

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Microbiología

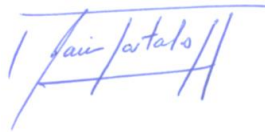
**Efecto antimicrobiano de péptidos sintéticos obtenidos a partir de la piel de anuros
ecuatorianos sobre bacterias multirresistentes**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología

Camila Micaela Nuñez Santana

Quito, 2023

Yo, Jaime Costales Cordero, PhD, certifico que la disertación de Microbiología de la candidata Camila Micaela Nuñez Santana ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Jaime Costales Cordero, PhD.
DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN
Quito, 2023

Para mi hermano Israel, quien es un verdadero modelo a seguir.

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Dios por la sabiduría y la guía que me ha brindado a lo largo de mi carrera académica. Agradezco a mi mamá, papá y hermano, por su constante apoyo incondicional. Han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza, siempre creyendo en mí y alentándome a perseguir mis sueños.

Al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi trabajo de disertación en sus instalaciones. Asimismo, quiero agradecer a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento otorgado para este trabajo.

Agradezco especialmente a la Mtr. Miryan Rivera Iñiguez por su apoyo, confianza y por incluirme en su grupo de investigación del Laboratorio de Investigación en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA). También quiero expresar mi gratitud al Mtr. Jaime Costales por ser el director de este proyecto. Su liderazgo y orientación han sido fundamentales para el desarrollo de mi trabajo.

A Mateo Salazar y a Miguel Ángel Llumiquinga por haberme brindado su guía y acompañamiento en cada etapa del desarrollo de este trabajo.

Agradezco a mis profesores de microbiología, y en especial al PhD. Martín Marcial y Ing. Jeniffer Yáñez, por todo el apoyo y la confianza que me han brindado a lo largo de mi desarrollo estudiantil.

Por último, quiero agradecer a Francis Herrera por haber estado a mi lado durante todo el proceso de desarrollo de este trabajo. Su apoyo constante ha sido fundamental para enfrentar los desafíos que surgieron a lo largo de la carrera. Además, quiero reconocer y agradecer sinceramente a José, Jerram, Francisco, Jonattan, Kevin, Stephany, Juan, Micaela y Dylon por su presencia en mi vida y el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de esta etapa. Y a mi mejor amiga Mikaela por su constante apoyo en los momentos más difíciles.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	9
Introducción	10
Materiales y Métodos.....	13
Péptidos.....	13
Mínima concentración Inhibitoria.....	13
Prueba hemolítica.....	14
Resultados	15
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	15
Prueba hemolítica.....	16
Discusión de resultados.....	17
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	17
Prueba de hemolítica.....	20
Conclusiones	21
Agradecimientos	22
Referencias.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentraciones de la actividad hemolítica de Dermaseptina SP10 de *Agalychnis spurelli*. 16

Figura 2. Concentraciones de la actividad hemolítica de Dermaseptina SP10 de *Agalychnis spurelli*..... 17

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 aislados de <i>Agalychnis spurrelli</i>	13
Tabla 2. Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 en tres diferentes repeticiones de las cuatro bacterias analizadas.	16
Tabla 3. Porcentaje de hemólisis de todas las concentraciones del péptido DRS-SP10.....	17
Tabla 4. Porcentaje de hemólisis de todas las concentraciones del péptido DRS-SP7.....	17
Tabla 5. Comparación del MIC de las seis Dermaseptinas.....	19
Tabla 6. Comparación de del porcentaje de la actividad hemolítica en seis Dermaseptinas.	21

1 TÍTULO

2
3 Efecto antimicrobiano de péptidos sintéticos obtenidos a partir de la piel de anuros ecuatorianos
4 sobre bacterias multirresistentes

5 Autores

6
7 Nuñez Camila¹, Costales Jaime A.², Rivera Miryan¹

8 ¹ Laboratorio de Investigación en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios, Centro de
9 Investigación para la Salud en América Latina, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia
10 Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador.

11 ² Centro de Investigación para la Salud en América Latina, Escuela de Ciencias Biológicas,
12 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador.

14 Resumen

15
16 Los antibióticos tradicionales están perdiendo efectividad frente a bacterias
17 multirresistentes, las cuales se producen por el uso excesivo e inapropiado de agentes
18 antibacterianos y por una selección natural de cepas bacterianas resistentes. Estas bacterias son
19 cada vez más comunes y representan una amenaza para la salud mundial. El Sistema Mundial de
20 Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos emitió un informe en 2018 que mostraba que
21 las principales bacterias que presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos son
22 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*.
23 Esto ha planteado la necesidad de encontrar nuevas soluciones para combatir estas infecciones. En
24 este estudio, se analizó la actividad de dos péptidos antimicrobianos frente a *S. aureus* resistente a
25 la oxacilina (C-ORSA), *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *K.*
26 *pneumoniae* portadora del gen KPC (*K. pneumoniae* carbapenemasa) y *Serratia marcescens*. Estos
27 péptidos antimicrobianos son una alternativa innovadora para el tratamiento de infecciones
28 causadas por bacterias multirresistentes. Los péptidos antimicrobianos son moléculas naturales o
29 sintéticas que poseen una amplia actividad inhibitoria contra una gran variedad de
30 microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoos. Además, existe una baja
31 probabilidad de que las bacterias desarrollen resistencia en comparación con los antibióticos
32 tradicionales. El estudio utilizó la metodología de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y
33 una prueba hemolítica. Se realizaron ensayos en placas de microdilución de 96 pocillos, con 10
34 diluciones de los péptidos, siendo 512 µg/ml la más alta y 1 µg/ml la más baja. Se realizaron 7
35 repeticiones por triplicado de cada ensayo para asegurar la repetitividad y la reproducibilidad de
36 los resultados. Los hallazgos demostraron que los péptidos Dermaseptina sp7 y Dermaseptina sp10
37 exhibieron actividad inhibitoria frente a *S. aureus* (C-ORSA) y *E. coli* (BLEE), a concentraciones
38 de 64 32 µg/m y 32 µg/m de MIC respectivamente, mientras que sobre *K. pneumoniae* y *S.*

39 *marcescens* no mostraron esta actividad. Estos péptidos no son citotóxicos para los eritrocitos.
40 Estos resultados sugieren que la Dermaseptina SP7 y la Dermaseptina SP10 podrían ser una opción
41 terapéutica prometedora para tratar infecciones causadas por bacterias *S. aureus* y *E. coli*
42 multirresistentes.
43

44 **Introducción**

45

46 Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, se mantuvo un
47 equilibrio entre las infecciones causadas por microorganismos y la salud (1). En 1939, Florey y
48 Chain desarrollaron métodos para el análisis y ensayo de la penicilina y para su producción a gran
49 escala (2). Desde ese momento, varias compañías farmacéuticas comenzaron a obtener nuevas
50 moléculas antibióticas a partir de diferentes microorganismos o derivados semisintéticos de los
51 mismos (3). Cuando se estaban desarrollando nuevos antibióticos con un amplio espectro, a partir
52 de varios compuestos pertenecientes a diversas familias de beta-lactámicos, aminoglucósidos,
53 tetraciclinas y macrólidos antimicrobianos, las bacterias empezaron a mostrar los primeros signos
54 de resistencia (4). En palabras de (5), en el año 1940 aparecieron los primeros aislados de *S. aureus*
55 resistentes a la penicilina, determinados por la presencia de enzimas hidrolíticas penicilinasas (6),
56 y para el año 1960, este microorganismo se volvió resistente a la meticilina debido a la presencia
57 del gen *mecA* (7). En la década de los 80, como (8) aparecieron las primeras cepas de
58 microorganismos BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) y resistentes a la vancomicina (9).
59 En la década de 2000, se presentó el primer caso de *M. tuberculosis* resistente a varios fármacos
60 (10) y en 2010 se reportó el primer caso de *K. pneumoniae* productora de KPC tipo 2 en Ecuador
61 (11). La problemática de la resistencia a los antibióticos es una amenaza para la salud que crece a
62 nivel mundial, y se prevé que cobrará más vidas que todas las formas de cáncer combinadas para
63 2050 si no se puede controlar (12).
64

65 En el informe de 2022 del Sistema Global de Vigilancia y Uso de la Resistencia
66 Antimicrobiana con sus siglas en inglés (GLASS), se evidencia la existencia de niveles
67 preocupantes de resistencia en bacterias que frecuentemente causan infecciones del torrente
68 sanguíneo en entornos hospitalarios, como *K. pneumoniae* y *Acinetobacter* spp (13). Estas
69 infecciones pueden ser potencialmente mortales y requieren el uso de antibióticos de último
70 recurso, como los carbapenémicos (14). Sin embargo, se reportó que el 8% de las infecciones del
71 torrente sanguíneo causadas por *K. pneumoniae* eran resistentes a los carbapenémicos, lo que
72 incrementa el riesgo de muerte debido a infecciones intratables. Además, el informe revela que la
73 resistencia mediana a las cefalosporinas de tercera generación en las infecciones sanguíneas
74 causadas por *E. coli* fue del 41.8%, mientras que la resistencia mediana a la meticilina en *S. aureus*
75 fue del 34.7% (14).
76

77 (15) realizó un análisis en pacientes de cuidados intensivos, donde se encontraron los
78 siguientes porcentajes de resistencia en algunas bacterias:

- 79
- 80 • *E. coli* mostró un 79% de resistencia a ceftriaxona y un 77.8% de resistencia
81 a cefepime, lo cual está asociado a la presencia de betalactamasas de espectro extendido
82 (BLEE).
- 83 • *K. pneumoniae* presentó una resistencia del 40% a los carbapenémicos, tanto
84 imipenem como meropenem.
- 85 • *Pseudomonas aeruginosa* mostró una resistencia del 37.5% a ceftazidima,
86 del 44% a imipenem.
- 87 • *S. aureus* presentó una resistencia del 38.5% a oxacilina.
- 88

89 En relación con el microorganismo sujeto a vigilancia de resistencia antimicrobiana, se ha
90 reportado que *E. coli* presenta el mayor porcentaje de resistencia, superando el 50% de los aislados
91 de los servicios hospitalarios registrados por el Centro de Referencia Nacional para la Resistencia
92 Antimicrobiana (CRN-RAM) - Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI). Le
93 siguen en porcentaje de resistencia *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, se ha
94 observado que *S. marcescens* presenta resistencia en cantidades menores en comparación con las
95 demás bacterias (16) y (15). Por esta razón, en este estudio se analizó el efecto antimicrobiano
96 sobre las bacterias *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* y *S. marcescens* al ser las bacterias con mayor
97 porcentaje de resistencia en Ecuador.

98

99 (12) advirtió sobre un aumento progresivo de la resistencia de diversas bacterias Gram
100 positivas y Gram negativas, a los antimicrobianos. Según (17), la resistencia a los antibióticos se
101 refiere a la disminución en la eficacia de un medicamento para curar una enfermedad o condición.
102 Estos medicamentos alteran la composición del agente infeccioso, lo que lleva a la adaptación o
103 mutación bacteriana y, a su vez, a la aparición de nuevas cepas que son resistentes al tratamiento
104 antibiótico actual (18). En la última década, se ha observado la aparición de microorganismos
105 resistentes a diversas familias de fármacos, lo que ha llevado a una disminución en el
106 descubrimiento, desarrollo y distribución de nuevas clases de antibióticos, que no se han
107 incorporado al arsenal terapéutico (19). Según (20) desde principios de la década de 1980, ha
108 habido una disminución constante en el número de nuevos antibióticos que se han lanzado al
109 mercado, llegando a solo dos especialidades aprobadas por la FDA para el período comprendido
110 entre 2008 y 2017. Esto se debe a que se ha modificado tanto la estructura química como molecular
111 de los medicamentos para evitar los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias,
112 ampliando así su espectro de acción (21). Teniendo una producción baja, esto se debe a que los
113 regímenes de antibióticos se administran durante períodos de tiempo limitados, lo que los hace
114 menos rentables en comparación con los medicamentos utilizados para tratar enfermedades
115 crónicas (21). Además, los agentes antibacterianos en fase de desarrollo no son suficientes para
116 hacer frente al desafío de la multirresistencia.

117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154

Debido a la creciente resistencia de las bacterias multirresistentes, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *M. tuberculosis*, a los antimicrobianos convencionales (22), se busca encontrar alternativas efectivas para combatir estas bacterias. En los últimos años, los péptidos antimicrobianos (PAM) han captado la atención de la comunidad científica debido a su potencial terapéutico. Estos péptidos son moléculas presentes en la naturaleza y desempeñan un papel importante en el sistema inmunológico innato de varios organismos (23). En particular, los péptidos antimicrobianos derivados de anfibios, como las ranas, han captado la atención de los investigadores debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana y su capacidad para prevenir el desarrollo de resistencia. La piel de las ranas ha demostrado ser una fuente rica en péptidos con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, capaces de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos y prevenir el desarrollo de resistencia (23). En la última década, se han identificado más de 300 péptidos bioactivos con diversas propiedades farmacológicas en las secreciones cutáneas de las ranas, lo que las convierte en una excelente fuente de compuestos terapéuticos (24). Estos péptidos antimicrobianos presentan varias ventajas potenciales, ya que actúan mediante diferentes mecanismos para inducir la muerte celular (25). Estas acciones incluyen la adhesión a la membrana bacteriana, el aumento de su permeabilidad e incluso la lisis celular (26). Estos mecanismos de acción múltiples dificultan el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias (27).

Estudios recientes realizados por (28) y por (29), demuestran que los péptidos Dermaseptinas (DRS) tienen diferentes efectos en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se encontró que el DRP-SP2 tiene actividad contra *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* y *K. pneumoniae*. La acción de las Dermaseptinas está relacionada con su carga, ya que son péptidos antimicrobianos catiónicos y antipáticos que adoptan una estructura α -helicoidal, características que les permiten interactuar con las cargas negativas de la membrana plasmática de los microorganismos (30). A continuación, el péptido altera la permeabilidad de la membrana, ocasionando disrupción y destrucción bacteriana, o entra en el compartimento celular e interactúa con objetivos intracelulares (31).

En este estudio se analizó la actividad de los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10, que son expresados de las glándulas granulares de la piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). Estos péptidos antimicrobianos son generalmente no hemolíticos, contienen de 15 a 45 residuos de aminoácidos (32). En palabras de (33) “su método de acción es a nivel de la membrana, originando poros, separación de fases, disrupción de la membrana lipídica y formación de micelas”. Esta es una de las razones por las cuales los péptidos antimicrobianos son efectivos contra bacterias resistentes a los antibióticos.

155 **Materiales y Métodos**

156

157 **Péptidos**

158

159 Los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10, extraídos del anfibio *Agalychnis*
160 *spurrelli* perteneciente a la familia Hylidae, son péptidos catiónicos de cadena corta que exhiben
161 diferentes efectos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Cada péptido tiene su propia
162 secuencia de aminoácidos y características específicas de peso molecular, pureza y longitud, como
163 se muestra en la Tabla 1.

164

165 **Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10
166 aislados de *Agalychnis spurrelli*

Parámetros	DRS-SP7	DRS-SP10
Longitud	28 aa	26 aa
Peso molecular	3039.46	2589.17
Pureza	81.79%	80.75%

167

168 **Mínima concentración Inhibitoria**

169

170 En este estudio se utilizó la metodología de (34) con modificaciones para analizar y
171 determinar la sensibilidad de las bacterias frente a los péptidos sintéticos Dermaseptina sp7 (DRS
172 SP7) y Dermaseptina sp10 (DRS SP10). El procedimiento para determinar la Mínima
173 Concentración Inhibitoria (MIC) se divide en cuatro fases:

174

175 **Preparación de aislados bacterianos:** La reactivación de cepas bacterianas de *S. aureus*
176 resistente a la oxacilina (C-ORSA), *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido
177 (BLEE), *K. pneumoniae* portadora del gen KPC (*K. pneumoniae* carbapenemasa) y *S. marcescens*;
178 Para esto, se tomaron 20-30 µl de cada bacteria multirresistente y se colocaron en un tubo Falcon
179 de 15 ml que contenía 10 ml de medio Mueller-Hinton Broth (MHB). Luego, se incubó a 37 °C
180 durante 24 horas. Después de este tiempo, se tomaron 2 ml de la bacteria reactivada y se
181 transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml, el cual se debe ajustar a una escala de 0.5 en la escala de
182 McFarland. A continuación, se diluyeron 200 µl de la bacteria en 19.8 ml de MHB.

183

184 **Preparación del péptido:** Se analizaron 10 concentraciones distintas de los péptidos (512,
185 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 µg/ml), para lo cual se pesó 1,5 mg para la concertación más alta
186 y se diluyó en 30 µl de DMSO, mientras que en los demás tubos se colocaron 15 µl de DMSO. Se
187 realizaron nueve diluciones seriadas de todas las concentraciones, y se utilizó el vortex y el spin
188 después de cada dilución para obtener una mezcla más homogénea del péptido y el DMSO.

189

190 **Realización de los ensayos:** En la placa de 96 pocillos, se agregaron 2 µl de las 10 diluciones
191 del péptido y 198 µl de la bacteria diluida en los siete pocillos designados (A, B, C, D, F, G y H).
192 Se incluyeron dos controles: uno negativo (con 200 µl de MHB) y otro positivo (con 2 µl de DMSO
193 y 198 µl de la bacteria diluida). Se realizaron siete repeticiones por triplicado de cada ensayo para
194 constatar la repetitividad y reproducibilidad.

195
196 **Lectura de los resultados:** Se utilizó el lector de placas a 570-600 nm, el cual permitió
197 obtener los datos correspondientes a la inhibición de la bacteria en cada una de las concentraciones,
198 para determinar el MIC y su posterior análisis estadístico.

199

200 **Prueba hemolítica**

201

202 Para este estudio se utilizó la prueba hemolítica de (34), se colocó 15 ml de sangre de
203 caballo en un tubo cónico de 50 ml, el cual se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos.
204 Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se agregó 5 ml de solución salina tamponada con
205 fosfato (PBS), mezclando suavemente. Se realizaron tres centrifugaciones a 1000 rpm durante 5
206 minutos, repitiendo el lavado hasta que el sobrenadante esté claro. Después del lavado, se mezcló
207 1 ml de RBC con 19 ml de PBS para obtener 50 ml de una solución al 5%.

208

209 Se pesó 1,5 mg de péptido, con el cual se prepararon diluciones en serie (1 µg/ml, 2 µg/ml,
210 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml y 512 µg/ml) en PBS
211 estéril; esto se realizó por duplicado. En un tubo de 1,5 ml se añadió 200 µl de solución peptídica
212 más 200 µl de solución de RBC al 4%. Se realizaron 5 repeticiones por concentración de péptido.
213 Se tendrán 2 controles: por un lado, el primero será el positivo con 195 µl de solución de RBC al
214 4% con 5 µl de Triton X-100; por otro lado, el segundo será el negativo con 200 µl de PBS. A
215 todos los tubos se les incubará a 37°C durante 120 minutos. Posteriormente, se centrifugarán a
216 1000 rfc por 5 minutos.

217
218 Por último, se transfirió 200 µl de cada sobrenadante obtenido de las concentraciones a una
219 placa de 96 pocillos. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Biotek
220 y se calculó el porcentaje de hemólisis.

221

222 Para obtener el % de hemolisis se utilizó la fórmula

223

$$224 \quad \%hemolisis = \frac{(A - AO)}{(AX - AO)} * 100$$

225

226 Donde A es la densidad óptica de la solución peptídica, AO es la lectura del control
227 negativo y AX la lectura del control positivo.

228 **Resultados**

229

230 **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

231

232 Los resultados experimentales revelan que los péptidos Dermaseptina SP7 (DRS SP7) y
233 Dermaseptina SP10 (DRS SP10) presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana, ya que
234 son efectivos contra la bacterias Gram negativa *E. coli* y como contra la bacteria Gram positiva *S.*
235 *aureus*. Se observó que ambos péptidos tienen una Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de 32
236 $\mu\text{g/ml}$ y 64 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, lo que indica que son capaces de inhibir el crecimiento de
237 estas bacterias a concentraciones relativamente bajas.

238

239 Además, es importante destacar que tanto DRS SP7 como DRS SP10 exhibieron actividad
240 bactericida a las mismas concentraciones que mostraron su poder inhibitorio. Esto significa que
241 no solo son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, sino que también son capaces de matar
242 efectivamente a las bacterias objetivo.

243

244 Por otro lado, ninguno de los dos péptidos mostró actividad inhibitoria frente a las bacterias
245 *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, ni actividad bactericida.

246

247 Estos hallazgos son respaldados por los valores del MIC (Concentración Inhibitoria
248 Mínima) obtenidos en las tres repeticiones de los péptidos DRS SP7 y DRS SP10 sobre las cuatro
249 bacterias estudiadas, como se muestra en la tabla 2.

250

251 **Tabla 2.** Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 en tres
 252 diferentes repeticiones de las cuatro bacterias analizadas.

Bacterias	MIC µg/ml					
	Dermaseptina SP7			Dermaseptina SP10		
	1	2	3	1	2	3
<i>E. coli</i> (BLEE).	32	32	32	32	32	32
<i>S. aureus</i> (C-ORSA)	64	64	64	64	64	64
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-

253

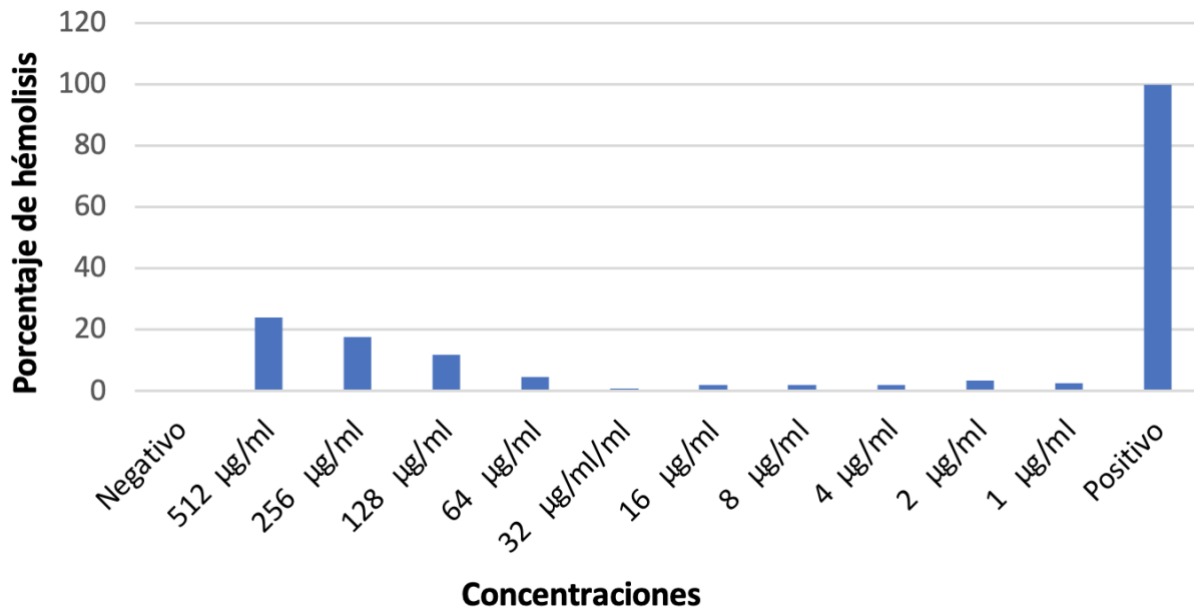
254 Prueba hemolítica

255

256 Los resultados obtenidos en este estudio revelan que los péptidos Dermaseptina SP7 y
 257 Dermaseptina SP10 presentan una muy baja toxicidad contra los glóbulos rojos. En la Figura 1-2
 258 y Tabla 3-4 se puede observar que a concentraciones de 32 µg/ml y 64 µg/ml, respectivamente,
 259 los porcentajes de actividad hemolítica fueron del 0.84% y 0.22%. Esto demuestra que las
 260 Dermaseptinas no causan lisis de los glóbulos rojos a concentraciones correspondientes a su
 261 Concentración Inhibitoria Mínima (MIC).

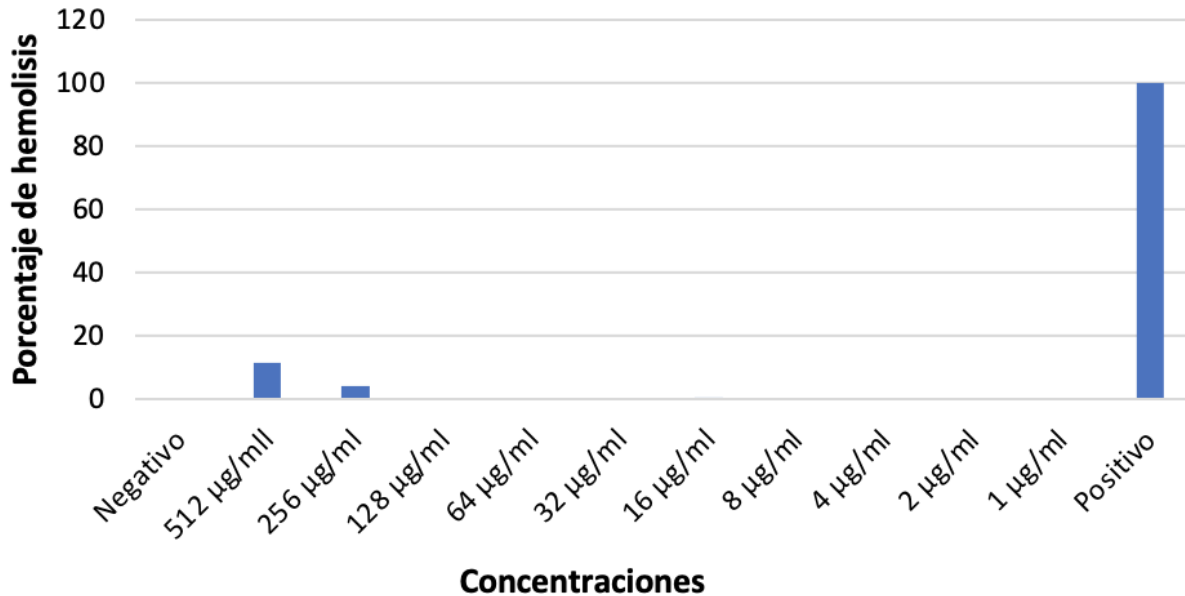
262

263 **Figura 1.** Concentraciones de la actividad hemolítica de Dermaseptina SP10 de *Agalychnis spurelli*.



264

265 **Figura 2.** Concentraciones de la actividad hemolítica de Dermaseptina SP10 de *Agalychnis spurelli*.



266 **Tabla 3.** Porcentaje de hemolisis de todas las concentraciones del péptido DRS-SP10

	Concentraciones µg/ml									
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Actividad hemolítica	26.43	17.48	11.70	4.61	0.84	1.86	2.00	2.02	3.29	2,58

268 **Tabla 4.** Porcentaje de hemolisis de todas las concentraciones del péptido DRS-SP7

	Concentraciones µg/ml									
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Actividad hemolítica	11.39	4.28	0.09	0.02	0.04	0.46	0.26	0.05	0.15	0.28

271 **Discusión de resultados**

273 **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

274 Las glándulas granulares de las ranas son responsables de la producción de diversos
 275 péptidos, algunos de los cuales han mostrado un amplio espectro de acción con posibles
 276 aplicaciones biomédicas (35). Las Dermaseptinas son ejemplos de estos péptidos con potencial
 277 antimicrobiano.
 278

280 En los estudios realizados por (29) y (28), se encontró que el péptido DRS-SP2 presenta
281 actividad inhibitoria contra bacterias como *E. coli*, *S. aureus* resistente a la oxacilina y *K.*
282 *pneumoniae*. En comparación, los péptidos DRS-SP3, DRS-SP4 y DRS-SP5 no presentan una
283 acción determinada o muestran una baja actividad antimicrobiana. Es importante destacar que los
284 péptidos Dermaseptina SP2, Dermaseptina SP3, Dermaseptina SP4, Dermaseptina SP6,
285 Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 pertenecen a la misma familia de péptidos
286 antimicrobianos obtenidos de la piel de la rana *Agalychnis spurrelli*. Estos péptidos comparten
287 características estructurales y propiedades fisicoquímicas similares que les confieren la capacidad
288 de ejercer una acción antimicrobiana contra bacterias (32).

289
290 Factores como la carga neta, la hidrofobicidad y la secuencia de aminoácidos de cada
291 péptido pueden influir en su interacción con las membranas bacterianas y, por lo tanto, en su
292 capacidad para ejercer su acción antimicrobiana (36). El estudio de Proaño-Bolaños 2019, se
293 comparó cuatro péptidos Dermaseptinas (DRS-SP2, DRS-SP3, DRS-SP4 y DRS-SP5), y se
294 observó que, a pesar de tener una hidrofobicidad similar, cada uno mostraba diferentes cargas.
295 DRS-SP2, con una carga de +4, exhibió una mayor actividad antimicrobiana en comparación con
296 los otros cuatro péptidos.

297
298 En palabras de (37) “la capacidad de un péptido para asociarse con una región específica
299 de la membrana o atravesarla está determinada por las características fisicoquímicas del péptido y
300 por la composición de la bicapa lipídica de la bacteria objetivo”. Por lo tanto, las diferencias en las
301 propiedades fisicoquímicas de cada péptido pueden influir en su capacidad para interactuar con las
302 membranas bacterianas y ejercer su efecto antimicrobiano.

303
304 La Dermaseptina SP7 y la Dermaseptina SP10 exhiben una mayor potencia antimicrobiana
305 en comparación con las Dermaseptinas SP3, SP4 y SP5, como se evidencia por sus valores más
306 bajos de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC). Estos hallazgos sugieren que la Dermaseptina
307 SP7 y la Dermaseptina SP10 tienen una mayor afinidad y efectividad en la interacción con las
308 membranas bacterianas, lo que resulta en una mayor actividad antimicrobiana a concentraciones
309 más bajas. Por otro lado, es importante mencionar que las Dermaseptinas SP7 y SP10 muestran un
310 MIC ligeramente superior en comparación con la Dermaseptina SP2. Esto sugiere que la
311 Dermaseptina SP2 puede tener un poder inhibitorio sutilmente superior frente a las bacterias
312 objetivo en comparación con las otras dos Dermaseptinas.

313
314 El resultado de la actividad antimicrobiana contra *K. pneumoniae*, se encontró que la
315 Dermaseptina SP2 es el único péptido que mostró actividad antimicrobiana con un MIC bajo en
316 comparación con los otros péptidos (Dermaseptina SP3, Dermaseptina SP4, Dermaseptina SP7 y
317 Dermaseptina SP10). Esto indica que la Dermaseptina SP2 es más efectiva en la inhibición de esta
318 bacteria en particular.

319 En resumen, los resultados demuestran que los péptidos Dermaseptinas SP7 y SP10, así
 320 como la Dermaseptina SP2, son eficaces en la inhibición de las bacterias objetivo. Estos hallazgos
 321 se reflejan en los valores del Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de cada péptido, los cuales
 322 se encuentran resumidos en la tabla 5. Se observa que las Dermaseptinas SP7, SP10 y SP2
 323 muestran una mayor eficacia en la inhibición de las bacterias en comparación con las
 324 Dermaseptinas SP5, SP3 y SP4. Esta información esta respalda por los estudios de (29) y (28).

325
 326
 327

Tabla 5. Comparación del MIC de las seis Dermaseptinas.

Bacterias	MIC					
	DRS SP2	DRS SP3	DRS SP4	DRS SP5	DRS SP7	DRS SP10
<i>E. coli</i>	8	128	128	256	32	32
<i>S. aureus</i> (C-ORSA)	8	512	512	>512	64	64
<i>K. pneumoniae</i>	32	>512	>512	>512	-	-

328
 329
 330
 331
 332
 333
 334

Es relevante destacar la capacidad de los péptidos Dermaseptina SP7 y SP10 para inhibir de manera efectiva a las bacterias *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones tan bajas como 32 µg/ml y 64 µg/ml, respectivamente. Estos resultados demuestran la efectividad de los péptidos como agentes antimicrobianos y respaldan su posible aplicación en el desarrollo de nuevas terapias contra infecciones bacterianas.

335
 336
 337
 338
 339
 340
 341

Los péptidos antimicrobianos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 demostraron tener una potente actividad bactericida contra *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones de 32 µg/ml y 64 µg/ml, respectivamente. Esto significa que son capaces de matar eficazmente estas bacterias objetivo. Según la literatura científica, las Dermaseptinas SP7 y SP10 actúan generando poros en la membrana celular, lo que provoca la separación de fases, la disrupción de la membrana lipídica y la formación de micelas. Estos mecanismos de acción son responsables de su actividad bactericida y les permiten atacar de manera efectiva a las bacterias (30).

342
 343
 344
 345
 346
 347
 348

Los resultados obtenidos en los ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) indican que los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 no presentan actividad antimicrobiana definida contra *S. marcescens*, ya que se obtuvo un valor de MIC mayor a 512 µg/ml. Estos resultados concuerdan con la literatura existente del Laboratorio de Investigación en Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA), que indica que ningún péptido de *Agalychnis spurrelli* ha demostrado capacidad de inhibir la actividad antimicrobiana de *S. marcescens*.

349
 350
 351
 352
 353

Sin embargo, es importante mencionar un estudio realizado por (38) en el cual se investigó la capacidad inhibidora del crecimiento de *S. marcescens* por la secreción cutánea total de un anuro perteneciente a la familia Bufonidae, género *Atelopus*. Los resultados de dicho estudio revelaron que la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) necesaria para inhibir el crecimiento de esta

354 bacteria fue de 125.0 µg/ml. Estos hallazgos resaltan la capacidad antimicrobiana de la piel de esta
355 especie de anuro en particular y sugieren que podría contener compuestos bioactivos con potencial
356 actividad antimicrobiana contra *S. marcescens*.

357
358 En línea con los resultados reportados por (39) se ha observado que las proteínas
359 bacterianas secretadas, como las proteasas, constituyen uno de los primeros mecanismos de
360 defensa que encuentran los péptidos antimicrobianos al interactuar con las bacterias. La
361 degradación proteolítica de los péptidos antimicrobianos por enzimas extracelulares representa una
362 estrategia eficiente utilizada por los microorganismos para desarrollar resistencia frente a estos
363 péptidos. Este mecanismo podría brindar una explicación del por qué los péptidos Dermaseptina
364 SP7 y Dermaseptina SP10 no mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. marcescens* en los
365 resultados obtenidos en este estudio.

366

367 **Prueba de hemolítica**

368

369 Idealmente, los ensayos de prueba hemolítica deben demostrar una baja toxicidad contra
370 las células sanguíneas y, al mismo tiempo, actuar selectivamente contra células bacterianas u otros
371 patógenos sin afectar negativamente las células normales. Es de crucial importancia confirmar que
372 los péptidos no sean hemolíticos y que solo ejerzan su efecto antimicrobiano sobre bacterias,
373 parásitos o virus, minimizando cualquier daño potencial a las células del huésped.

374

375 Los resultados de este estudio indican que la Dermaseptina SP10 y la Dermaseptina SP7,
376 exhiben una actividad hemolítica extremadamente baja, a una concentración de 16 µg/ml, la
377 Dermaseptina SP10 mostró un porcentaje de actividad hemolítica del 0.84%, mientras que la
378 Dermaseptina SP7 mostró un porcentaje de actividad hemolítica del 0.02% a una concentración
379 de 64 µg/ml. Estos valores son significativamente inferiores a los observados en otros péptidos,
380 como la Dermaseptina S1, que demostró un efecto citotóxico importante en los glóbulos rojos,
381 produciendo un 80% de lisis a una concentración de 25 µg/ml (40), y las Dermaseptinas SP2, SP3,
382 SP4 y SP5, que mostraron una actividad hemolítica significativamente citotóxica a
383 concentraciones de 512 µg/ml (29).

384

385 Los valores de actividad hemolítica obtenidos y resumidos en la tabla 6 respaldan los
386 hallazgos anteriores y sugieren que la Dermaseptina SP10 y la Dermaseptina SP7 tienen un menor
387 impacto en la lisis de los eritrocitos en comparación con a las otras Dermaseptinas evaluadas. Estos
388 resultados indican que, a concentraciones correspondientes a su actividad antimicrobiana, las
389 Dermaseptinas SP10 y SP7 presentan una actividad hemolítica extremadamente baja.

390

391 **Tabla 6.** Comparación de del porcentaje de la actividad hemolítica en seis Dermaseptinas.

Péptidos	% de actividad hemolítica
DRS-S1	80
DRS-SP2	512
DRS-SP3	512
DRS-SP4	512
DRS-SP5	512
DRS-SP7	0.02
DRS-SP10	0.84

392

393 Estos hallazgos sugieren que las Dermaseptina SP10 y Dermaseptina SP7 podrían tener un
394 perfil de actividad hemolítica más favorable en comparación con otros péptidos, además es
395 importante destacar que los diferentes péptidos de la familia Dermaseptina pueden presentar
396 variaciones en su actividad hemolítica debido a sus propiedades estructurales y composición
397 aminoacídica (41). Los péptidos antimicrobianos interactúan con las membranas de las células
398 sanguíneas y pueden causar la lisis de los eritrocitos, situación que, para los dos péptidos
399 analizados en este estudio, no se cumple.

400 **Conclusiones**

401

402 Los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 exhibieron una alta actividad
403 inhibitoria frente a las bacterias Gram negativa *E. coli* y Gram positiva *S. aureus*, ambas conocidas
404 por su resistencia multirresistente. Estos resultados indican que los péptidos tienen un potencial
405 significativo como alternativas eficaces para combatir la resistencia antimicrobiana. Su capacidad
406 para inhibir el crecimiento de estas bacterias a concentraciones bajas, reflejado por su baja
407 Concentración Inhibitoria Mínima (MIC), además mostraron tener una actividad bactericida a las
408 mismas concentraciones del MIC, lo que indican que no solo pueden inhibir su actividad
409 antimicrobiana si no también matarla.

410

411 Los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10, no mostraron una actividad
412 inhibitoria frente a las bacterias *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, esto puede deberse a que algunas
413 bacterias secretan enzimas y proteínas que impiden la acción de los péptidos hacia la membrana
414 de las bacterias, sin embargo, puede que diferentes concentraciones del péptido este si pueda tener
415 un efecto positivo sobre estas bacterias multirresistentes.

416

417 Las Dermaseptinas SP7 y Dermaseptina SP10 exhiben una actividad hemolítica
418 extremadamente baja, con porcentajes inferiores al 1%. Estos valores indican que estos péptidos
419 tienen una mínima capacidad de ser citotóxicos o de causar lisis en las células, específicamente en
420 los glóbulos rojos.

421

422 En conclusión, los péptidos Dermaseptina SP7 y Dermaseptina SP10 han mostrado una
423 notable actividad inhibitoria contra *E. coli* y *S. aureus*, además, su baja actividad hemolítica
424 representa una ventaja adicional, ya que no causan lisis de las células sanguíneas. Estas
425 características los vuelve candidatos prometedores para ser utilizados como principios activos en
426 el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para controlar la resistencia multirresistente en
427 estas bacterias.
428

429 **Agradecimientos**

430
431 Agradezco sinceramente a Mateo Salazar por su valioso apoyo y guía constante en el
432 desarrollo de esta investigación. Su conocimiento y experiencia fueron fundamentales para
433 alcanzar los objetivos planteados. También quiero expresar mi agradecimiento a la Mtr. Myriam
434 Rivera por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo en el Laboratorio de
435 Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA). Su mentoría y liderazgo fueron
436 indispensables para el éxito de este proyecto. Asimismo, quiero agradecer a la Pontificia
437 Universidad Católica del Ecuador por proporcionar el financiamiento necesario para llevar a
438 cabo esta investigación.

439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484

Referencias

1. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013 Dec;13(12):1057–98.
2. CARMEN TORRES. LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS, SIETE DÉCADAS DESPUÉS DE FLEMING [Internet]. ACADEMIA DE FARMACIA “REINO DE ARAGÓN.” 2012 [cited 2023 May 7]. Available from: <https://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>
3. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*. 2012 Mar 22;25(2):67–77.
4. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Nov;78:3–13.
5. Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Jan;32(1):23–37.
6. Vanegas Múnera JM, Jiménez Quiceno JN. Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica? *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2020 Feb 13;38(1):1–6.
7. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009 [cited 2023 May 7];7(9):629. Available from: [/pmc/articles/PMC2871281/](https://doi.org/10.1038/nrmicro1281)
8. Oliver A, Cantón R. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. *Control Calidad Seimc*. 2016;
9. Ardite JA. RESISTENCIA A LA VANCOMICINA EN EL GÉNERO *Enterococcus*.
10. Gómez-Tangarife VJ, Gómez-Restrepo AJ, Robledo-Restrepo J, Hernández-Sarmiento JM, Bacterióloga V., Clínico LMS. Resistencia a Medicamentos en *Mycobacterium tuberculosis*: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: contribution of constituent and acquired mechanisms Revisión / Review. *Rev Salud Pública* [Internet]. 2018 [cited 2023 May 9];20(4):491–7. Available from: <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.50575>
11. Edgar Herrera, Diego Andrade, Yessenia Reinoso. Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*, Ecuador | *Revista Vive*. *Revista de Investigación en Salud* [Internet]. 2021 Sep 8 [cited 2023 May 7];4(12):470–83. Available from: <https://revistavive.org/index.php/revistavive/article/view/125/424>
12. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. 2020.
13. Achmad Ali Fikri, Syamsul Arifin MFF. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. *World Health Organization*. 2022;2(8.5.2017):2003–5.
14. L Murray CJ, Shunji Ikuta K, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. 2022 [cited 2023 Jun 3]; Available from: <https://doi.org/10.1016/>
15. Ministerio de Salud Pública. Resistencia antimicrobiana. 2018.
16. Tusa D, Gualpam G, Echeverría I. Indicators of antimicrobial resistance in the intensive care unit of a hospital in Quito, Ecuador. *Magazine INSPILIP*. 2021;5(2).

- 485 17. Loke MF, Hanafi A. Molecular Mechanisms Responsible for Drug Resistance.
486 Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics. 2019
487 Jan 1;1–3:926–31.
- 488 18. Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. StatPearls [Internet]. 2022 Jun 23 [cited
489 2023 May 9]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- 490 19. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Medicin*
491 *Chem*. 2014 Jan 28;6:PMC.S14459.
- 492 20. Duval RE, Grare M, Demoré B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need
493 New Antibacterials but for Right Bacteria. *Molecules* [Internet]. 2019 Aug 29 [cited 2023
494 May 7];24(17):31–52. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/17/3152/htm>
- 495 21. Brandt C, Makarewicz O, Fischer T, Stein C, Pfeifer Y, Werner G, et al. The bigger picture:
496 The history of antibiotics and antimicrobial resistance displayed by scientometric data. *Int*
497 *J Antimicrob Agents*. 2014 Nov;44(5):424–30.
- 498 22. Achmad Ali Fikri, Syamsul Arifin MFF. Global Antimicrobial Resistance and Use
499 Surveillance System (GLASS) Report 2022. World Health Organization.
500 2022;2(8.5.2017):2003–5.
- 501 23. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application
502 and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020 Oct 16;11:2559.
- 503 24. Lacombe C, Piesse C, Sagan S, Combadière C, Rosenstein Y, Auvynet C. Pachymodulin, a
504 New Functional Formyl Peptide Receptor 2 Peptidic Ligand Isolated from Frog Skin Has
505 Janus-like Immunomodulatory Capacities. *J Med Chem*. 2015 Feb 12;58(3):1089–99.
- 506 25. Conlon JM. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog
507 skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011 Jul 11;68(13):2303–15.
- 508 26. Marani MM, Dourado FS, Quelemes PV, de Araujo AR, Perfeito MLG, Barbosa EA, et al.
509 Characterization and Biological Activities of Ocellatin Peptides from the Skin Secretion of
510 the Frog *Leptodactylus pustulatus*. *J Nat Prod*. 2015 Jul 24;78(7):1495–504.
- 511 27. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and
512 Recent Applications. *Protein Pept Lett* [Internet]. 2020 Aug 23 [cited 2023 May 7];27(1):4–
513 16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31438824/>
- 514 28. Cuesta S, Gallegos F, Arias J, Pilaquina F, Blasco-Zúñiga A, Proaño-Bolaños C, et al.
515 Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog
516 *Agalychnis spurrelli*. *J Mol Model*. 2019 Sep 17;25(9):260.
- 517 29. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida J, Wang L, Llumiquinga MA, Rivera M, et
518 al. Unravelling the Skin Secretion Peptides of the Gliding Leaf Frog, *Agalychnis spurrelli*
519 (Hylidae). *Biomolecules*. 2019;9(11).
- 520 30. Zasloff M, Martin B, Chen HC. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and
521 several analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1988 Feb
522 1 [cited 2023 May 9];85(3):910–3. Available from:
523 <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.85.3.910>
- 524 31. Bartels EJH, Dekker D, Amiche M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides:
525 A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future
526 directions. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 9];10. Available from:
527 [/pmc/articles/PMC6901996/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01996/full)
- 528 32. Vargas A, Pérez O, Ortega D, Rivera M. Caracterización molecular de péptidos
529 antimicrobianos a partir de muestras de piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). .
530 *REMCB*. 2015;36(2).

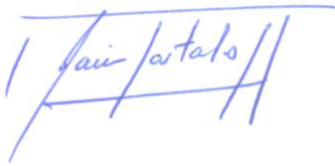
- 531 33. Marsh ENG, Buer BC, Ramamoorthy A. Fluorine—a new element in the design of
532 membrane-active peptides. *Mol Biosyst.* 2009;5(10):1143.
- 533 34. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach
534 identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf
535 frog, *Cruziophyla calcarifer*. *J Proteomics.* 2016 Sep;146:1–13.
- 536 35. Conlon JM, Sonnevend A. Clinical Applications of Amphibian Antimicrobial Peptides.
537 *Journal of Medical Sciences.* 2011;4(2):62–72.
- 538 36. Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure
539 prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics.*
540 1995;11(6):681–4.
- 541 37. Pirtskhalava M, Vishnepolsky B, Grigolava M, Managadze G. Physicochemical Features
542 and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals.* 2021 May
543 17;14(5):471.
- 544 38. Cilveti C, Rivera M, Rodríguez M, Alcocer I. Inhibición de enterobacterias portadoras de
545 carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos. *Revista*
546 *Ecuatoriana de MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS.* 2013;
- 547 39. Joo HS, Fu CI, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides.
548 *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences [Internet].* 2016
549 May 5 [cited 2023 May 10];371(1695). Available from: /pmc/articles/PMC4874390/
- 550 40. Rudi JM, Müller DM, Siano A, Simonetta AC, Tonarelli GG. Péptido Antimicrobiano
551 Quimérico de Dermaseptina-S1 y Tigerinina-1: Estructura Secundaria y Selectividad hacia
552 Membranas. *FABICIB.* 2010 Dec 13;14:148–61.
- 553 41. Mor A, Nicolas P. The NH2-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is
554 responsible for antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry.* 1994
555 Jan;269(3):1934–9.
- 556
557

Firme de la estudiante y fecha



Camila Micaela Nuñez Santana
Quito, 16 de junio de 2023

Firma del director de disertación y fecha



Jaime Alfredo Costales Cordero, PhD
Quito, 16 de junio de 2023

Firma de la coordinadora de la carrera y fecha

Sonia Margarita Estrella Vásquez
Quito, 16 de junio de 2023

Firma del decano y fecha

Diego Guevara
Quito, 16 de junio de 2023