido a la presencia de triptófano o tirosina que tienen anillos aromáticos grandes, los cuales hacen fácil su detección [71].

4.2 Primer estudio antimicrobiano en la secreción cutánea de *Atelopus nanay*

En el cromatograma del fraccionamiento de la secreción cutánea se detectaron componentes a 214 y 280 nm con UA altas. Los doce picos a 214 nm y 280 nm coinciden con la actividad antimicrobiana exceptuando los 2 primeros picos sobrepuestos (0, 22), para las 28 fracciones con actividad antimicrobiana positiva. Cabe destacar que la mayoría de actividad antimicrobiana se concentra entre las fracciones 49 a 85. La actividad antimicrobiana varía entre selectivos para *E. coli* (49 y 62), *S. aureus* (53, 54

y 55), *C. albicans* (58, 69, 70, 72, 73, 74, 76, 77, 79, 82 y 152), amplio espectro (52 y 94), antibacteriana (49, 51, 53, 54, 55, 62 y 83) y contra la bacteria gramnegativa *E. coli* y la levadura *C. albicans* (57, 64, 65, 66, 67, 68, 80 y 84) (Tabla 3). Las cinco regiones con actividad antimicrobiana coinciden con la presencia de picos entre las fracciones 50 y 100 donde se concentra la mayor cantidad de picos. Esta información nos muestra que se detectan componentes en las fracciones con actividad antimicrobiana, dando un claro indicio de la presencia de posibles péptidos responsables de la inhibición de crecimiento de los tres microorganismos.

Una de las principales limitaciones a la hora de identificar la naturaleza de un compuesto es que los ensayos antimicrobianos no tienen esta capacidad. Es decir, no pueden detectar si la actividad fue específicamente por la presencia de AMPs. Además, se inyectó 100µL a 0,03mg/µL del pool de la secreción, es decir, las concentraciones de las moléculas presentes en las fracciones cromatográficas son bajas. Esta limitación es de particular relevancia en investigaciones que involucran especies muy pequeñas o especies en peligro de extinción debido a los pocos individuos disponibles para el estudio, como ocurre con *A. nanay*. Para contrarrestar esta limitante, se realizó una aproximación peptidómica por espectrometría de masas en tándem y clonaje molecular de secuencias precursoras de AMP a partir de la secreción cutánea. Por otro lado, al realizar la búsqueda en las bases de datos (APD3; CAMPR3) nos muestra que existen una gran cantidad de familias de péptidos que se han reportado, con capacidad antimicrobiana selectiva o no. Las cuales son familias de péptidos que también se han reportado en especies de la familia Bufonidae (Anexo 5).

4.3 MALDI-TOF MS de las fracciones con actividad antimicrobiana

La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) se introdujo como una estrategia de "ionización suave" para el análisis de grandes biomoléculas [72] y posteriormente se adaptó para una serie de analitos más pequeños, como los péptidos [73]. El MALDI TOF MS de las fracciones de RP-HPLC permitió identificar masas en el rango de 1000 a 3500 Da lo que permite asociar la actividad antimicrobiana de las fracciones a péptidos presentes en la secreción. En la comparación realizada entre los péptidos encontrados en la familia Bufonidae y los de las bases de datos (APD3; CAMPR3) se observa que existen varias familias de péptidos que corresponden tanto a los péptidos encontrados en otras especies de Bufónidos como con el rango de masas

encontradas en *Atelopus nanay* [74,75]. Esto para familias de péptidos antibacterianos y específicos contra *C. albicans*.

La pureza del analito (ausencia de compuestos interferentes), es un factor limitante para obtener una alta sensibilidad y resolución. Aunque se pueden analizar mezclas complejas de analitos mediante MALDI-TOF MS, los componentes altamente abundantes presentes en la matriz de la muestra pueden suprimir la ionización o influir en la respuesta de la lectura de los analitos de interés relativamente poco abundantes (supresión de la ionización) y dificultar su identificación [72]. Tal es el caso de los análisis en MALDI-TOF MS de las fracciones con actividad y la secreción cutánea. A pesar de que existen masas preponderantes en la mayoría de las fracciones y secreción cutánea, en algunas no se pueden observar las masas debido a los altos porcentajes de intensidad de la matriz causando mucho ruido en los espectros de masas (Anexo 2). Las matrices de MALDI-TOF MS comunes son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (LMW) y, por lo tanto, producirán una gran cantidad de picos de iones relacionados con la matriz, lo que limita el uso de MALDI-TOF MS para la detección de moléculas LMW, debido a la transferencia de la energía de los fotones a los analitos [76]. Sin embargo, la matriz CHCA es la matriz preferida para identificación de péptidos debido a su sensibilidad y uniformidad en la placa de MALDI-TOF MS [77]. A pesar de su capacidad, se conoce que esta matriz funciona mejor con digestiones proteicas [78], procedimiento que no se realizó en nuestras muestras debido a la baja cantidad disponible. Para mejorar la resolución en este tipo de muestras se suele aumentar materiales inorgánicos como nanopartículas de platino (NPs) [76], no obstante, estos reactivos no se encontraban disponibles, lo que podría ser la razón de que no se hayan podido identificar la mayoría de los iones padres (+1) en este tipo de espectrometría de masas. Asimismo, la baja concentración de los compuestos en las fracciones debido a la escasa cantidad de muestra hace que se complique aún más la lectura de los posibles péptidos. Sin embargo, la concentración no se pudo aumentar, ya que, la colección de especímenes es restringida debido a que la especie se encuentra en peligro crítico de extinción y solo existen unos pocos individuos en cautiverio, lo que comprometería su supervivencia. Por lo que no se realizaron más extracciones de secreción cutánea. A pesar de esto, se pudo identificar la presencia del ion con masa/carga 1439.90, el cual podría corresponder al ion padre +1 del péptido maduro Temporin-GH (número de acceso P84858) proveniente de *Rhinella diptycha*, la cual pertenece a una especie de la familia Bufonidae (Anexo 5). Por lo que, con los resultados anteriores y la comparación de las bases de datos con el rango de masa, este péptido podría

encontrarse en la fracción 68 (Figura 3) debido a que las Temporinas se han encontrado en una variedad de especies de la familia Bufonidae. Sin embargo, no se puede realizar una afirmación certera por la falta de datos y por la presencia de ruido en altas intensidades dentro de los espectros de masas. Este último problema es normalmente producto de una mala ionización, problemas con la matriz y ionización selectiva como se mencionó previamente.

4.4 Identificación de posibles péptidos mediante espectrometría de masas en tándem

4.4.1 Secreción cutánea

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una de las principales herramientas utilizadas en la identificación de proteínas. Esta técnica aprovecha el amplio y creciente número de proteínas almacenadas en las bases de datos (comparación con listas generadas a partir de la digestión "teórica" o de la fragmentación "teórica" de un péptido) [79]. La secreción cutánea y fracciones antimicrobianas no recibieron ningún tratamiento por digestión proteolítica, es decir se realizó un análisis top-down. Este método podría superar sustancialmente la deficiencia de supresión iónica para la proteómica cuantitativa y la desventaja del método de proteómica bottom-up [80–83]. Sin embargo, depende mucho de la sensibilidad del equipo utilizado. Hoy en día esta técnica apenas ha comenzado a madurar con la implementación de instrumentación avanzadas como la hibridación de los analizadores TOF con los analizadores de masas cuadrupolares (q-TOF), que pueden actuar como filtro de masas o célula de colisión [84], lo que los convierte en una opción asequible y robusta para el análisis descendente de proteínas. En este estudio se utilizó el equipo de espectrometría de masas q-TOF acoplado a cromatografía líquida de ultra alta definición (UPLC-QTOF/MS) modelo Xevo G2-XS Qtof/Tof (Waters) con detector multiplicador de electrones ultrarrápido y electrónica de detección ADC híbrida.

El primer método por el que se realizó la corrida de la secreción cutánea de *A. nanay* fue MS^e. La MS^e es un enfoque de adquisición de datos independiente (DIA). proporciona escaneos paralelos alternados para la adquisición, ya sea a baja energía de colisión para obtener información de iones precursores (MS) o a alta energía de colisión para obtener información precisa de fragmentos de masa, iones precursores y pérdida neutra, proporcionando información similar a la MS/MS convencional en una

sola corrida analítica [85]. Esta capacidad es de gran importancia, ya que ofrece la información estructural necesaria para la identificación de proteínas en los análisis no dirigidos [86]. Recientemente, la técnica UPLC-MS^e ha demostrado ser un enfoque analítico potente y fiable para el estudio de la proteómica descendente, especialmente este método podría superar sustancialmente la deficiencia de supresión iónica para la proteómica cuantitativa y la desventaja del método de proteómica ascendente [87,88]. DDA por su naturaleza semiestocástica en la selección de precursores en la espectrometría de masas en tándem, los péptidos con intensidades iónicas bajas tienen una probabilidad reducida de ser seleccionados para la fragmentación [53]. La proteómica cuantitativa es una tendencia más reciente que inició en el 2006 [89], consiste en la cuantificación absoluta sin etiquetas, en la que las concentraciones absolutas de todas las proteínas medidas en una muestra se estiman a partir de recuentos de iones resumidos [90]. En comparación a los métodos DDA, MS^e tiene un ciclo de trabajo cercano al 100%. Los análisis con este método radican en el ancho de las ventanas precursoras en la primera etapa del aislamiento de iones. Esto determina la gama de iones que se transmiten, fragmentan y secuencian [91]. Por lo que, al tener una amplia ventana de aislamiento de precursores, produce una estructura de datos muy compleja y requiere un procesamiento de datos coherente e intrincado [85]. Por lo que el método está limitado por el software de procesamiento posterior para correlacionar con precisión los fragmentos con los precursores [85]. El programa Mascot Distiller procesa todos los espectros, el cual es de los mejores programas en proteómica funcional en la actualidad [92].

El análisis del cromatograma de la secreción cutánea de *A. nanay* con MS^e dio como resultado cuatro secuencias peptídicas similares. Los péptidos fueron: Temporin-1BYa, Bas-ah, Ranatuerin-2Ra y Riparin-1.3 (Figura 4). Estos péptidos han sido reportados previamente en otras especies de la familia Bufonidae específicamente Bas-ah y Ranatuerin-2Ra se encontraron en *Bufo gargarizans* y *Rhinella diptycha* respectivamente. Los puntajes de los iones fragmento (*b* y *y*) de estos péptidos están en un rango de 1.8 a 13.1. Los puntajes se miden en los iones *b* y *y*, debido a que representan las dos mitades formadas al dividir el péptido original y son iones con enlaces vulnerables por su posición en los extremos hace falta solo una baja energía de colisión para fragmentarlos. Mascot Distiller refleja la probabilidad de que la coincidencia entre las masas moleculares observadas y la entrada de la base de datos sea un evento aleatorio fundamentado en el nivel de significación seleccionado (de forma predeterminada, 1). El resultado de identificación de una proteína es estadísticamente

significativo si su puntuación está por encima del umbral, es decir debe ser mayor a 60 por lo que ninguna de los péptidos con coincidencia en nuestro espectro de masa puede ser considerada como una identificación [93]. Este problema puede ser producto de la poca cantidad de muestra que se utilizó para los análisis, sin embargo, al encontrarse la especie en peligro crítico de extinción no se logró coleccionar más muestra para los ensayos. Además, también puede ser producto de la degradación de las proteínas por pasar 2 años almacenadas a 4°C producto de la pandemia de COVID-19. A pesar de esto, los resultados nos dan un indicio de que péptidos similares que pueden encontrarse en la secreción de *A. nanay*, considerando además que los péptidos similares fueron previamente encontrados en anfibios, especialmente en Bufonidos.

En el cromatograma de UPLC-MS/MS de la secreción cutánea (Figura 4) se puede observar que existe mayor cantidad de péptidos similares en el rango de minutos 15-18 correspondiente a el rango de minutos de 140-160 del cromatograma de RP-HPLC (Figura 2). Esto nos indica que estos péptidos podrían encontrarse dentro de esas fracciones. Específicamente el péptido Temporin-1BYa (número de acceso AFS51647) proveniente de *Rana boylei* tiene el mayor puntaje entre todas con las coincidencias, a pesar de que no es un valor lo suficientemente cercano a 60 para considerarse una identificación, previamente se encontró mediante MALDI-TOF MS iones fragmento similares al ion padre con carga (+1) de péptido Temporin-GH perteneciente a la misma familia de péptidos, lo que plantea la posible presencia de esta familia de péptidos en la secreción de *A. nanay*.

El segundo método utilizado es el de adquisición dependiendo de datos (DDA). Una desventaja del método MS^e es que no es un reemplazo de DDA y está limitado por la medida en que se logra la asignación correcta de iones de fragmentos a precursores [94]. La identidad de los péptidos puede requerir una validación adicional con DDA dirigida [85]. DDA es uno de los análisis más utilizados en la proteómica ascendente con el enfoque basado en el descubrimiento (o *shotgun proteomics*) [95]. Aquí, un espectrómetro de masas híbrido primero realiza una corrida de exploración, a partir de la cual los iones peptídicos con una intensidad superior a un valor de umbral predefinido se seleccionan, aíslan y secuencian estocásticamente mediante exploración de iones producto. Al seleccionar los iones precursores, existe una preferencia hacia los iones que tienen la mayor intensidad. Para evitar la adquisición redundante de los péptidos más abundantes [85].

En la última década, la mayoría de los estudios proteómicos basados en MS se llevaron a cabo utilizando *shotgun proteomics*. Sin embargo, ahora es evidente que DDA tiene una serie de limitaciones, incluida la velocidad de exploración instrumental [96], la selección estocástica de iones para la fragmentación, la mala repetibilidad [97], un rango dinámico relativamente estrecho [98] y los problemas de quimericidad (co-fragmentación de dos o más iones) [99,100]. Debido a la naturaleza sesgada de DDA para las especies con moléculas más abundantes, es poco probable que se secuencien péptidos de baja abundancia en una muestra biológica compleja. Del mismo modo, es posible que las especies isobáricas muy eluidas no se secuencien [101].

En el cromatograma de UPLC-MS/MS de la secreción con el método DDA se obtuvo una coincidencia con un péptido similar a Rubellidin-4.2/4.3 (número de acceso P82075) proveniente de *Litoria rubella* con la base de datos DADP con el ion padre con carga (+2). El score es de 7.1 por lo que, tampoco puede ser considerada una identificación, pero puede significar la presencia de un péptido similar en la secreción. El problema por el cual no se pudo realizar una identificación con este método puede deberse también a la concentración de los péptidos en las fracciones por la cantidad de muestra inyectada debido al cambio en la detectabilidad y el tiempo que pasaron almacenadas. Los péptidos se degradan fácilmente debido a la acción de las proteasas [102] o espontáneamente dependiendo de sus características fisicoquímicas [103]. La degradación se puede comprobar observando las incisiones en las secuencias péptidas con coincidencias, en los cuales las identificaciones de iones *b* y *y* no se realizaron en ninguno de los residuos N-terminales como sucede cuando existen degradaciones peptídicas [104]. Cabe destacar que no se le puede sustituir a DDA, para métodos proteómicos cuantitativos dado que todos los iones se fragmentan simultáneamente, los datos producidos son muy complicados. DDA y MS^e (DIA) son técnicas complementarias usadas en la proteómica para expandir su rendimiento para la identificación de péptidos, debido a que generalmente requiere la creación de bibliotecas espectrales utilizando los datos DDA y/o DIA correspondientes de las mismas muestras o utilizando bibliotecas espectrales disponibles públicamente prediseñadas [105].

4.4.2 Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana

Los resultados de MS/MS incrementaron notablemente en las fracciones antimicrobianas (47 coincidencias totales). Esto nos indica que efectivamente la RP-

HPLC ayuda a la detección de compuestos y reduce la supresión de iones para la identificación de péptidos en la proteómica [106]. Las fracciones antimicrobianas se inyectaron directamente en el UPLC-MS/MS después de comprobarse su capacidad antimicrobiana. Las fracciones se analizaron por MS^e y DDA. En MS^e se encontraron 43 coincidencias, lo que refleja claramente que el método mejora radicalmente al analizar fracciones de RP-HPLC que una muestra cruda (Tabla 6). El mayor número de coincidencias (23) se realizaron con la base de datos DADP. Lo que sugiere que realizar la búsqueda en una base de datos específica nos ayuda a obtener más resultados que con una base de datos amplia como la de SwissProt [107]. Esta versatilidad de herramientas del programa Mascot Distiller lo convierte en uno de los mejores programas para análisis de espectros de masas [92]. Todas las identificaciones de los péptidos se dieron con el ion padre (+1), por la programación del método.

El rango de masas de las 43 coincidencias peptídicas varía entre 793.45 a 2899.66 Da, las cuales son masas también encontradas por MALDI-TOF MS. El péptido que obtuvo más coincidencias fue Tryptophyllin-T1 (número de acceso Q0VKG8) encontrado en las fracciones 53, 55, 70, 71 y 73 proveniente de *Pithecopus azureus*, sin embargo, su score más alto fue de 12, encontrado en la fracción 73. Por lo que este resultado no se puede considerar como una identificación. Al igual que Tryptophyllin-T1 se encontraron más péptidos presentes en varias fracciones con actividad con score mayor a 10 como: Tryptophyllin (Tryptophyllin-1, Tryptophyllin-like peptide PbT-1), Litorin (Rhodei-litorin), Dermorphin (Dermorphin), Venom peptide, Bradykinin (Bradykinin-like peptide AR-10), Dynastin (Dynastin-2), Odorranain (Odorranain-V-RA2), Rubellidin (Rubellidin-4.1), Caeridin (Caeridin-1.4) y Temporin (Temporin-1SPb) (Ver Anexo 3 y 4). Todos estos péptidos se han reportado previamente en anfibios, por lo que a pesar de no ser una identificación nos da indicios de las posibles familias de péptidos y por tanto de estructuras primarias de los posibles péptidos con actividad antimicrobiana existentes en la secreción de *A. nanay*. Además, se encontraron ocho péptidos más de la familia Temporin (2 correspondientes a 1DYa, 1 a 1SPb, 1 a CDYb, 1 a ECa, 1 a K, 1 a OM2 y 1 a SN3) en las fracciones 52, 53, 66, 67,71, 83, 94. A pesar de que no son las mismas temporinas encontradas por MALDI-TOF MS (Temporin-GH) y espectrometría de masas en tándem de la secreción (Temporin-1BYa), se observa que existe una amplia variedad de esta familia de péptidos en *A. nanay*.

El péptido con el mayor score (33) fue Periviscerokinin-2 (Figura 6) identificado en *Mastotermes darwiniensis* denominada comúnmente como la termita gigante del norte

de Australia. Al encontrarse alejado taxonómica y filogenéticamente de los anfibios, es difícil suponer que se puede tratar de este péptido. No obstante, puede tratarse de un péptido con estructura primaria similar secretada por *A. nanay*, aunque no se le puede denominar una identificación. Estos resultados nos ayudan a comprender que existen péptidos similares a los mencionados en las fracciones que tienen actividad antimicrobiana contra los tres organismos modelo, por lo que nos ayuda a discernir que dicha actividad se debe a la presencia de péptidos en la secreción cutánea de *A. nanay*.

Las fracciones antimicrobianas analizadas con DDA, se dividieron en dos. Para el método DDA-1 se analizaron las fracciones 51, 52, 54, 57, 58, 64, 65, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 94 y 152 y para el método DDA-2 se analizaron las fracciones 53, 55, 62, 67, 69, 79, 82, 83 y 84. Al realizar la búsqueda con el primer método, el programa Mascot no arrojó resultados de score con los iones fragmento *b* y *y*, no obstante, en el análisis de espectros de masa, en la fracción 152 se encontraron los iones padres o precursores +2, +3 y +4 (Figura 7) del péptido Odorrainin-A-OA12 conocido también como Andersonin-U peptide (número de acceso ADP06200) proveniente de *Odorrana yunnanensis*. Al no lograrse ninguna identificación se procedió hacer una repetición técnica del método con las fracciones restantes.

Los análisis con el método DDA-2 arrojaron tres coincidencias en las fracciones 55, 79 y 84. Los péptidos encontrados fueron Dynastin-1 y Rubellidin-4.1, los cuales se encontraron con la base de datos de SwissProt con un score de 11, 16 y 37 respectivamente, a pesar de que no se puede denominar una identificación. El péptido Rubellidin-4.1 (número de acceso P82074) proveniente de *Litoria rubella* también se encontró por el método MS^e en la fracción 84. Al encontrar el mismo péptido reportado en un anfibio en la misma fracción por dos métodos nos da una evidencia más clara de que el péptido se encuentra efectivamente en dicha fracción. Sin embargo, al tener un score tan bajo hace falta más resultados y análisis para poder afirmar que es efectivamente ese péptido, ya que puede ser otro péptido con estructura similar pero propio de *A. nanay*.

4.5 Identificación de posibles péptidos mediante clonaje molecular

Las secuencias nucleotídicas y peptídicas encontradas se analizaron con la herramienta del NCBI, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Esta herramienta es un enfoque heurístico para calcular la similitud de las secuencias biológicas de ADN (Blast/n) y

proteínas (Blast/p) usando el algoritmo de Smith Waterman. Para que una secuencia sea considerada como una identificación, algunos autores difieren en las características necesarias, pero han llegado a la conclusión de que una secuencia analizada es efectivamente idéntica con las secuencias de coincidencia, si el valor E (esto indica la probabilidad de que el resultado de la búsqueda se haya producido por azar) es lo más cercano a 0 con valores mínimos inferiores a 10^{-6} , el porcentaje de identidad y query cover lo más cercano a 100% [108].

Los resultados obtenidos en el Blast/n muestran que solo la secuencia número 40 con el primer 5' Random obtuvo resultados. A pesar de tener un porcentaje de identidad del 100% con un 5% de query cover y $5e-05$ de valor E con una preprodermaseptina (579pb) denominada *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* mRNA for preprodermaseptin H3(dpp-H3 gene) (número de acceso AM269412), proveniente de *Pithecopus azureus* perteneciente a la familia Phyllomedusidae, enmarcada dentro de la super familia Hyloidea. No cumple con los valores de los tres parámetros para considerar una identificación. Debido a que el valor E no es lo suficientemente pequeño para considerar que no se trata de un alineamiento al azar y que los nucleótidos no tienen más del 5% de cobertura entre secuencias. En el árbol filogenético realizado por Darst y Cannatella en 2004 [109] el cual consiste en un Árbol de parsimonia de varios grupos de Hyloidea y grupos externos basado en el análisis de los fragmentos 12S y 16S de las secuencias del gen del ARNr mitocondrial con una posterior comparación de estructuras secundarias y alineación de las secuencias utilizando Clustal X [110]. Se puede observar que la familia Phyllomedusidae y Bufonidae se encuentran dentro de la misma superfamilia, sin embargo, estos se encuentran muy separados en la línea evolutiva. Por otro lado, en el árbol filogenético realizado por Alexander Pyron, R., & Wiens, J. J. en el 2011 [111], el cual consiste en una representación esquelética de 2871 especies a partir del análisis de máxima verosimilitud, con puntas que representan familias y subfamilias basadas su revisión taxonómica. Los números en los nodos son proporciones de BS superiores al 50%. Las familias Phyllomedusidae y Bufonidae son organismos homólogos parálogos, lo que nos sugiere que se puede tratar de un péptido similar con funciones distintas. Este análisis nos ayuda a comparar la similitud entre familias tanto genéticamente como taxonómicamente. En la comparación taxonómica observamos que pueden tener una evolución convergente debido a la similitud entre clados, sin embargo, las funciones pueden variar. En la comparación por genes 12S y 16S mitocondriales se observa una gran separación evolutiva, por lo que estos resultados solo son un acercamiento a las posibles similitudes evolutivas entre las dos

familias. Al analizar las especies de los resultados de espectrometría de masas en tándem de las fracciones con el método MS^e se observa que 11 de los péptidos (Tryptophyllin-T1 fracciones 53, 55, 70, 71, 73, Tryptophyllin-like peptide PbT-1, Dermorphin, [Val1, Hyp2, Thr6]-bradykinyl-Gln,Ser, Bradykinin-related peptide Pnor-7, Probradykinin-2) fueron reportados en especies de la familia Phyllomedusidae. Lo que nos da más evidencia de una posible evolución convergente entre los péptidos secretados por estas dos familias de ranas.

Los resultados obtenidos en el Blast/p de las 18 secuencias (Tabla 8) muestran que todas las secuencias tienen el valor E muy elevado para poder hacer una identificación, al tratarse de una muestra de un anfibio que no ha sido estudiado previamente y no tiene ningún registro en la base de datos, estos resultados podrían indicar que existe una similitud significativa con los péptidos descritos en la Tabla 8, ya que no existen referencias de péptidos descritos en *Atelopus*, menos aún en *A. nanay*. En el alineamiento de las 18 secuencias con los péptidos más similares (Tabla 9), se puede observar que existen zonas conservadas entre el péptido de la secreción de *A. nanay* y las de la base de datos del NCBI. En cuanto al análisis filogenético de las especies donde se encontraron los péptidos con coincidencias corresponden a las familias: Pipidae (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis* y *Hymenachirus boettgeri*), Ranidae (*Rana temporaria*, *Odorrana yunnanensis*, *Odorrana graham*), Eleutherodactylidae (*Eleutherodactylus coqui*), Leptodactylidae (*Engystomops pustulosus*) y Dendrobatidae (*Ranitomeya imitator*). El análisis con el árbol filogenético de Darst, C. R., & Cannatella, D. C. (2004) nos indica que las familias Leptodactylidae, Dendrobatidae y Eleutherodactylidae se encuentra dentro de la misma superfamilia Hyloidea, sin embargo, todas estas se encuentran alejadas de la familia Bufonidae siendo Leptodactylidae la más cercana. La familia Ranidae se encuentra dentro de la super familia Ranoidea y la familia Pipidae se encuentra dentro de la superfamilia Pipoidea siendo la más alejada. En el análisis del árbol filogenético de Alexander Pyron, R., & Wiens, J. J. (2011). Las familias Leptodactylidae, Dendrobatidae y Eleutherodactylidae se encuentra dentro de la misma superfamilia Hyloidea pero en esta ocasión la familia Dendrobatidae y Bufonidae son organismos homólogos ortólogos, es decir tienen el mismo ancestro común y sus péptidos pueden tener la misma función. La segunda familia más cercana es Leptodactylidae en el que se observa tienen el mismo ancestro común dos nodos atrás y la familia Eleutherodactylidae se encuentra bastante alejada. De la misma manera la familia Ranidae se encuentra dentro de la super familia Ranoidea

y la familia Pipidae se encuentra dentro de la superfamilia Pipoidea siendo la más alejada.

Un resultado de particular importancia obtenido es la similitud con el péptido Brevinin-1E-OG6 (número de acceso ABG76229.1) con reporte de potencial antimicrobiano (MIC de 9.37 para *E. coli* y *C. albicans* y 4.68 para *S. aureus*) [112] encontrado en la secuencia número ocho proveniente de *Odorrana grahami*, aunque por el valor E no se considera una identificación, la similitud entre las secuencias peptídicas nos da más indicios de que la secreción cutánea de *A. nanay* puede presentar péptidos con actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se encontró en ocho secuencias diferentes (4, 6, 9, 10, 11, 14, 17 y 18) con los primers Temporin-1Tb y 5'Random (Tabla 8) similitudes con los péptidos Andersonin-M2, M3 y M1 peptide (número de acceso ADP06184.1, ADP06185.1, ADP06181.1 respectivamente) provenientes de *Odorrana yunnanensis*. La actividad antimicrobiana de estos péptidos no se ha evaluado aún [113]. Sin embargo, cabe destacar que las especies *Odorrana grahami* y *Odorrana yunnanensis* donde se encontraron los péptidos, pertenecen a la misma familia Ranidae. Asimismo, el péptido Odorranain-A-OA12 (número de acceso E3SZR5) donde se encontró los iones padres por espectrometría de masa en tándem de la fracción 152 con el método DDA-2 y y los péptidos Andersonin-K1 (número de acceso SP_2835) Odorranain-V-RA2 (número de acceso E3SZJ5) y Andersonin-P (número de acceso E3SZQ8), encontrados en las fracciones 51, 83 y 94, respectivamente con el método MS^e, provienen de igual manera de *Odorrana yunnanensis*. A pesar de que los análisis en los árboles filogenéticos tanto de Darst, C. R., & Cannatella, D. C. (2004) como de Alexander Pyron, R., & Wiens, J. J. (2011) enmarcan que la familia Ranidae está muy alejada de la familia Bufonidae en términos genéticos y taxonómicos, los resultados indican que es posible que existan sitios conservados en los péptidos de estas familias de anfibios resultado de una evolución convergente como se han reportado en otras familias de péptidos de anfibios [50]. Es interesante destacar que la asociación de especies se da con organismos distribuidos en el continente asiático (*Odorrana*). Se debe considerar que algunas de las especies de la familia Bufonidae como *Bufo gargarizans* son especies originalmente asiáticas. Esta relación se conserva con la toxina tetrodotoxina, una tóxica encontrada por primera vez en el pez globo en Japón. En la que *Atelopus* es la única clase de vertebrados donde se encuentran múltiples análogos de esta molécula [114]. Esta relación también puede ser efecto de la escasa información de péptidos de *Atelopus* y Bufonidae en la base de datos de NCBI. Sin embargo, se necesitan más resultados para poder realizar esta afirmación.

Por otro lado, al cambiar el parámetro de búsqueda organismo en el Blast/p de “Amphibian” a “*Odorrana*” los valores e, ahora son iguales y menores a 10^{-6} . A pesar de cometer un error al cambiar este parámetro ya que nuestras secuencias pertenecen al género *Atelopus* y no *Odorrana*, este resultado nos ayuda a tener más indicios para indicar una identificación. Adicionalmente, al analizar los sitios conservados de las secuencias 4, 6, 9, 10, 11, 14, 17 y 18 (Tabla 9) con las tres mejores coincidencias se encuentra el sitio conservado IKQWYQRRV.

La longitud de las secuencias 3 y 7 es mayor a 15 aa, mientras que de los otros seis péptidos es menor a 10 aa. En el marco de lectura abierto de las secuencias (Figura 10), no existe una región de péptido señal, en su lugar se encuentra la secuencia cortada, ya que no existe un codón de inicio. Siendo un problema común en el clonaje molecular [115]. La solución sería realizar primers específicos para la zona de inicio de la secuencia y amplificarla con las estrategias 5'-3', para que se pueda secuenciar el péptido señal de nuestras secuencias.

En el alineamiento (Figura 9) realizado con la secuencia completa de los péptidos Andersonin-M y las secuencias clonadas, se puede observar que nuestras secuencias se alinean en la región acídica (IKQWYQ), el sitio de corte de enzima (RR) y el primer aminoácido (V) de inicio del péptido maduro. No obstante, la región del péptido maduro es completamente diferente por lo que se procedió a realizar las propiedades fisicoquímicas del péptido maduro de todas las secuencias (Tabla 10).

Las propiedades fisicoquímicas, estructura y longitud de los péptidos antimicrobianos de anfibios son muy variadas tanto en especies cercanas como distantes [116]. Sin embargo, hay características que son de mayor importancia para determinar la actividad antimicrobiana en péptidos como: carga catiónica, anfipaticidad (partes hidrofílicas e hidrofóbicas) y conformación α -hélice en su estructura secundaria [117]. El poseer una carga catiónica suele ser una de las principales características para determinar a un péptido como antimicrobiano, ya que el poseer cargas en un rango de +2 a +9 les da la característica de poder interactuar con las membranas bacterianas cargadas negativamente a través de interacciones electrostáticas y experimentan adsorción en la membrana y cambios conformacionales. Dependiendo del mecanismo de acción del péptido las células morirán por apoptosis o necrosis [118].

Se denominó a las secuencias encontradas como Arlequinin-AN, debido a que se le conoce comúnmente a *Atelopus nanay* como Arlequín triste, agregando las iniciales del anfibio (AN). Además, debido a que ninguna de las secuencias encontradas tiene una secuencia similar completa con ningún péptido reportado hasta el momento. Las cargas catiónicas de las secuencias están en un rango de 0 a +7, teniendo carga 0 Arlequinin-AN5 y carga +1 Arlequinin-AN8 descartando su posible actividad antimicrobiana. Todos los demás péptidos tienen carga catiónica de +2 a +7 por lo que podrían tener actividad antimicrobiana contra bacterias Grampositivas, Gramnegativas y hongos, esta característica nos hace suponer que la razón por la que 28 de las fracciones de la secreción de *A. nanay* tienen potencial antimicrobiano contra tres microorganismos modelo de estas categorías. La capacidad de actuar contra los tres microorganismos se debe a los grupos lipídicos cargados negativamente en las membranas de muchos microorganismos como fosfatidilglicerol y cardiolipina. Específicamente los ácidos tetoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas [119]. En cuanto a las levaduras, estas también poseen una membrana con carga negativa compuesta principalmente por fosfatidilinositol y el ácido fosfático [120]. Por otra parte, la anfipaticidad es otra característica importante, ya que 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 [118]. En el caso de las secuencias encontradas sólo las secuencias peptídicas Arlequinin-AN3 y Arlequinin-AN5 tienen hidrofobicidad mayor a 0.5, lo que les da la característica de péptidos anfipáticos. Adicionalmente, la predicción de la estructura secundaria de las secuencias demuestra la tendencia hidrofóbica por la presencia de aminoácidos alifáticos con residuos hidrófobos como: valina (V), isoleucina (I), leucina (L) y fenilalanina (F). Cabe destacar que estos aminoácidos además de ser hidrófobos son no polares, lo que podría explicar que la mayoría de los péptidos eluyeron antes del minuto 100 en la cromatografía por RP-HPLC. Finalmente, la conformación α -hélice a pesar de ser una de las características importantes en cuanto actividad, De Almeida y colaboradores [121] han comprobado que no es precisamente una característica indispensable, ya que se ha reportado varios péptidos con actividad antimicrobiana con random coil y otros autores han confirmado se existen péptidos con capacidad antimicrobiana teniendo estructura de beta turn y extended strand [122]. En el caso específico de nuestras secuencias, ninguna tiene conformación α -hélice, sin embargo, las ocho secuencias tienen random coil en la conformación de su estructura secundaria. Además, Arlequinin-AN3 y Arlequinin-AN7 tienen conformaciones beta turn y extended strand.

Posteriormente, se analizaron todas las secuencias con modelos de predicción de actividad antimicrobiana, los cuales tienen algoritmos de funcionamiento diferentes, sin embargo, 10 de los 11 modelos predicen que la secuencia Arlequinin-AN3 tiene potencial de ser un péptido con actividad antimicrobiana. Al analizar su estructura 3D se observa una predeterminación por una random coil, con un diagrama de Ramachandran dentro de los límites favorables, lo que nos indica un buen modelamiento. Por lo que se procedió a realizar una simulación de la interacción del péptido con una membrana bacteriana y una membrana de eucariota. La simulación nos demuestra que el péptido interacciona con ambas membranas con un valor negativo de energía de unión lo que revela la gran afinidad.

En los ensayos de actividad antimicrobiana la mayor actividad de las fracciones fue contra la levadura *C. albicans*. Los péptidos con actividad antifúngica producidos por organismos multicelulares son generalmente grandes y la mayoría tienen estructuras lineales anfipáticas e hidrofóbicas. Muchos de estos AMPs y AFPs muestran una potente actividad lítica y de membrana que también se traduce en su amplio espectro antimicrobiano, incluyendo la actividad antifúngica, pero algunos péptidos también muestran actividad hemolítica/tóxica [120]. Todas estas características sugieren que el péptido Arlequinin-AN3 puede tener esta actividad antimicrobiana, por lo que sería necesario realizar la síntesis del péptido y realizar ensayos de actividad antimicrobiana y hemolítica para comprobar la información.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente estudio demuestra que la secreción cutánea de *A. nanay* tiene potencial capacidad antimicrobiana, posiblemente por la presencia de un pool de componentes. Los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento, los ensayos antimicrobianos y la espectrometría de masas en tándem, revelan la identificación de fragmentos peptídicos. A pesar de que ningún péptido encontrado tenga las características suficientes para la identificación, si se conoce que algunos de ellos tienen actividad antimicrobiana y pertenecen a familias de péptidos reportados previamente en Bufonidae como las temporinas, andersoninas y tryptophyllin, en especies con familias relacionadas a los Bufónidos. Además, los resultados obtenidos del clonaje molecular nos revelan Arlequinin-AN3 como un posible AMP, por las predicciones realizadas con modelos 90% confiables y por sus características fisicoquímicas. Adicionalmente al analizar la mayor capacidad de las fracciones con actividad y las características del péptido Arlequinin-AN3 nos revelan la posible capacidad antifúngica y por tanto de amplio espectro de este péptido. El potencial de la biodiversidad biológica se incrementa aún más cuando 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. Además, se recomienda realizar primers específicos para encontrar la secuencia completa de las ocho secuencias encontradas por clonaje molecular y realizar la síntesis del péptido Arlequinin-AN3 para analizar su concentración mínima inhibitoria (MIC) y capacidad hemolítica/citotóxica del mismo. Adicionalmente, se recomienda hacer un análisis de los componentes no proteicos de la secreción de *A. nanay* como alcaloides, esteroides y aminas no consideradas en esta tesis. Los resultados demuestran el potencial biomédico que poseen los recursos genéticos de especies que no se han estudiado hasta la actualidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 2013, Vol 6, Pages 1543-1575. 2013;6: 1543–1575. doi:10.3390/PH6121543
2. Auvynet C, el Amri C, Lacombe C, Bruston F, Bourdais J, Nicolas P, et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9. *FEBS J.* 2008;275: 4134–4151. doi:10.1111/J.1742-4658.2008.06554.X
3. Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides (NY).* 2008;29: 2074–2082. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2008.06.017
4. 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
5. da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, Lima LA, Sampaio KBO, Dohms SSM, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today.* 2017;22: 234–248. doi:10.1016/J.DRUDIS.2016.10.017
6. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* 2016, Vol 9, Page 59. 2016;9: 59. doi:10.3390/PH9030059
7. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30: 313–322. doi:10.1016/J.IDC.2016.02.001
8. Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (NY).* 2003;24: 1681–1691. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2003.08.023
9. 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
10. Patocka J, Nepovimova E, Klimova B, Wu Q, Kuca K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem.* 2018;26: 5924–5946. doi:10.2174/0929867325666180713125314
11. Pukala TL, Bowie JH, Maselli VM, Musgrave IF, Tyler MJ. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat Prod Rep.* 2006;23: 368–393. doi:10.1039/B512118N
12. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002;66: 236–248. doi:10.1002/BIP.10260
13. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1999;1462: 11–28. doi:10.1016/S0005-2736(99)00198-4
14. Patocka J, Nepovimova E, Klimova B, Wu Q, Kuca K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem.* 2019;26: 5924–5946. doi:10.2174/0929867325666180713125314
15. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2016;1858: 936–946. doi:10.1016/J.BBAMEM.2015.11.004
16. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011;29: 464–472. doi:10.1016/J.TIBTECH.2011.05.001
17. Sharma S, Sahoo N, Bhunia A. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes.
18. VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, et al. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin Potently Inhibit Human Immunodeficiency Virus

- Infection and Transfer of Virus from Dendritic Cells to T Cells. *J Virol.* 2005;79: 11598. doi:10.1128/JVI.79.18.11598-11606.2005
19. 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
 20. Ladram A, Nicolas P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2016;21: 1341–1371. doi:10.2741/4461
 21. Bhattacharjee P, Giri B, Gomes A. Apoptogenic activity and toxicity studies of a cytotoxic protein (BMP1) from the aqueous extract of common Indian toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin. *Toxicon.* 2011;57: 225–236. doi:10.1016/J.TOXICON.2010.11.015
 22. Sun T, Zhan B, Gao Y. A novel cathelicidin from *Bufo bufo gargarizans* Cantor showed specific activity to its habitat bacteria. *Gene.* 2015;571: 172–177. doi:10.1016/J.GENE.2015.06.034
 23. Huo Y, Xv R, Ma H, Zhou J, Xi X, Wu Q, et al. Identification of. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;157: 156–164. doi:10.1016/J.JPBA.2018.05.027
 24. Shibaoy PYT, Cologna CT, Morandi-Filho R, Wiesel GA, Fujimura PT, Ueira-Vieira C, et al. Deep sequencing analysis of toad *Rhinella schneideri* skin glands and partial biochemical characterization of its cutaneous secretion. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018;24. doi:10.1186/S40409-018-0173-8
 25. Dailami M, Made Artika I, Kusri MD. Analysis and Prediction of Some Histone-derived Antimicrobial Peptides from Toads *Duttaphrynus melanostictus* and *Phrynosoma asper*. *J Pure App Chem Res.* 2016;5: 67–76. doi:10.21776/ub.jpacr.2016.005.02.231
 26. Rodríguez C, Rollins-Smith L, Ibáñez R, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *J Ethnopharmacol.* 2017;198: 235–254. doi:10.1016/J.JEP.2016.12.021
 27. HERRERA-ALVA V, DÍAZ V, CASTILLO E, RODOLFO C, CATENAZZI A. A new species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from southern Peru. *Zootaxa.* 2020;4853: 404–420. doi:10.11646/ZOOTAXA.4853.3.4
 28. Mebs D, Schmidt K. Occurrence of tetrodotoxin in the frog *Atelopus oxyrhynchus*. *Toxicon.* 1989;27: 819–822. doi:10.1016/0041-0101(89)90049-4
 29. Yotsu-Yamashita M, Mebs D, Yasumoto T. Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhynchus* (family: Bufonidae). *Toxicon.* 1992;30: 1489–1492. doi:10.1016/0041-0101(92)90526-B
 30. Daly JW, Gusovsky F, Myers CW, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T. First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*), with further reports for the bufonid genus *Atelopus*. *Toxicon.* 1994;32: 279–285. doi:10.1016/0041-0101(94)90081-7
 31. Mebs D, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T, Lötters S, Schlüter A. Further report of the occurrence of tetrodotoxin in *Atelopus* species (family: Bufonidae). *Toxicon.* 1995;33: 246–249. doi:10.1016/0041-0101(94)00149-3
 32. Yotsu-Yamashita M, Tateki E. First report on toxins in the Panamanian toads *Atelopus limosus*, *A. glyphus* and *A. certus*. *Toxicon.* 2010;55: 153–156. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.003
 33. Abel J, Macht D. Two crystalline pharmacological agents obtained from the tropical toad. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 3. 1912; 319–377.
 34. Chen KK, Chen AL. A STUDY OF THE POISONOUS SECRETIONS OF FIVE NORTH AMERICAN SPECIES OF TOADS.
 35. Rash LD, Morales RAV, Vink S, Alewood PF. De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). *Toxicon.* 2011;57: 208–216. doi:10.1016/j.toxicon.2010.11.012
 36. Medina E, Pieper DH. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;398: 3–33. doi:10.1007/82_2016_492

37. World Health Organization. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. 29 Apr 2019 [cited 17 Jul 2022]. Available: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
38. Nelson RE, Hyun D, Jezek A, Samore MH. Mortality, Length of Stay, and Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Elderly Hospitalized Patients in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2022;74: 1070–1080. doi:10.1093/CID/CIAB696
39. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
40. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018. 2018 [cited 20 Feb 2021]. Available: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
41. Ministerio de salud publica Ecuatoriana. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. 2019. Available: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
42. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46 Suppl 5. doi:10.1086/533593
43. Lupetti A, Danesi R, van't Wout JW, van Dissel JT, Senesi S, Nibbering PH. Antimicrobial peptides: Therapeutic potential for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11: 309–318. doi:10.1517/13543784.11.2.309
44. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*. *Pharmacol Rev*; 2003. pp. 27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2
45. Conlon JM. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2011. pp. 201–212. doi:10.1007/s00441-010-1014-4
46. Marcillo-Lara A, Coloma LA, Álvarez-Solas S, Terneus E. The gastromyzophorous tadpoles of *Atelopus elegans* and *A. palmatus* (Anura: Bufonidae), with comments on oral and suction structures. *Neotrop Biodivers*. 2020;6: 1–13. doi:10.1080/23766808.2019.1709378
47. Señaris C, Lampo M. Río Verde | Los sapitos arlequines. 10 Jan 2018 [cited 7 Sep 2022]. Available: <http://rioverde.life/2018/01/10/los-sapitos-arlequines/>
48. Almonacid J, Rodríguez-Mahecha J, la Marca E, Lötters S, Kahn T, Angulo A. Ranas Arlequines. Bogotá; 2005. Available: https://www.researchgate.net/publication/259363493_Ranas_Arlequines
49. PARG. Conservación de Anfibios. [cited 20 Feb 2021]. Available: <http://www.conservaciondeanfibios.org/parg---ecuador.html>
50. 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
51. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Chen T, Shaw C. Skin secretion transcriptome remains in chromatographic fractions suitable for molecular cloning. *Anal Biochem*. 2019;564–565: 13–15. doi:10.1016/j.ab.2018.10.006
52. 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* (Hyllidae). *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/BIOM9110667
53. Budamgunta H, Maes E, Willems H, Menschaert G, Schildermans K, Kumar AA, et al. Multiple solvent elution, a method to counter the effects of coelution and ion suppression in LC-MS analysis in bottom up proteomics. *Journal of Chromatography B*. 2019;1124: 256–264. doi:10.1016/J.JCHROMB.2019.06.017
54. 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

55. BACHEM. Peptide calculator. [cited 7 Sep 2022]. Available: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>
56. Waghv 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
57. Porto WF, Ferreira KCV, Ribeiro SM, Franco OL. Sense the moment: A highly sensitive antimicrobial activity predictor based on hydrophobic moment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2022;1866: 130070. doi:10.1016/J.BBAGEN.2021.130070
58. Gull S, Shamim N, Minhas F. AMAP: Hierarchical multi-label prediction of biologically active and antimicrobial peptides. *Comput Biol Med.* 2019;107: 172–181. doi:10.1016/J.COMPBIOMED.2019.02.018
59. Veltri D, Kamath U, Shehu A. Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics.* 2018;34: 2740–2747. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTY179
60. Lin T-T, Yang L-Y, Lu I-H, Cheng W-C, Hsu Z-R, Chen S-H, et al. AI4AMP: an Antimicrobial Peptide Predictor Using Physicochemical Property-Based Encoding Method and Deep Learning. *mSystems.* 2021;6. doi:10.1128/MSYSTEMS.00299-21/ASSET/C5D82C8C-CFDD-4C3D-A925-18334516FDEA/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/MSYSTEMS.00299-21-F006.GIF
61. Robles AA. Design of potential leishmanicidal peptides assisted by artificial intelligence. No published. 2022. doi:10.1016/0300-9629(95)98515-1
62. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010 5:4. 2010;5: 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
63. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29: 1859–1865. doi:10.1002/JCC.20945
64. Kyriakou PK, Ekblad B, Kristiansen PE, Kaznessis YN. Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2016;1858: 824–835. doi:10.1016/J.BBAMEM.2016.01.005
65. Sani MA, Whitwell TC, Separovic F. Lipid composition regulates the conformation and insertion of the antimicrobial peptide maculatin 1.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2012;1818: 205–211. doi:10.1016/J.BBAMEM.2011.07.015
66. Dutta SR, Gauri SS, Ghosh T, Halder SK, DasMohapatra PK, Mondal KC, et al. Elucidation of structural and functional integration of a novel antimicrobial peptide from *Antheraea mylitta*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27: 1686–1692. doi:10.1016/J.BMCL.2017.03.003
67. Zhang C, Vasmatzis G, Cornette JL, DeLisi C. Determination of atomic desolvation energies from the structures of crystallized proteins. *J Mol Biol.* 1997;267: 707–726. doi:10.1006/JMBI.1996.0859
68. Shi Y, Xiang R, Horváth C, Wilkins JA. The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A.* 2004 Oct 22;1053(1-2):27-36. PMID: 15543969.
69. Josic D, Kovac S. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. *Curr Protoc Protein Sci.* 2010;Chapter 8. doi:10.1002/0471140864.PS0807S61
70. R Cantor by C, Schimmel pp PR, Freeman and WH. *Biophysical chemistry: Part II 'Techniques for the study of biological structure and function':* By CR Cantor and PR Schimmel. pp 503. WH Freeman and Co, Oxford. 1980. £20.70/£10.60 (paperback) ISBN 0-7167-1189-3/0-7167-1190-7 (paperback). *Biochem Educ.* 1981;9: 157–157. doi:10.1016/0307-4412(81)90143-6
71. Kuipers BJH, Gruppen H. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *J Agric Food Chem.* 2007;55: 5445–5451. doi:10.1021/JF070337L
72. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60: 2299–2301. doi:10.1021/AC00171A028

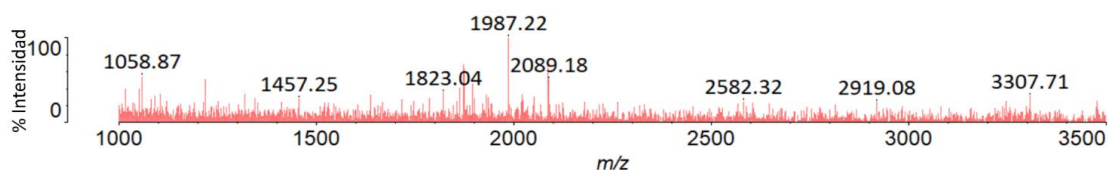
73. Beavis RC, Chait BT, Fales HM. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1989;3: 432–435. doi:10.1002/RCM.1290031207
74. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/NAR/GKV1278
75. 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
76. Shrivastava K, Kailasa SK, Wu HF. Quantum dots laser desorption/ionization MS: multifunctional CdSe quantum dots as the matrix, concentrating probes and acceleration for microwave enzymatic digestion for peptide analysis and high resolution detection of proteins in a linear MALDI-TOF MS. *Proteomics*. 2009;9: 2656–2667. doi:10.1002/PMIC.200800772
77. Katayama H, Nagasu T, Oda Y. Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001;15: 1416–1421. doi:10.1002/RCM.379
78. Yang X, Wu H, Kobayashi T, Solaro RJ, van Breemen RB. Enhanced Ionization of Phosphorylated Peptides during MALDI TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2004;76: 1532–1536. doi:10.1021/AC035203V
79. Wysocki VH, Resing KA, Zhang Q, Cheng G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*. 2005;35: 211–222. doi:10.1016/J.YMETH.2004.08.013
80. van de Meent MHM, de Jong GJ. Novel liquid-chromatography columns for proteomics research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30: 1809–1818. doi:10.1016/J.TRAC.2011.06.012
81. Koutroukides TA, Guest PC, Leweke FM, Bailey DMD, Rahmoune H, Bahn S, et al. Characterization of the human serum depletome by label-free shotgun proteomics. *J Sep Sci*. 2011;34: 1621–1626. doi:10.1002/JSSC.201100060
82. Murad AM, Souza GHMF, Garcia JS, Rech EL. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. *J Sep Sci*. 2011;34: 2618–2630. doi:10.1002/JSSC.201100238
83. Mbeunkui F, Goshe MB. Investigation of solubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MSE. *Proteomics*. 2011;11: 898–911. doi:10.1002/PMIC.200900698
84. Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;445: 683–693. doi:10.1016/J.BBRC.2014.02.041
85. Kwon J. Analysis of membrane proteome by data-dependent LC-MS/MS combined with data-independent LC-MSE technique. *J Anal Sci Technol*. 2010;1: 78–85. doi:10.5355/JAST.2010.78
86. Madala NE, Steenkamp PA, Piater LA, Dubery IA. Collision energy alteration during mass spectrometric acquisition is essential to ensure unbiased metabolomic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012 404:2. 2012;404: 367–372. doi:10.1007/S00216-012-6135-Z
87. Koutroukides TA, Guest PC, Leweke FM, Bailey DMD, Rahmoune H, Bahn S, et al. Characterization of the human serum depletome by label-free shotgun proteomics. *J Sep Sci*. 2011;34: 1621–1626. doi:10.1002/JSSC.201100060
88. Murad AM, Souza GHMF, Garcia JS, Rech EL. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. *J Sep Sci*. 2011;34: 2618–2630. doi:10.1002/JSSC.201100238
89. Silva JC, Gorenstein M v., Li GZ, Vissers JPC, Geromanos SJ. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5: 144–156. doi:10.1074/MCP.M500230-MCP200
90. Schubert OT, Röst HL, Collins BC, Rosenberger G, Aebersold R. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nature Protocols* 2017 12:7. 2017;12: 1289–1294. doi:10.1038/nprot.2017.040

91. Inoue T, Kirchhoff JR, Thompson A, Scha rgen, Kuhn K, Kienle S, et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75: 4942–4942. doi:10.1021/AC030267R
92. Colaert N, Vandekerckhove J, Martens L, Gevaert K. A Case Study on the Comparison of Different Software Tools for Automated Quantification of Peptides. *Methods in Molecular Biology.* 2011;753: 373–398. doi:10.1007/978-1-61779-148-2_25
93. Koskinen V. Common myths about protein scores. 16 Sep 2019 [cited 13 Sep 2022]. Available: <http://www.matrixscience.com/blog/common-myths-about-protein-scores.html>
94. Borchers C, Parker CE, Deterding LJ, Tomer KB. Preliminary comparison of precursor scans and liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *J Chromatogr A.* 1999;854: 119–130. doi:10.1016/S0021-9673(99)00479-3
95. Jørgensen C, Locard-Paulet M. Analysing signalling networks by mass spectrometry. *Amino Acids* 2012 43:3. 2012;43: 1061–1074. doi:10.1007/S00726-012-1293-Z
96. Wenner BR, Lynn BC. Factors that affect ion trap data-dependent MS/MS in proteomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004 15:2. 2004;15: 150–157. doi:10.1016/J.JASMS.2003.10.006
97. Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA, White FM. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 5860–5865. doi:10.1073/PNAS.0608638104
98. Wu L, Han DK. Overcoming the dynamic range problem in mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2006;3: 611–619. doi:10.1586/14789450.3.6.611
99. Houel S, Abernathy R, Renganathan K, Meyer-Arendt K, Ahn NG, Old WM. Quantifying the impact of chimera MS/MS spectra on peptide identification in large-scale proteomics studies. *J Proteome Res.* 2010;9: 4152–4160. doi:10.1021/PR1003856
100. Luethy R, Kessner DE, Katz JE, MacLean B, Grothe R, Kani K, et al. Precursor-Ion Mass Re-Estimation Improves Peptide Identification on Hybrid Instruments. *J Proteome Res.* 2008;7: 4031. doi:10.1021/PR800307M
101. Steen H, Kuster B, Fernandez M, Pandey A, Mann M. Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode. *Anal Chem.* 2001;73: 1440–1448. doi:10.1021/AC001318C
102. Boöttger R, Hoffmann R, Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS One.* 2017;12. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0178943
103. Rauh M. LC–MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B.* 2012;883–884: 59–67. doi:10.1016/J.JCHROMB.2011.09.030
104. Yi J, Warunek D, Craft D. Degradation and Stabilization of Peptide Hormones in Human Blood Specimens. *PLoS One.* 2015;10: e0134427. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0134427
105. Wang Y, Lih T-SM, Chen L, Xu Y, Kuczler MD, Cao L, et al. Optimized data-independent acquisition approach for proteomic analysis at single-cell level. *Clinical Proteomics* 2022 19:1. 2022;19: 1–10. doi:10.1186/S12014-022-09359-9
106. Peterson A, Hohmann L, Huang L, Kim B, Eng JK, Martin DB. Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *J Proteome Res.* 2009;8: 4161–4168. doi:10.1021/PR9001417/SUPPL_FILE/PR9001417_SI_001.PDF
107. Schmelzer CEH, Schöps R, Ulbrich-Hofmann R, Neubert RHH, Raith K. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J Chromatogr A.* 2004;1055: 87–92. doi:10.1016/J.CHROMA.2004.09.003
108. Nzioki J. Databases searched with BLAST. *Basic Bioinformatics Training.* 2017.

109. Darst CR, Cannatella DC. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;31: 462–475. doi:10.1016/J.YMPEV.2003.09.003
110. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25: 4876–4882. doi:10.1093/NAR/25.24.4876
111. Alexander Pyron R, Wiens JJ. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol.* 2011;61: 543–583. doi:10.1016/J.YMPEV.2011.06.012
112. Li J, Xu X, Xu C, Zhou W, Zhang K, Yu H, et al. Anti-infection Peptidomics of Amphibian Skin. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2007;6: 882–894. doi:10.1074/MCP.M600334-MCP200
113. Yang X, Lee WH, Zhang Y. Extremely abundant antimicrobial peptides existed in the skins of nine kinds of Chinese odorous frogs. *J Proteome Res.* 2012;11: 306–319. doi:10.1021/PR200782U
114. Hanifin CT. The Chemical and Evolutionary Ecology of Tetrodotoxin (TTX) Toxicity in Terrestrial Vertebrates. *Marine Drugs* 2010, Vol 8, Pages 577-593. 2010;8: 577–593. doi:10.3390/MD8030577
115. Lim SP, Garzino-Demo A. Cloning trap for signal peptide sequences. *Biotechniques.* 2000;28: 124–130. doi:10.2144/00281ST09
116. Tennesen 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
117. 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
118. 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/
119. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* 2016, Vol 9, Page 59. 2016;9: 59. doi:10.3390/PH9030059
120. Rautenbach M, Troskie AM, Vosloo JA. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie.* 2016;130: 132–145. doi:10.1016/J.BIOCHI.2016.05.013
121. Almeida JR, Lancellotti M, Soares AM, Calderon LA, Ramírez D, González W, et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon.* 2016;120: 147–158. doi:10.1016/J.TOXICON.2016.08.007
122. Olivella MS, Rodríguez AM, Zacchino SA, Somlai C, Penke B, Farkas V, et al. New antifungal peptides. Synthesis, bioassays and initial structure prediction by CD spectroscopy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20: 4808–4811. doi:10.1016/J.BMCL.2010.06.105

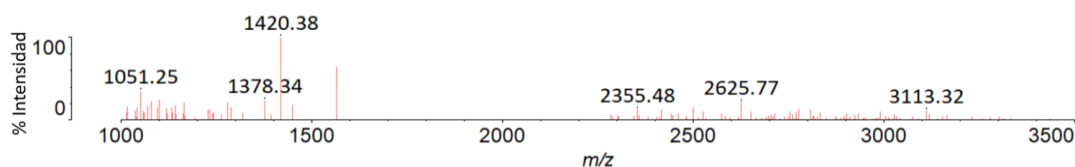
ANEXOS

MALDI-TOF MS de la secreción cutánea completa de *A. nanay*

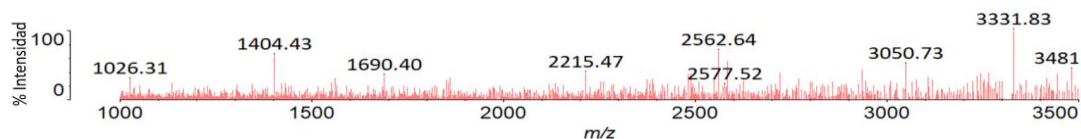


Anexo 1. Espectro de MALDI-TOF MS de la secreción cutánea completa de *A. nanay*. Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

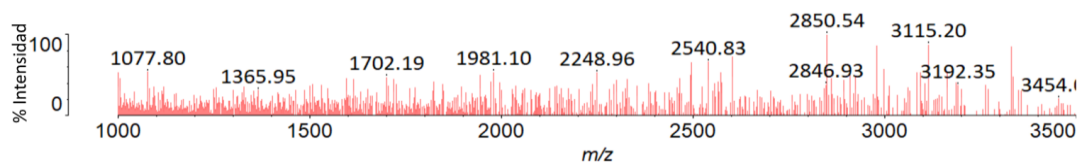
1) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 49



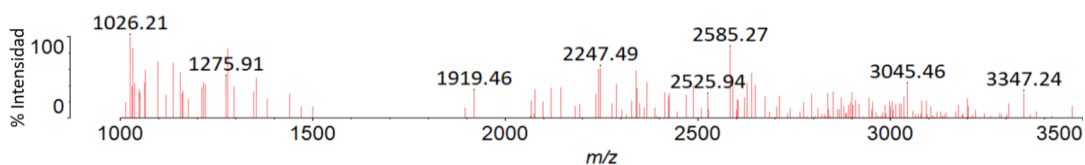
2) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 51



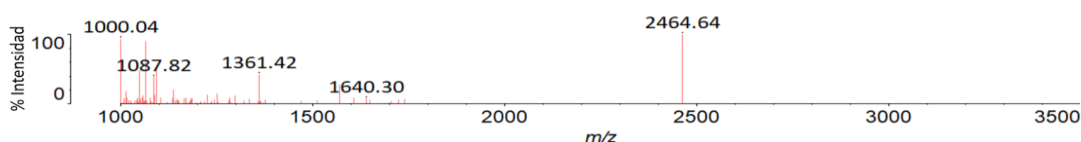
3) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 52



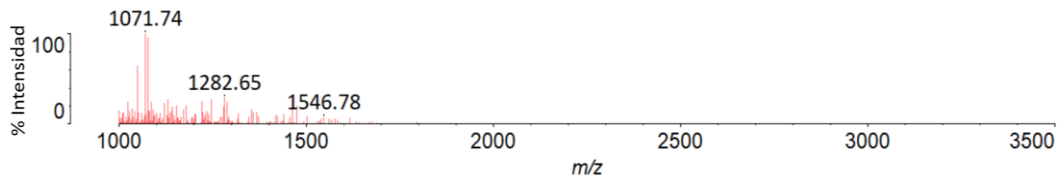
4) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 53



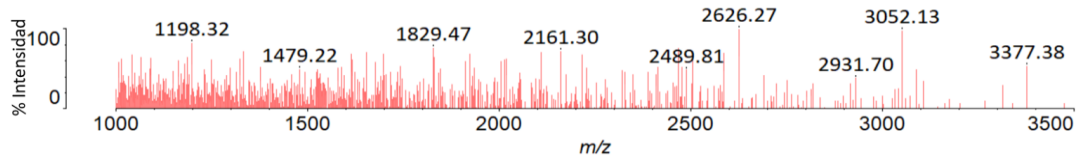
5) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 54



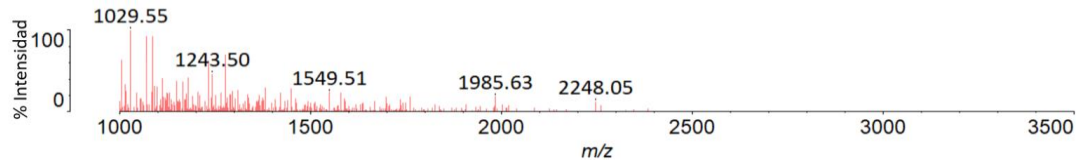
6) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 55



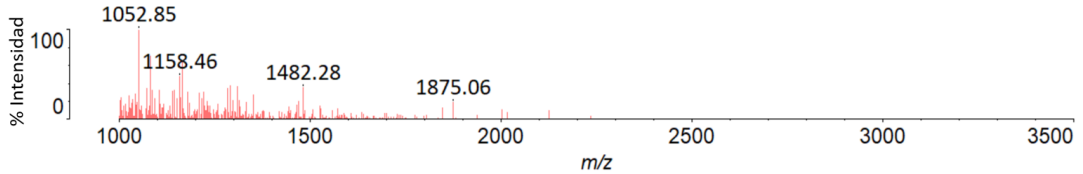
7) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 57



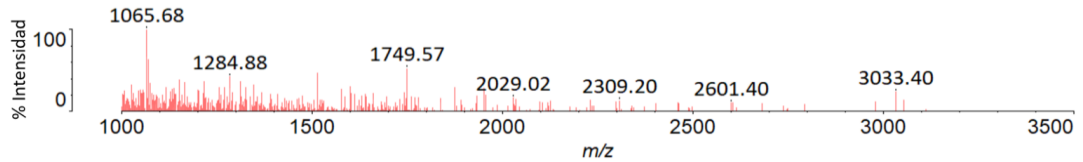
8) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 58



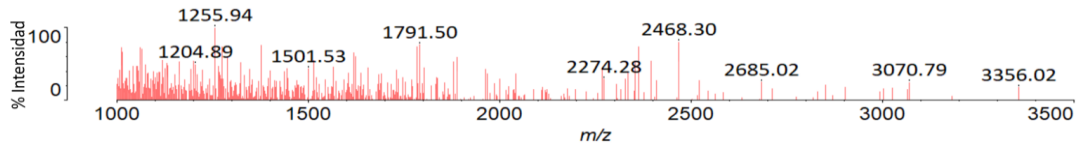
9) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 6



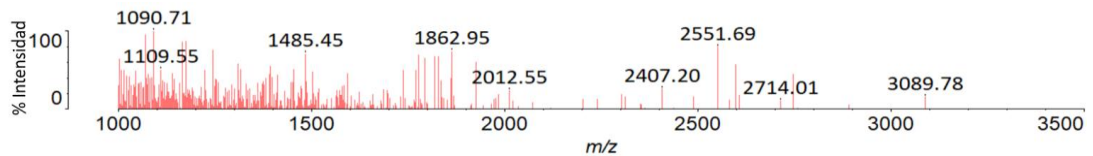
10) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 64



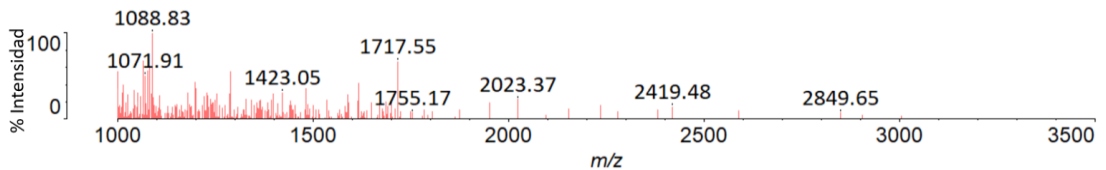
11) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 65



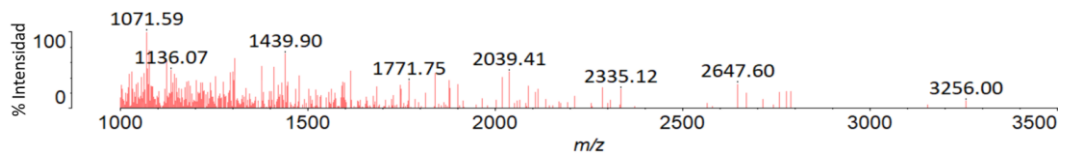
12) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 66



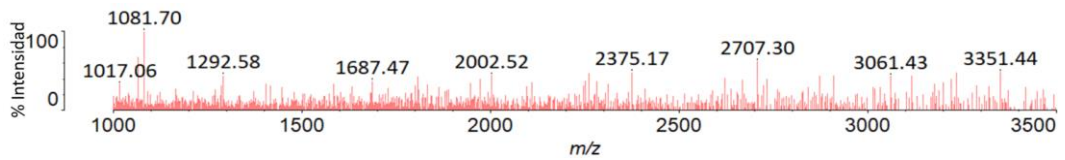
13) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 67



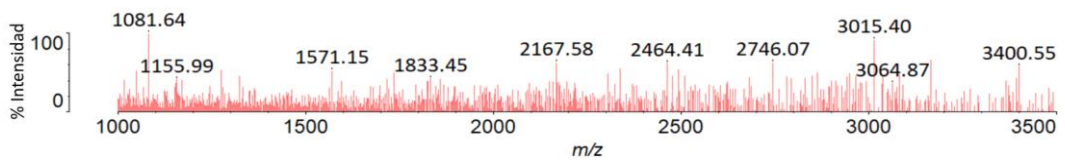
14) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 68



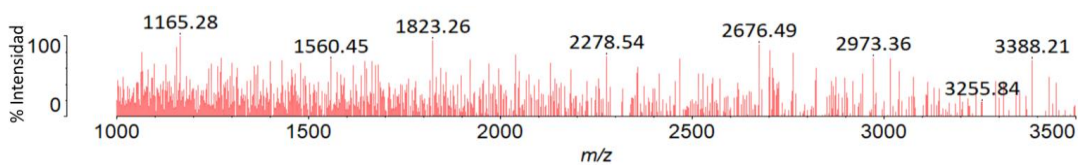
15) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 69



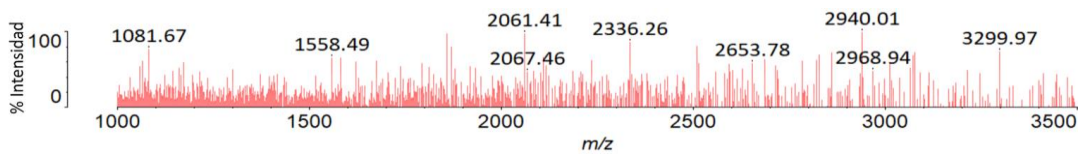
16) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 70



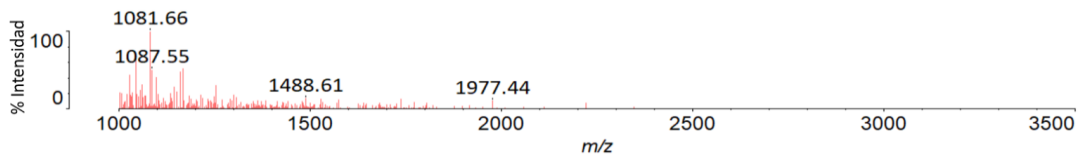
17) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 72



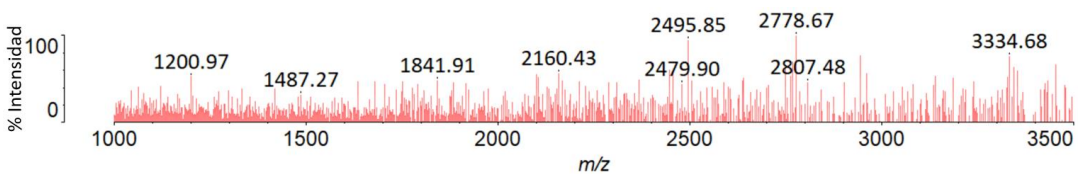
18) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 73



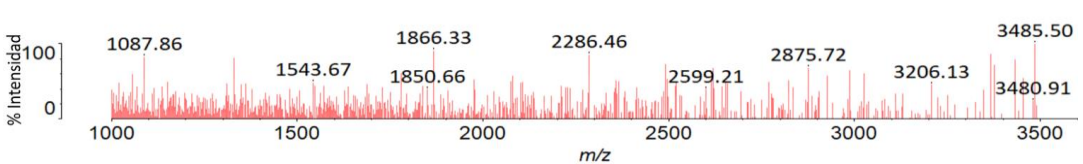
19) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 74



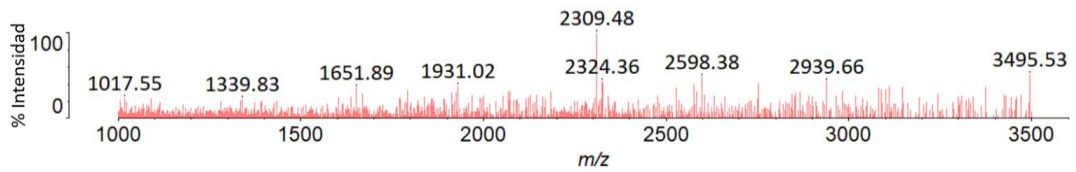
20) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 76



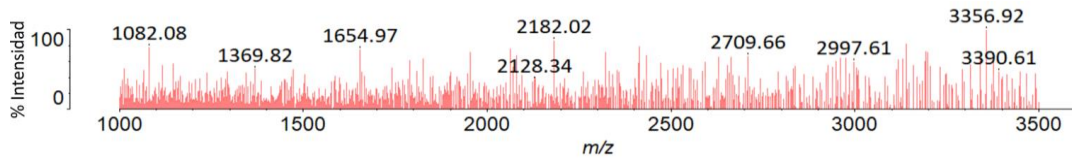
21) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 77



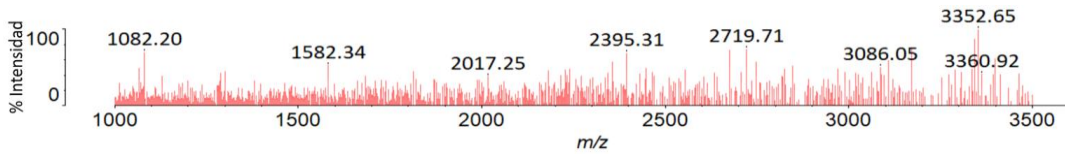
22) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 79



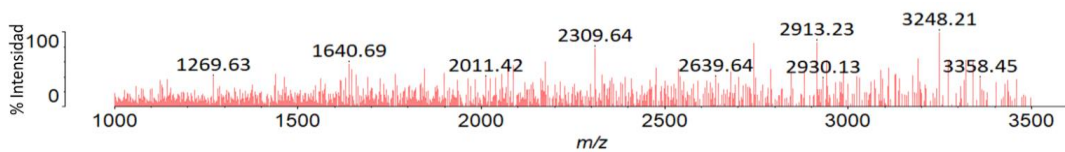
23) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 80



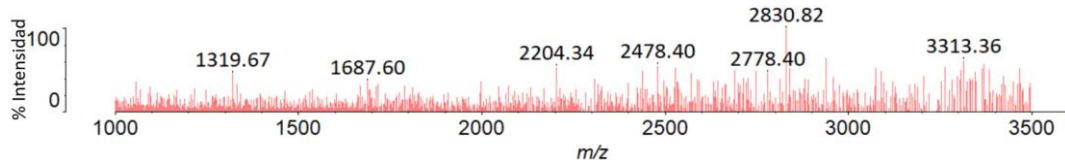
24) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 82



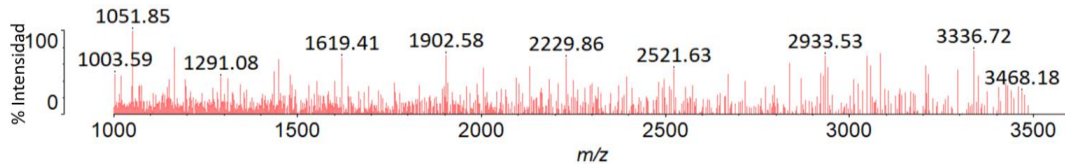
25) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 83



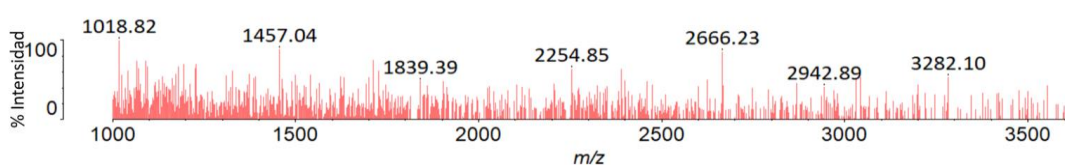
26) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 84



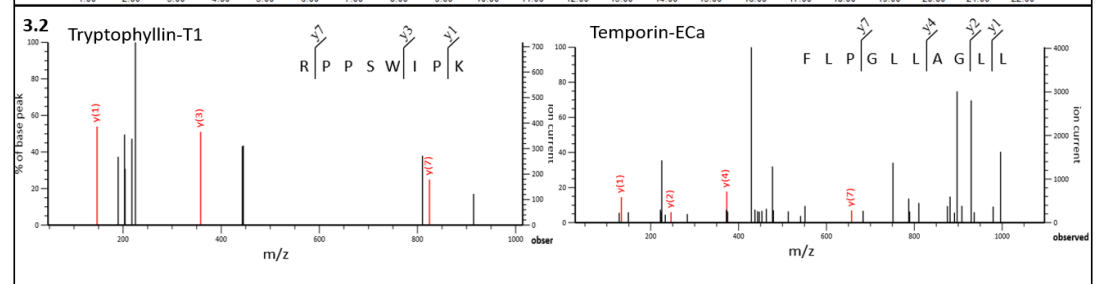
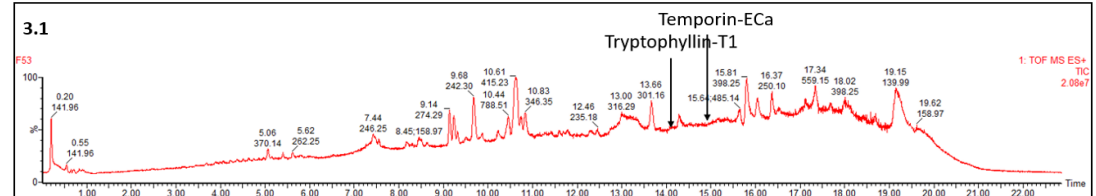
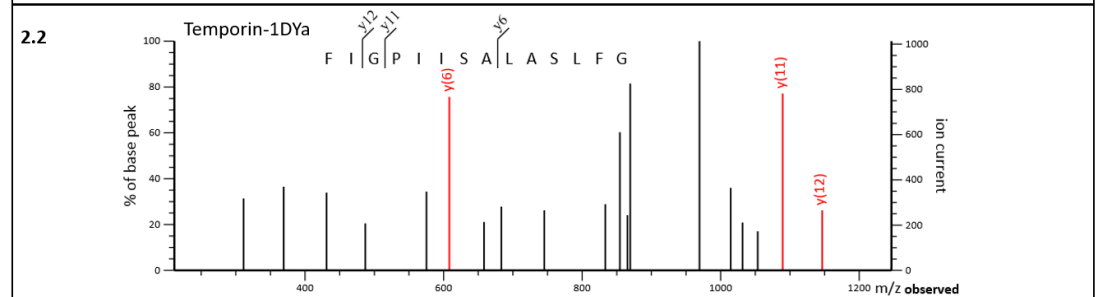
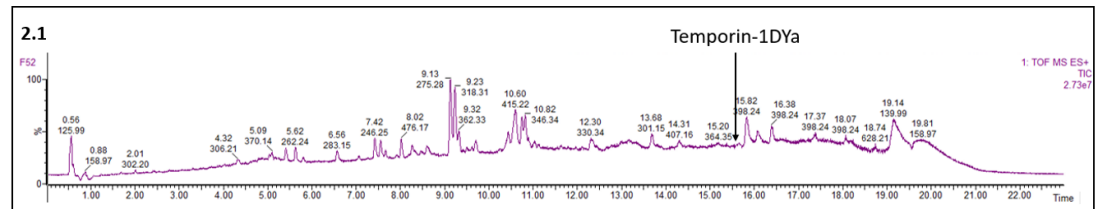
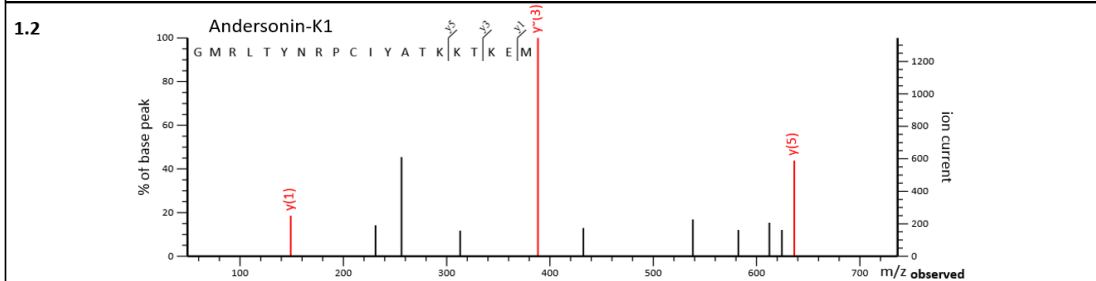
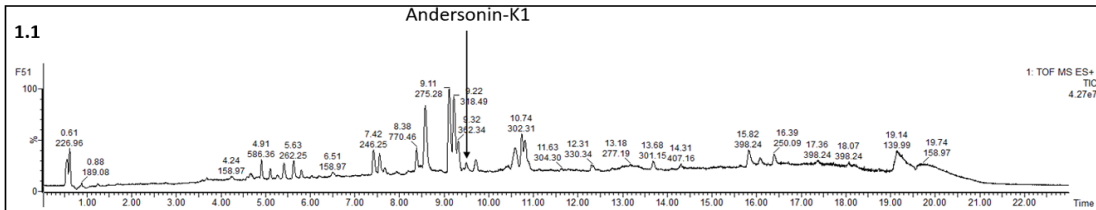
27) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 94

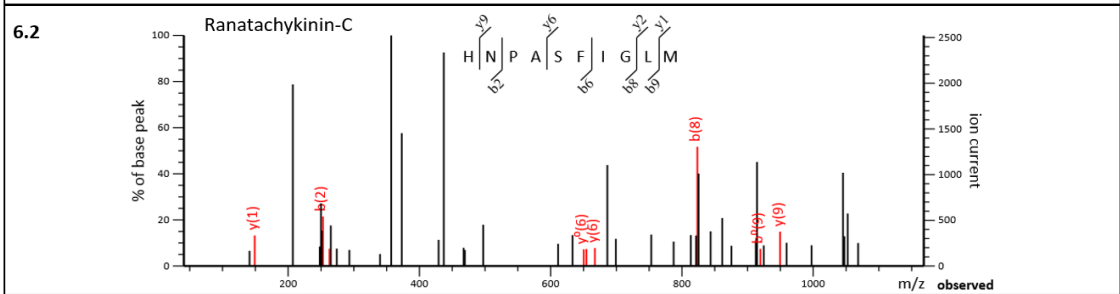
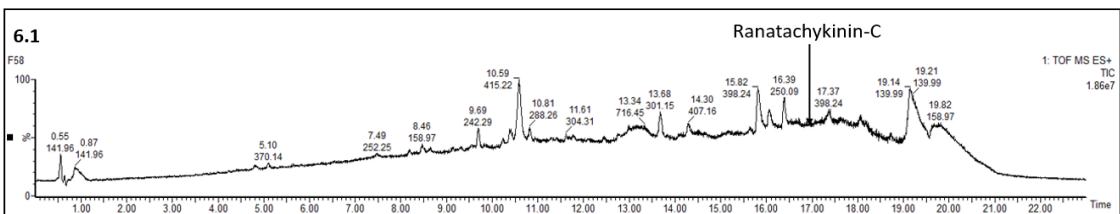
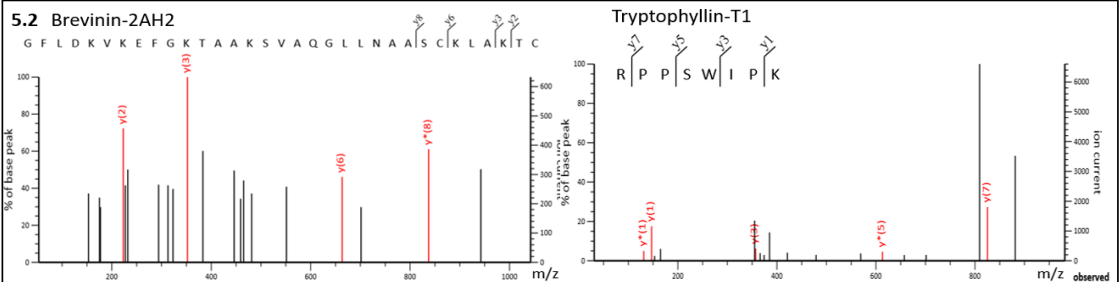
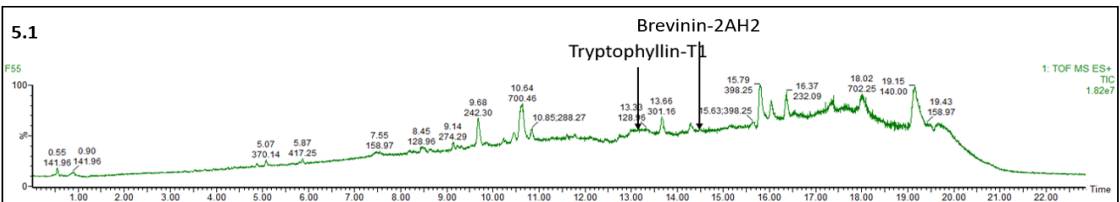
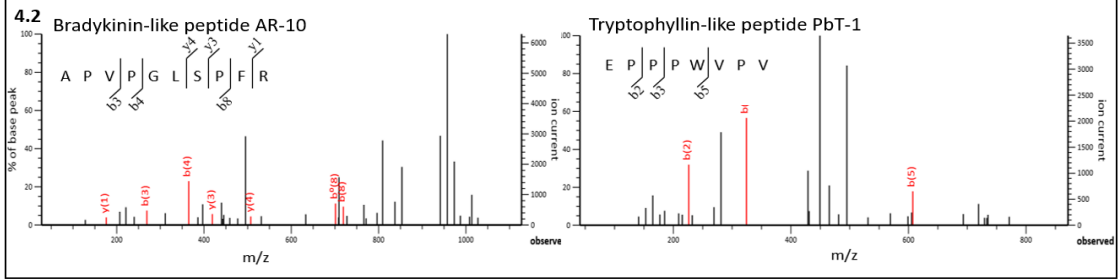
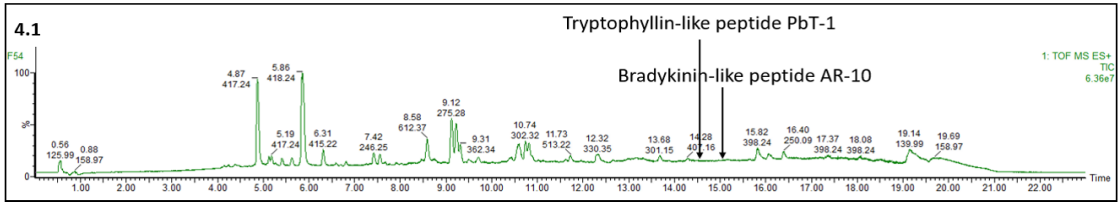


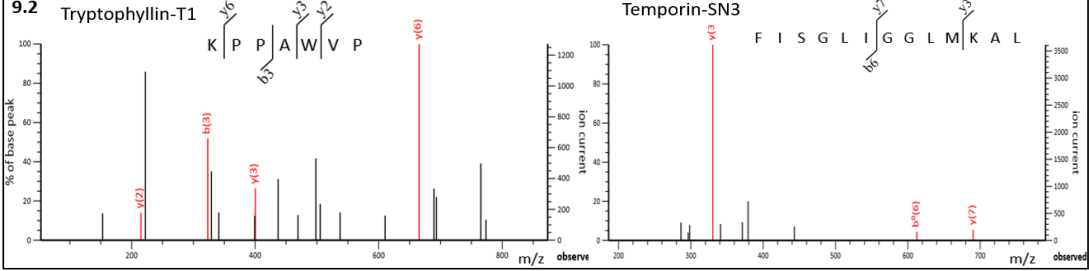
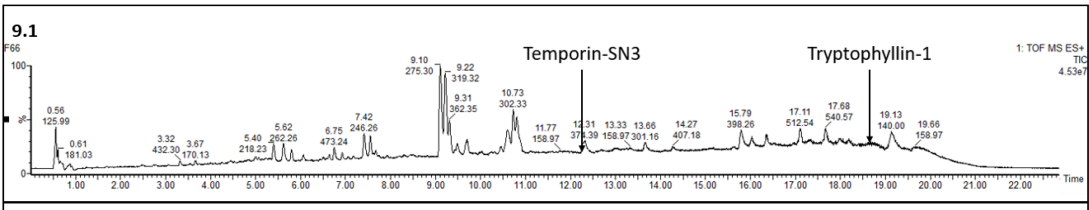
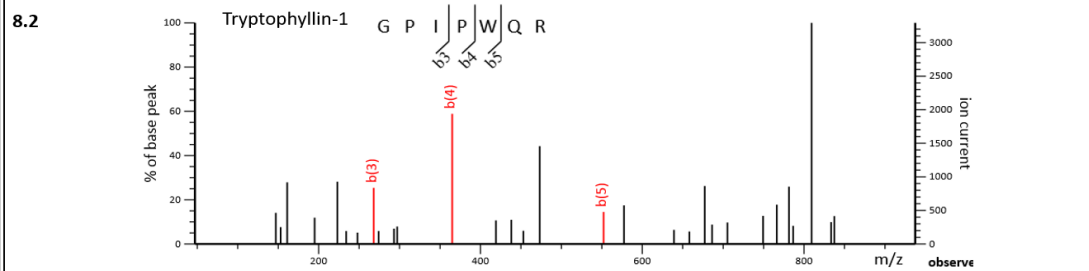
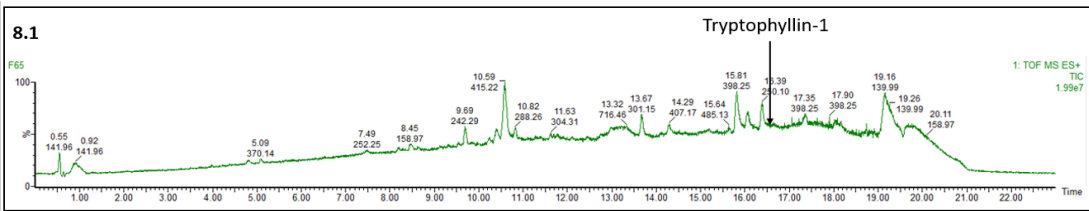
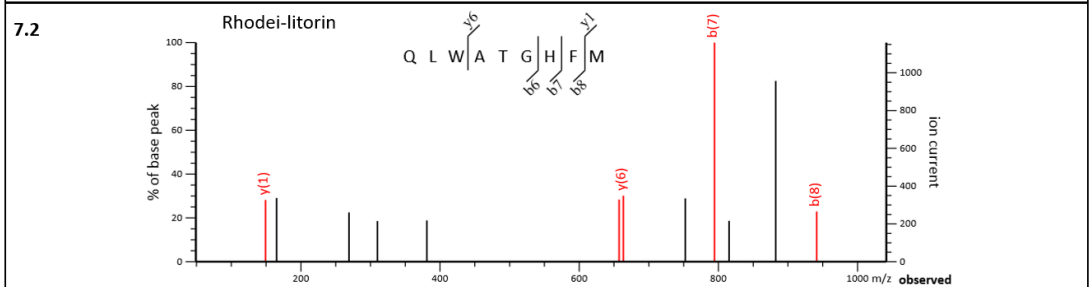
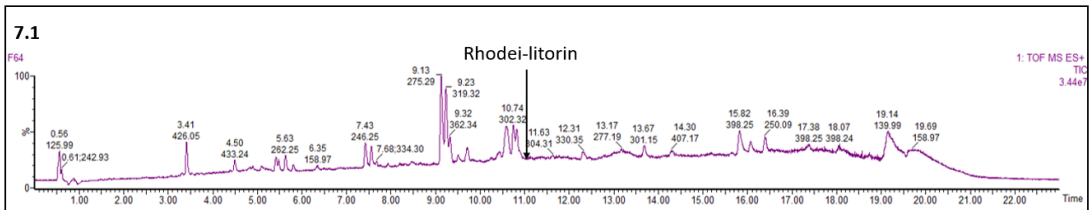
28) MALDI-TOF MS de la fracción de RP-HPLC antimicrobiana 152

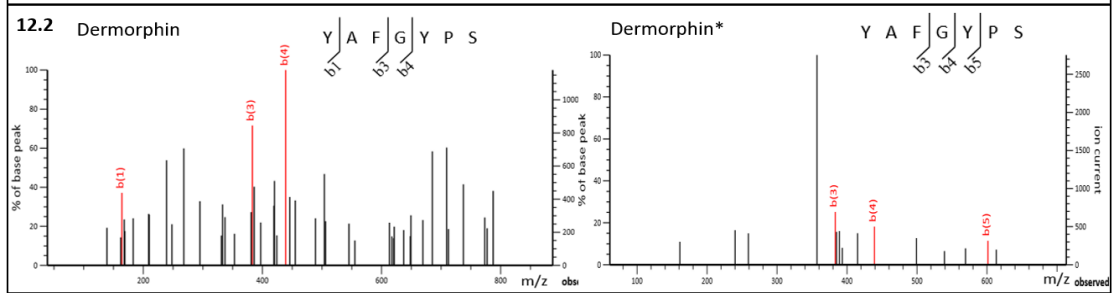
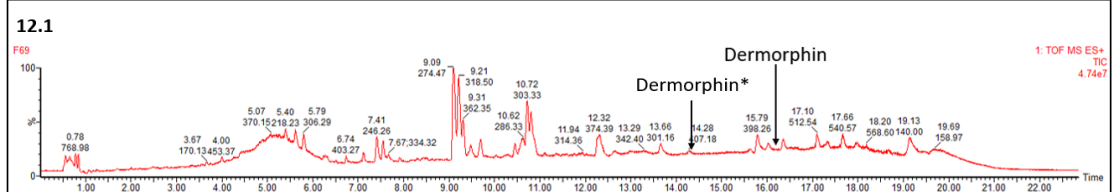
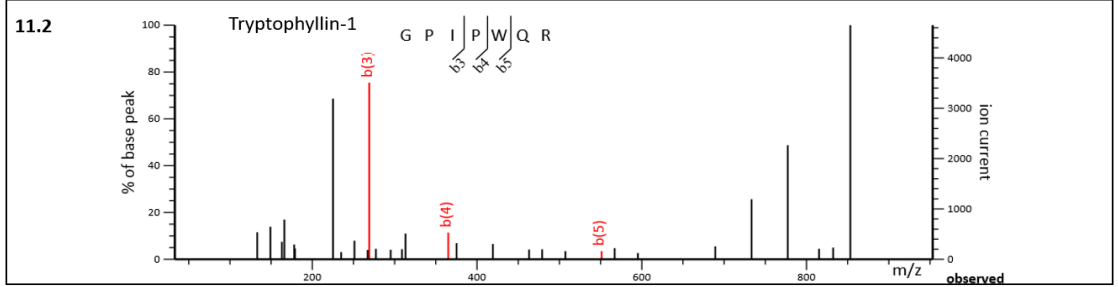
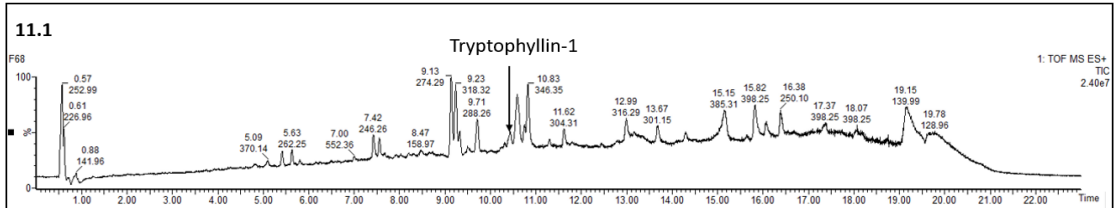
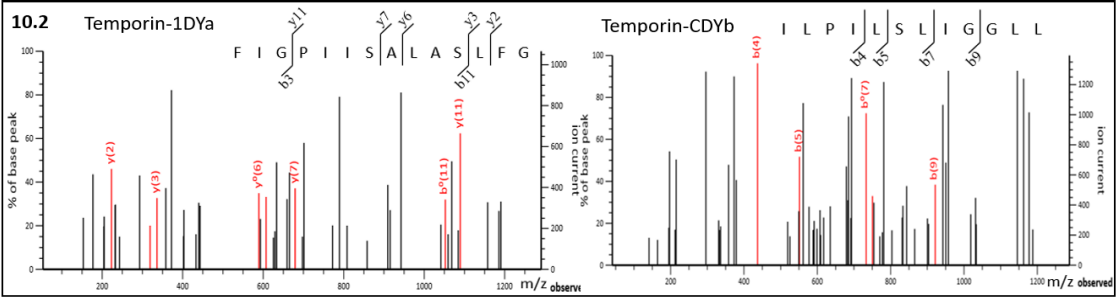
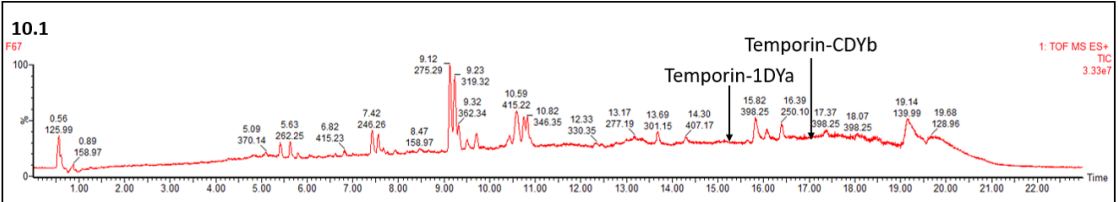


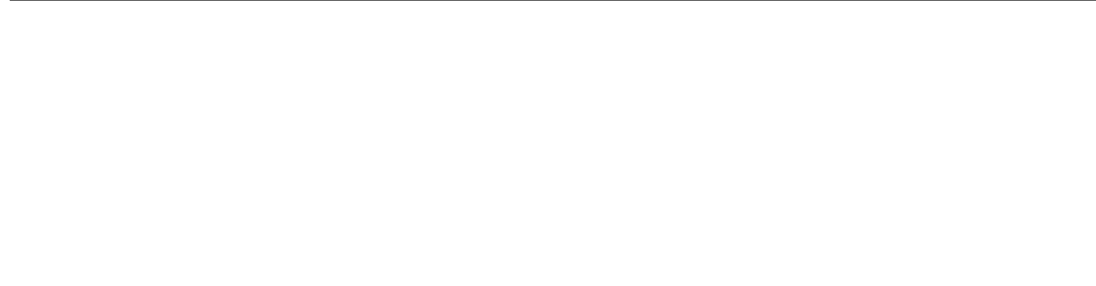
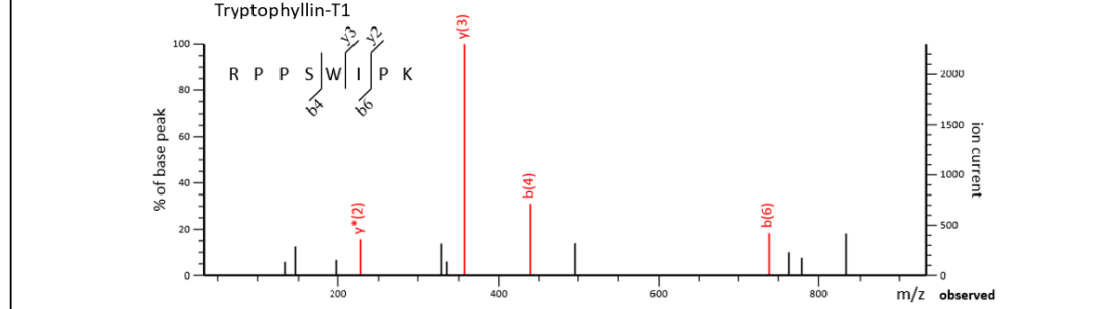
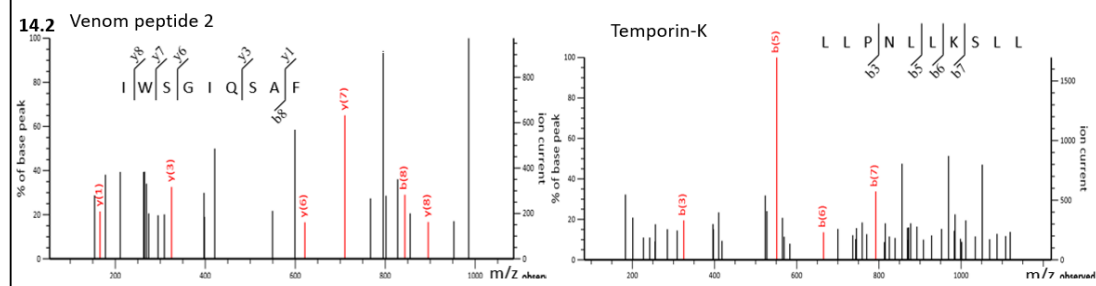
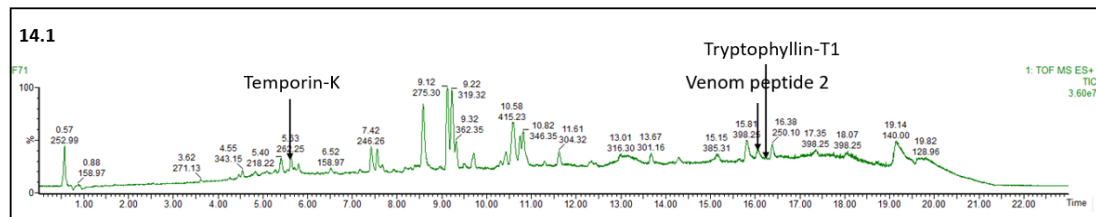
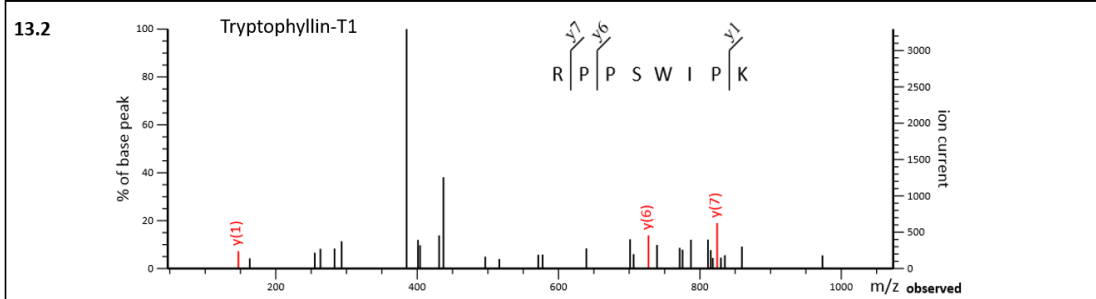
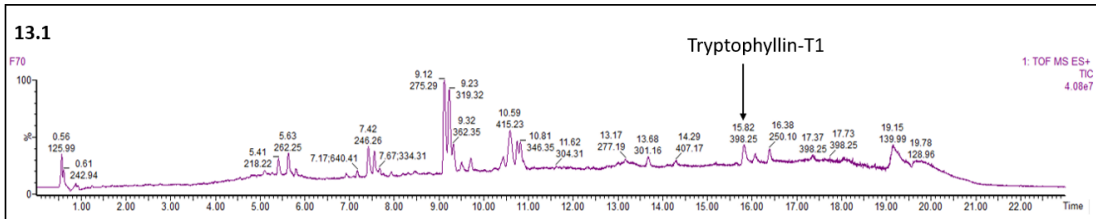
Anexo 2. Espectros masa mediante MALDI-TOF MS de las fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana de *A. nanay.1-28*) Rango de masa de 1000-3500 Da. Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

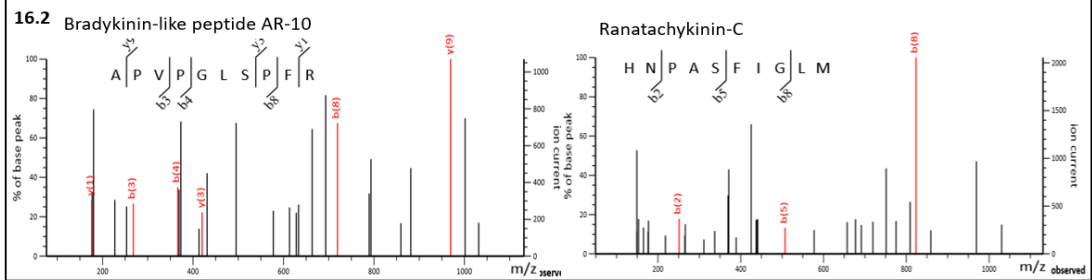
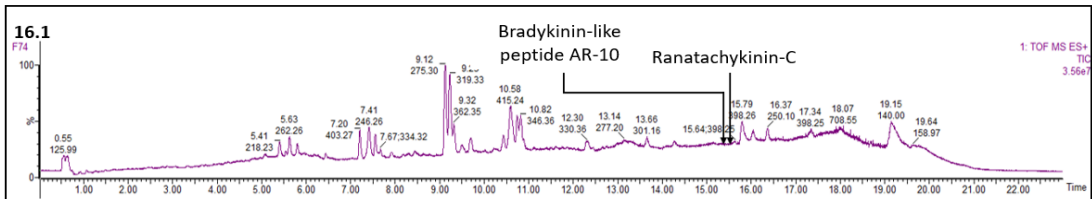
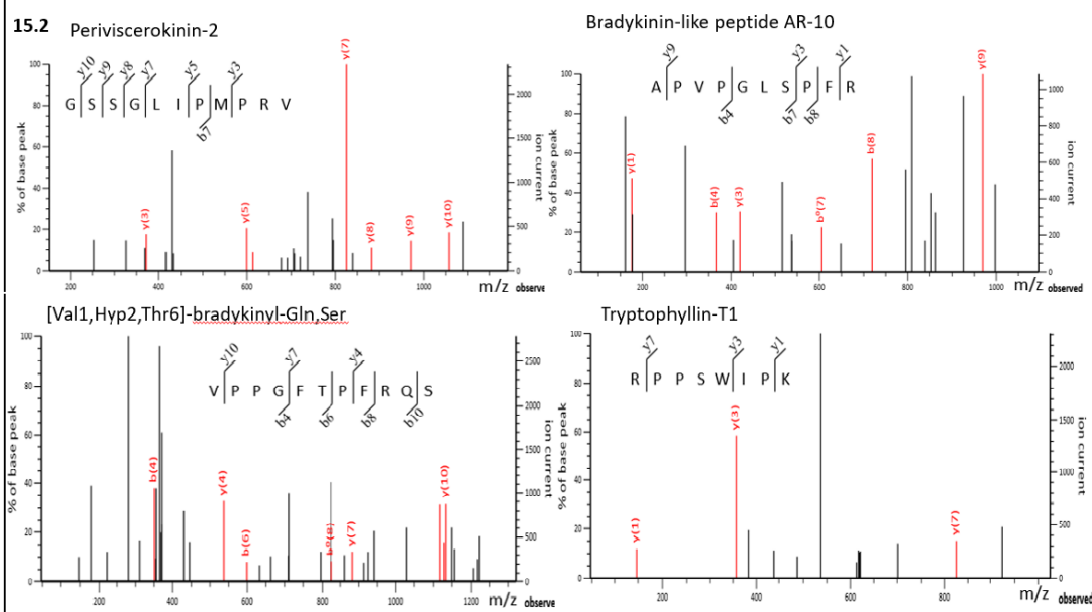
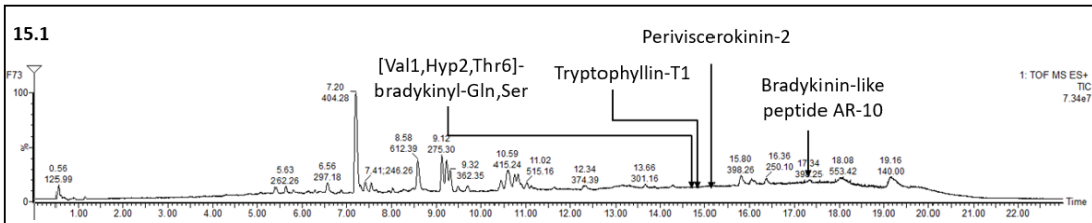


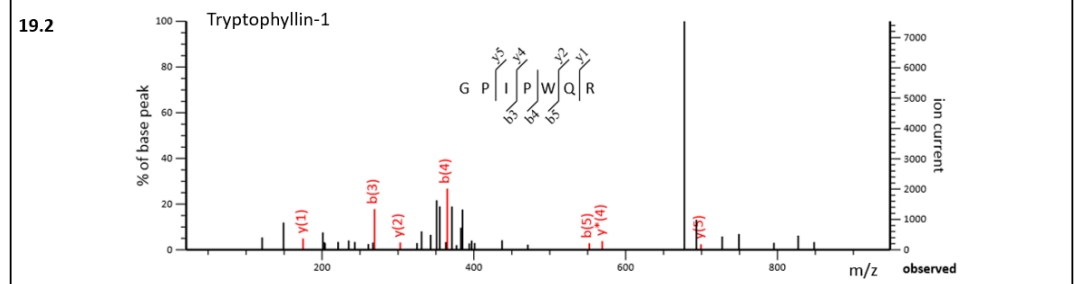
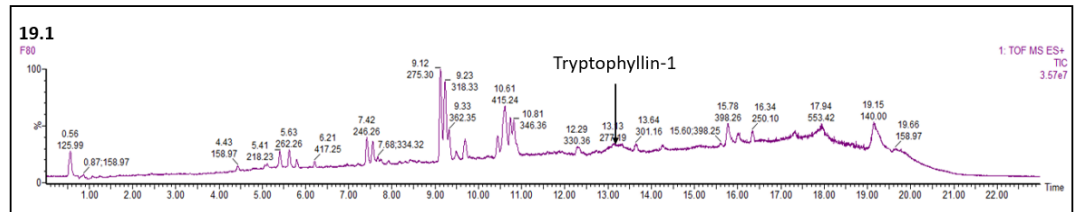
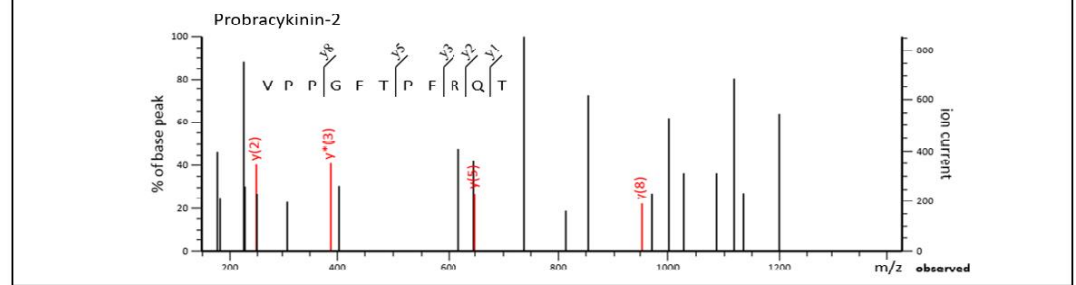
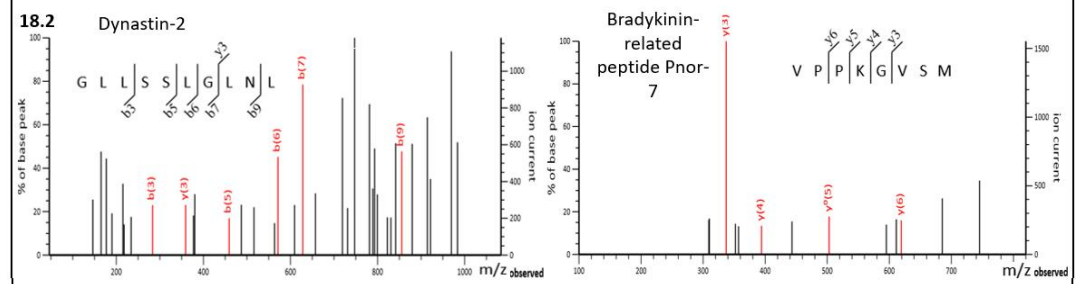
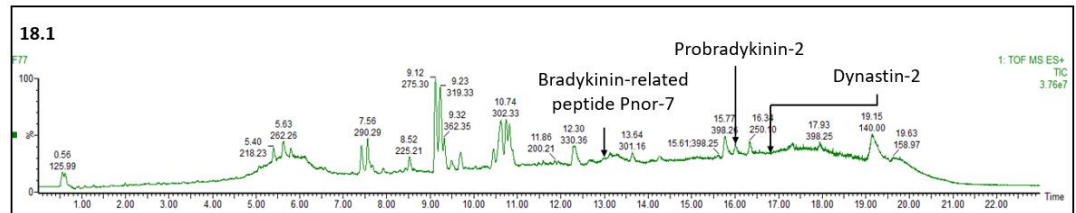
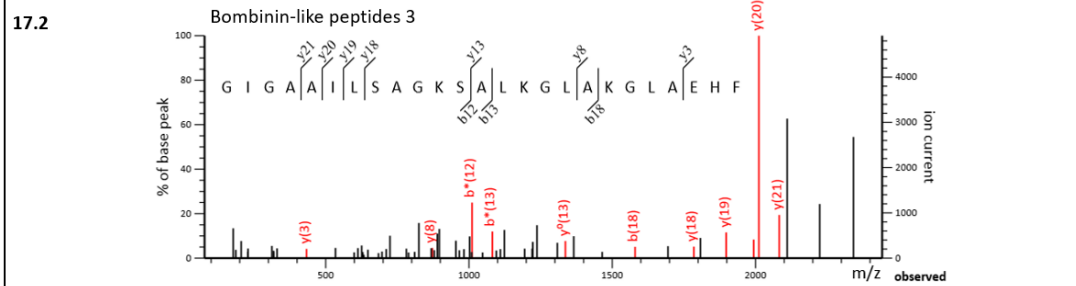
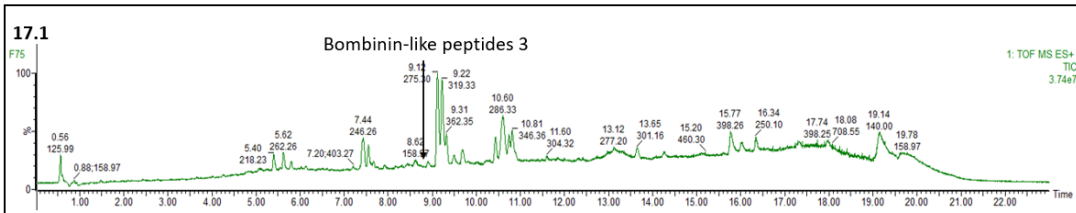


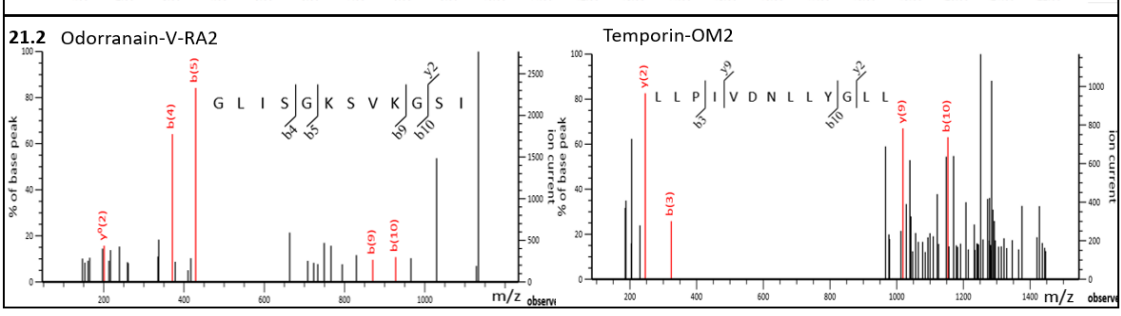
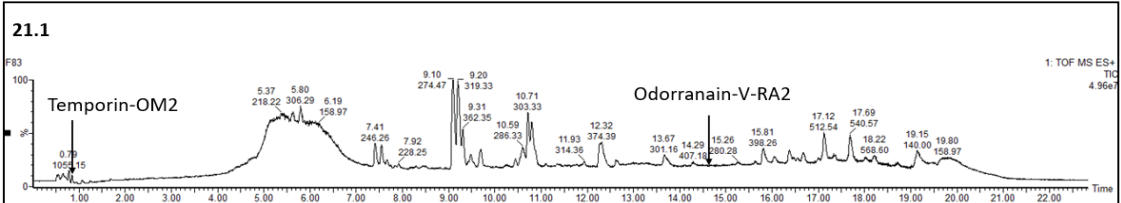
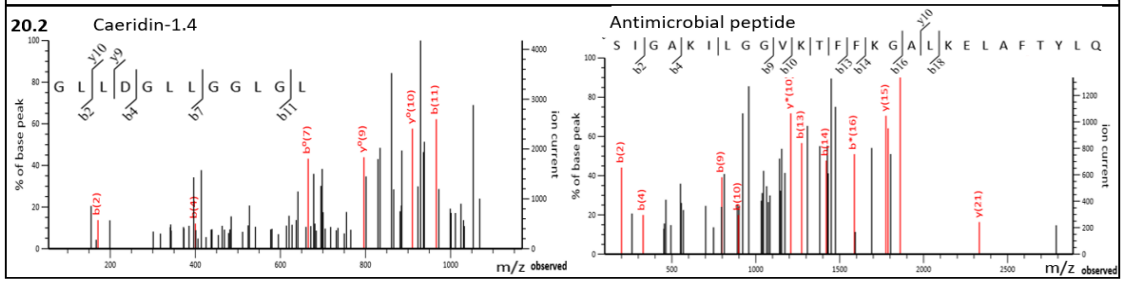
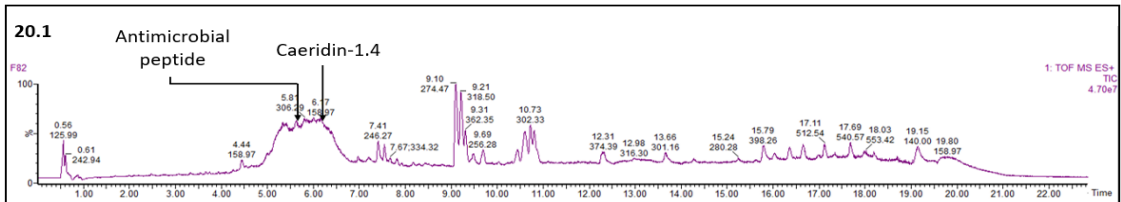


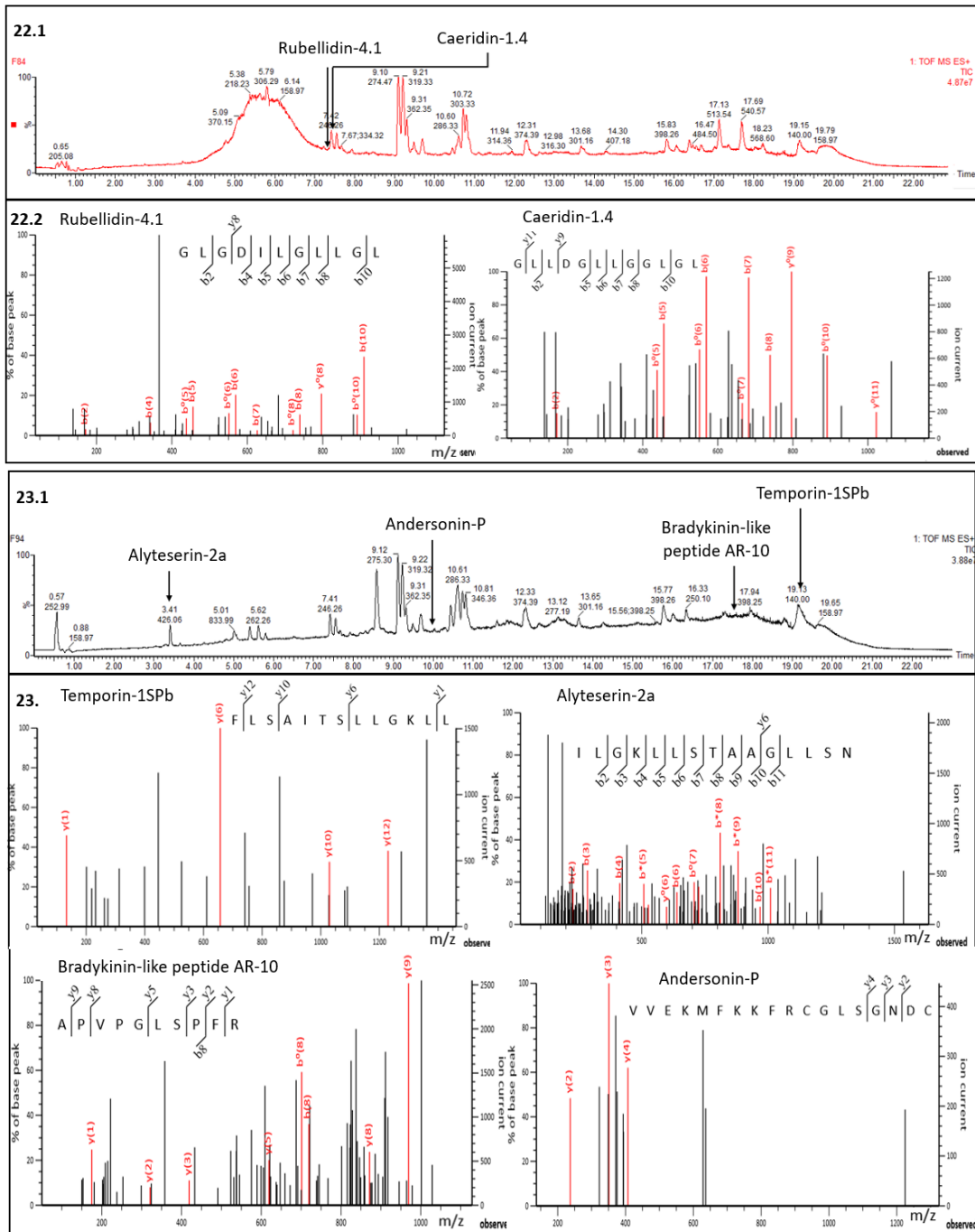




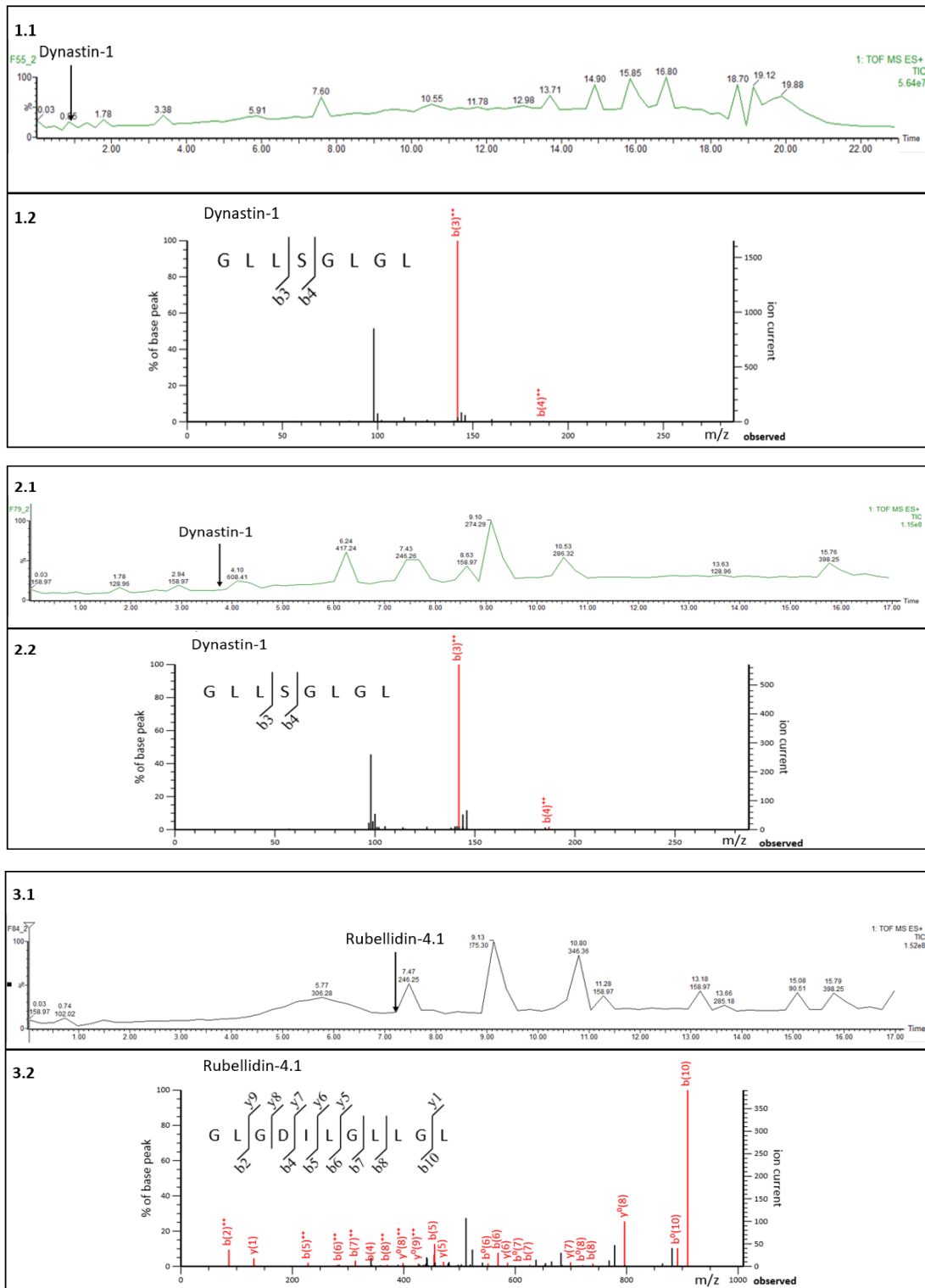








Anexo 3. Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana analizadas por espectrometría de masas en tándem con el método MS^e. La sección n.1 corresponden a los cromatogramas de las fracciones que obtuvieron resultados en el análisis con el programa Mascot Distiller y la ubicación en donde se encontró el péptido similar en el cromatograma y la sección n.2 corresponden a los espectros de masas de cada péptido similar encontrado. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.



Anexo 4. Fracciones de RP-HPLC con actividad antimicrobiana analizadas por espectrometría de masas en tándem con el método DDA. La sección n.1 corresponden a los cromatogramas de las fracciones que obtuvieron resultados en el análisis con el programa Mascot Distiller y la ubicación en donde se encontró el péptido similar en el cromatograma y la sección n.2 corresponden a los espectros de masas de cada péptido similar encontrado. **Realizado por:** López-Tacoaman, Yanileth, 2022.

Anexo 5. Péptidos reportados en especies de la familia Bufonidae. Base de datos (AMP_bufonidae).

Nombre	Especie	Secuencia	Masa/carga (Da)
bufokinin	<i>Rhinella marina</i>	KPRPDQFYGLM-NH ₂	1350
bufo-nt	<i>Rhinella marina</i>	pEAIVSKARRPYIL	1497
buforin-I	<i>Bufo gargarizans</i>	AGRQKQGGKVRKAKTRSSRAGLQFP VGRVHRLLRKGN	4309
baserpin	<i>Bufo gargarizans</i>	HTQYPDILIAKPXDK	60000
bati	<i>Bufo gargarizans</i>	EKDSITD	22000
bas-ah	<i>Bufo gargarizans</i>	NAKXKADVIGKISILLGQDNLSNIVAAM	63000
ba-lysozyme	<i>Bufo gargarizans</i>	QKYERCELAKALKKGGGLADFKGYSLEN WICTAFHESGYNTASTNYPDPKSTDY GIFQINSRWWCNDYKTPRSKNTCNIDC KVLLGDDISPAIKCAKRVSPPNGMGA WVAWKKYCKGKNLSQWTQGCKL	14700
buforin-II	<i>Bufo gargarizans</i>	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	2432
Maximin-Bk		ILGPVLGLVGRLAGGLIKRE	20.302.727
bg-cath-37	<i>Bufo gargarizans</i>	SSRRPCRGRSCGPRLRGGYTLIGRPV KNQNRPKYMWV	4302.08.
BG-CATH(5-37)	<i>Bufo gargarizans</i>	PCRGRSCGPRLRGGYTLIGRPVKNQN RPKYMWV	3815.54
Aurein-3.1	<i>Rhinella diptycha</i>	GLFDIVKKIA GHIAGSI	1739
Bombesin-like peptide 2	<i>Rhinella diptycha</i>	QSFGNQWARGHFM	1662.6
Bombesin-like peptide 1	<i>Rhinella diptycha</i>	QRLGHQWAVGHLM	1641.7
Bombesin	<i>Rhinella diptycha</i>	QQRLGNQWAVGHLM	1638

[Asn ³ ,Lys ⁶ ,Phe ¹³]-14-bombesin	<i>Rhinella diptycha</i>	NLGKQWAVGHFM	1386
Bradykinin-like peptide	<i>Rhinella diptycha</i>	APVPGLSPFRVV	1237.7
Brevinin-1	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC	2531
Brevinin-1Ta	<i>Rhinella diptycha</i>	FITLLLRKFICSITKKC	2028
Buforin-EC	<i>Rhinella diptycha</i>	RAGLKFPVGRVHRLLR	1875.05
Caerin-2.3	<i>Rhinella diptycha</i>	GLVSSIGKALGGLLADVVKSKGQPA	2364
Caeridin-4	<i>Rhinella diptycha</i>	GLLDVVGNVLHSLGL	1504
Citropin-1.2	<i>Rhinella diptycha</i>	GLFDIIKKVASVVGGL	1616
Cruzioseptin-15	<i>Rhinella diptycha</i>	GFLDIVKGVGLVALGAVSKS	1929.13
Dermaseptin-1	<i>Rhinella diptycha</i>	ALWKDLLKNVGIAGKAVLNKVTDMVN Q	3009.4
Hylambatin	<i>Rhinella diptycha</i>	DPPDPDRFYGMM	1441
Hylin-b2	<i>Rhinella diptycha</i>	FIGAILPAIAGLVGGLINR	1864.13
Hyposin-HA3	<i>Rhinella diptycha</i>	FRPALIVRTKGTRL	1626.12
Japonicin-1	<i>Rhinella diptycha</i>	FGLPMLSILPKALCILLKRKC	2685.4
Kassinin	<i>Rhinella diptycha</i>	DVPKSDQFVGLM	1336
Kassinin-like peptide	<i>Rhinella diptycha</i>	QPHPNEFVGLM	1268
Nigrocin-2JDb	<i>Rhinella diptycha</i>	GIFGKILGVGKKVLCGLSGMC	20.781.335
Nigrocin-2HSb	<i>Rhinella diptycha</i>	GLLGSIFGAGKKIACALSGLC	1976.1
Peptide PGLa-R6	<i>Rhinella diptycha</i>	GMASTAGSVLGKLAKTAIGIL	1958.2
Peroniin-1.1	<i>Rhinella diptycha</i>	QPWLPGF	824
Peroniin-1.1a	<i>Rhinella diptycha</i>	DAQEKRPWLPGF	1567
Peroniin-1.3a	<i>Rhinella diptycha</i>	DAQEKRPWLPGFV	1611

Peroniin-1.1b	<i>Rhinella diptycha</i>	SEEEKRQPWLDFG	1600
[Arg4]-Phyllocaerulein	<i>Rhinella diptycha</i>	QEYRGWMDF	1212.4
Phylloseptin-4	<i>Rhinella diptycha</i>	FLSLIPHAINAVSTLVHHS	2112.18
Phylloseptin-3	<i>Rhinella diptycha</i>	FFSMIPKIATGIASLVK	2049.19±0.1
Phylloseptin Bu-2	<i>Rhinella diptycha</i>	FLLSLPHLASGLASLVLSK	1964.15
Ranacyclin-E	<i>Rhinella diptycha</i>	SAPRGCWTKSYPPKPKCK	1906
Ranalexin-1Ca	<i>Rhinella diptycha</i>	FLGGLMKAFPALICAVTKKC	2109.0
Ranatensin-C	<i>Rhinella diptycha</i>	QTPQWATGHFM	1303
Ranatuerin-2Ra	<i>Rhinella diptycha</i>	AAKLLLNPKFRCKAAFC	1892
Riparin-1.2	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPPCAYKGTC	1199
Riparin-1.3	<i>Rhinella diptycha</i>	FPLPCAYKGTYC	1363
Rothein 2.2	<i>Rhinella diptycha</i>	AGDDETLKPVLSLNLVSG	2281
Rugosauperolein-2	<i>Rhinella diptycha</i>	QADPKTFYGLM	1270
Rugosin A-like peptide	<i>Rhinella diptycha</i>	KGAAKGLLEVASCCLKSKSC	1892.6
Signiferin-1	<i>Rhinella diptycha</i>	RLCIPYIIPC	1191
Temporin-ECa	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPGLLAGLL	1013.33
Temporin-1DYa	<i>Rhinella diptycha</i>	FIGPIISALASLFG	1403.8
Temporin-A	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPLIGRVLS GIL	1398
Temporin-1Lc	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPILINLIHKGLL	1603.1
Temporin-1Cb	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPLFASLIGKLL	1430.0
Temporin-GH	<i>Rhinella diptycha</i>	FLPLLFGAISHLL	1438.8
Tigerinin-2	<i>Rhinella diptycha</i>	RVCFAIPLPICH	1368
Tigerinin-2OS	<i>Rhinella diptycha</i>	RTCIIPLVMC	1243.7

Tigerinin-10S	<i>Rhinella diptycha</i>	FCTMIPIPRCY	1342
Uperolein	<i>Rhinella diptycha</i>	QPDPNAFYGLM	1252
Uperin-5.1	<i>Rhinella diptycha</i>	FQFVNPSDIVFGS	1426
Buforin I	<i>Bufoes sitibundus</i>	AGRKGQGGKVRKAKTRSSRAGLQFP VGRVHRLLRKGN	4309
Maximin 1	<i>Bufoes sitibundus</i>	MNFKYIVAVSFLASAYARSEENDEQS LSQRDVLEEEESLREIRGIGTKILGGVKT ALKGALKELASTYANGKRTAEEHEVMK RLEAVMRDLDSLDPPEAAERETRSFN QEEIANLFTKKEKRILGPVISTIGGVLLG LLKNLG	2674
Alyteserin-1a	<i>Bufoes sitibundus</i>	GLKEIFKAGL GSLVKGIAAH VAS	2267
Maximin-Bk	<i>Bufoes sitibundus</i>	ILGPVLGLVGRLAGGLIKRE	2030.27

Realizado por: López-Tacoaman, Yanileth, 2022.