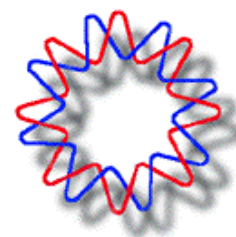




**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNAM**



**“ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS COMPONENTES
BIOACTIVOS DE LA SECRECIÓN DE LA PIEL DEL ANFIBIO
LITHOBATES SPECTABILIS Y SUS APLICACIONES EN
MEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA”**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**QUÍMICO INDUSTRIAL
GRISELDA DEMESA BALDERRAMA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CESAR VICENTE FERREIRA BATISTA

CUERNAVACA, MOR.

Noviembre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Trabajo realizado en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista. Con apoyo del proyecto PAPIIT IN221508-3 y con apoyo de una beca para estudios de maestría del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Cruz Demesa y Cecilia Balderrama, por la oportunidad de existir, por su sacrificio y por el apoyo que me han dado durante toda la vida.

A mis hermanos, Liliana, Fátima, Orlando y Azucena, por su amor y admiración, porque aunque hay momentos de diferencias, sé que siempre estarán conmigo.

Al Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista, por permitirme ser parte de su grupo, por sus consejos, paciencia y ayuda que sirvieron para realizar este trabajo.

A Gertjan, a quien quiero y admiro profundamente, que me enseñó que no hay límites y que lo que me proponga lo puedo lograr. Gracias por ser parte de mi vida.

A mis amigos del laboratorio, Erika, Lorena, Valeria, Emmanuel, Miriam y Luis Alberto, por su apoyo y amistad durante el lapso de la maestría. No voy a olvidar los momentos compartidos.

Al laboratorio del Dr. Domingos Lourival Possani, por permitirme hacer uso de sus equipos.

Al Dr. Rubén Castro Franco y al Biol. Carlos Huidobro por colaborar en la captura e identificación de las ranas

A la Dra. Victoria Pando Robles, Dra. María del Carmen Rodríguez, por la realización de una parte de las pruebas para este trabajo.

Al Instituto de Biotecnología y todo su personal, por abrir sus puertas y brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad durante la realización de la maestría.

Al PAPIIT por la ayuda brindada para la realización del proyecto IN221508-3

Al CONACYT por la beca otorgado durante la realización de la maestría.

Al comité tutorial y al jurado revisor por las sugerencias y contribuciones que para este trabajo hicieron.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN

Las secreciones de la piel de anfibios son una fuente natural de compuestos donde se encuentran una enorme diversidad de moléculas, entre ellas los péptidos bioactivos. Estos se dividen en dos tipos, el primero lo conforman los péptidos que presentan actividad antimicrobiana y el segundo está formado por péptidos que tienen funciones regulatorias u hormonales. Los más estudiados son los péptidos antimicrobianos (PAMs), que pertenecen al sistema inmune innato tienen un papel crucial para combatir las infecciones. Estos elementos de la inmunidad innata han sido detectados en todos los animales, vertebrados e invertebrados con ligeras variaciones. Aunque el espectro de actividad parece ser reducido es lo suficientemente eficiente para combatir a la mayoría de microorganismos. Los PAMs pueden servir para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para combatir enfermedades producidas por microorganismos resistentes.

Este trabajo estudia la secreción de la piel de la rana endémica de México *Lithobates spectabilis* en busca de péptidos bioactivos. Se siguió una metodología de determinación de las masas de los componentes presentes en la secreción por medio de un sistema LC-MS, aislamiento de los componentes de interés a través de RP-HPLC, secuenciación de los péptidos con espectrometría de masas y ensayos antibacterianos, antiparasitarios y contra células cancerosas.

Se reporta la secuencia completa de 4 PAMs y 3 péptidos de anfibios relacionados a bradicininas así como actividad antibacteriana, antiparasitaria y anticancerígena de Ls-3. Se determinó la huella digital de las masas moleculares presentes en la secreción y de manera general el tipo de péptidos y proteínas que contiene. También se establece que la secreción de la rana *L. spectabilis* puede poseer proteasas.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1. Moléculas en la secreción de anfibios	5
2.2. Péptidos antimicrobianos	7
2.3. Estructura y regulación de los genes de péptidos antimicrobianos	9
2.4. Clasificación de péptidos antimicrobianos	10
2.5. Mecanismo de acción propuesto para péptidos antimicrobianos que contienen hélices alfa	12
2.6. Péptidos antimicrobianos en anfibios	15
2.7. Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos de anfibios	16
2.8. Péptidos antimicrobianos de la familia Ranidae	21
2.9. <i>Lithobates spectabilis</i>	23
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	25
5. Metodología experimental	26
5.1. Captura, catalogación e identificación de los especímenes	26
5.2. Extracción de las secreciones cutáneas	26
5.3. Preparación de las muestra	27
5.4. Purificación de péptidos	27
5.5. Determinación de masas moleculares	27
5.6. Secuenciación de péptidos	28
5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida	30
5.8. Síntesis del péptido Ls-4	30
5.9. Ensayos antibacterianos	31
5.10. Ensayos antiparasitarios	31
5.11. Ensayos de citotoxicidad contra células cancerosas y monocitos humanos	32
6. Resultados	34
6.1. Fraccionamiento del extracto total	34
6.2. Caracterización estructural	35
6.3. Determinación de las masas moleculares de la secreción de la rana <i>Lithobates spectabilis</i> .	40
6.4. Caracterización estructural por el sistema LC-MS	42
6.5. Secreción de la rana con inhibidor de proteasas	45
6.6. Proteínas presentes en la secreción de la rana	49

6.7. Búsqueda de similitud de secuencia	51
6.8. Síntesis del péptido Ls-4	52
6.9. Ensayos antibacterianos	54
6.10. Ensayos antiparasitarios	56
6.11. Ensayos de citotoxicidad contra células de cáncer y monocitos	57
7. Discusión	58
8. Conclusiones	68
9. Perspectivas	69
Abreviaturas	70
Listas	71
Referencias	73

1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos estamos expuestos a diversas especies microbianas, y aunque la gran mayoría de estos microbios son inofensivos o beneficiosos, algunos provocan enfermedades infecciosas y el efecto de estas infecciones en algunos casos puede ser mortal. Tan es así que las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte en todo el mundo, según datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) [1]. Gracias a los antibióticos, muchas enfermedades infecciosas pueden ser tratadas, sin embargo un grave problema a nivel de salud pública es el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos. La resistencia de los microorganismos, adquirida frente a los antimicrobianos convencionales, se debe a diferentes factores como la impermeabilidad de la pared celular, al eflujo, a la formación de biofilmes y a la expresión de genes mediada por la inactivación de enzimas. También puede ser originada por la adquisición de DNA extracelular, el cual puede ser expresado como factor de eflujo, modificación o adquisición de sitios de pegado e inhibición enzimática de los antibióticos [2].

En consecuencia, hay una creciente necesidad de identificar nuevos agentes antimicrobianos, con un énfasis particular en bacterias multirresistentes y patógenos emergentes.

El descubrimiento de productos naturales que pueden servir para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos brinda esperanzas para combatir enfermedades producidas por microorganismos resistentes. Estos nuevos agentes pueden ser encontrados estudiando la respuesta inmune innata, en este mecanismo participan moléculas que son las primeras en reconocer e intentar la destrucción de las partículas extrañas.

Se llama innata porque las células que participan están activas en el cuerpo antes de que los invasores aparezcan. Todos los animales poseen un mecanismo de defensa de este tipo, el cual se cree es la más antigua forma de inmunidad [3]. La respuesta inmune innata está representada por barreras físicas, químicas y biológicas; células especializadas y moléculas solubles. Los principales componentes del sistema inmune innato incluyen elementos celulares y humorales, cada uno de los cuales es dotado con armas aferentes y eferentes.

Componentes celulares

En vertebrados, la inmunidad innata es ampliamente dependiente de células mieloides: inmunocitos profesionales que tragan y destruyen patógenos. Las células mieloides incluyen fagocitos mononucleares y fagocitos polimorfonucleares. Los fagocitos mononucleares son los macrófagos, derivados de monocitos sanguíneos, y relacionados a células dendríticas, también de origen monocito, los cuales son altamente eficientes en presentar antígenos a las células T del sistema inmune adaptativo. Los macrófagos son capaces de tragar y matar microorganismos, pero las funciones más importantes son supervisar. A través de la elaboración de citoquinas quimiotácticas, ellas reclutan otras células mieloides, y en particular fagocitos polimorfonucleares, al sitio de la infección.

Los fagocitos polimorfonucleares (los cuales incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos) son importantes en la contención de la infección. Los neutrófilos en particular, son asesinos especializados, dotados con una amplia variedad de armas con las cuales destruyen a su presa [4].

Estos mecanismos son activados por estímulos, representados por moléculas comúnmente encontradas en la superficie de microorganismos como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-, glicolípidos de

micobacterias, el ácido lipoteicoico de bacterias Gram +, B-glucanos de levaduras y dobles cadenas de RNA virales constituyen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y activan la respuesta inmune innata por la interacción con diferentes receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) [5].

Componentes humorales

En este tipo de respuesta innata las moléculas que sensan a los microorganismos no son necesariamente las mismas que los matan. El contacto directo y específico entre microorganismos y moléculas del huésped es llevado a cabo por muchas moléculas diferentes. Las moléculas que participan en el reconocimiento del patógeno incluyen: proteínas de unión a manosa, reconocen residuos de manosil terminal presentes en la superficie de numerosos microorganismos. Otros miembros de la familia de proteínas de unión a manosa, globalmente conocidas como colectinas, pueden reconocer otros determinantes microbianos y así permitir el reconocimiento temprano de microorganismos. La proteína de unión a lipopolisacárido y CD14, también reconoce microorganismos en el compartimento extracelular. La proteína C-reactiva, y otros miembros de la familia pentraxina, también se unen a microorganismos, presumiblemente a través de interacciones tipo lectina [6].

Los elementos encargados de matar microorganismos no son células, ya estas no son requeridas para todas las reacciones de la inmunidad innata, proteínas y otras moléculas son suficientes para matar microorganismos que aun no han sido tragados por células. Entre estas se encuentra la lisozima encontrada en secreciones nasales y otras, destruye la pared de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo a través de mecanismos enzimáticos. La lactoferrina afecta la motilidad de ciertas bacterias y su capacidad para formar biofilmes y puede ayudar a su eliminación. Las

proteínas del complemento, son un conjunto de enzimas proteolíticas, puede ser activado por tres vías separadas, cada una de las cuales puede ser activada por la presencia de microorganismos. La activación del complemento lleva a: 1) la activación de C3b, la cual se une a microorganismos, marcándolos para que sean fagocitados. 2) La generación de la proteína C5a, la cual es inflamatoria y quimiotáctica. 3) La activación de C5 a través de C9, que puede lisar bacterias Gram-negativa y también inactivar virus [7].

Entre los componentes humorales también se encuentran los péptidos bioactivos, conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs), que tiene una participación crucial para combatir las infecciones y que son capaces de matar microorganismos [8] y aunque el espectro de actividad parece ser reducido los PAMs son lo suficientemente eficientes para combatir a la mayoría de los microorganismos [9]. Se considera que estos péptidos existen desde el inicio de la evolución de la respuesta inmune [10], debido a que aparecen en organismos primitivos y se han conservado hasta los mamíferos.

Debido a la aparición de cepas resistentes, muchos antibióticos comerciales ya no son efectivos. Por ello, una solución prometedora es el descubrimiento de nuevas moléculas, diferentes a aquellas que han perdido efectividad y cuya resistencia no parece ser fácil de sobrepasar. Los PAMs, cuya acción protectora han usado plantas y animales por millones de años y que siguen bajo una constante presión de selección, constituyen hoy en día una fuente natural para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas.

Por sus características estructurales y funcionales, así como por su baja toxicidad para células eucarióticas, los PAMs llenan muchos requerimientos para su aplicación en la industria farmacéutica y biotecnológica.

ANTECEDENTES

2.1. Moléculas en la secreción de anfibios

En la piel de los anfibios se encuentran dos tipos de glándulas, las glándulas mucosas y las glándulas granulares. Las glándulas mucosas se encuentran en toda la piel pero son más abundantes en la región del tronco ventral. Estas glándulas se encargan de la producción de moco que ayuda a mantener la humedad, la superficie resbaladiza de la piel y prevenir el daño abrasivo. También protege la piel de los efectos dañinos por el prolongado contacto con el agua y retarda la pérdida de agua.

Las células glandulares granulares pueden estar esparcidas por la superficie de la piel o en grandes grupos, formando glándulas discretas como las glándulas paráticas encontradas en sapos del género Bufo. Son más abundantes en la espalda y pliegues dérmicos. [11], Estas glándulas son las encargadas de producir una secreción que contiene moléculas como lo son aminas biogénicas, bufogeninas, alcaloides, proteínas y péptidos bioactivos, en respuesta al estrés [12]. Por ejemplo es bien conocida la presencia de alcaloides en la secreción de las ranas venenosas de la familia Dendrobatidae, donde se han reportado alrededor de 500 alcaloides divididos en 20 clases estructurales [13]. Las moléculas bioactivas más estudiadas en los últimos años son los péptidos, debido a su enorme potencial.

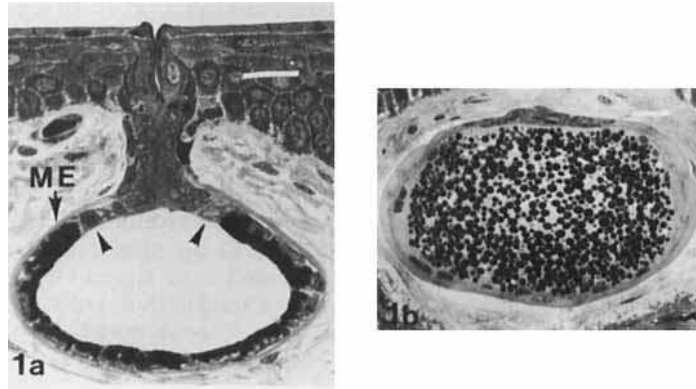


Figura 1. Imágenes obtenidas por Microscopia Electrónica de Barrido de las glándulas presentes en la piel de anfibios. 1a. Glándula mucosa. Las células de las glándulas mucosas se organizan en una configuración semilunar opuesta al ducto y están llenas con gránulos. Las células remanentes en el acinus no muestran evidencia de producción de secreción. 1b. Glándula granular. El lumen de la glándula está lleno de gránulos negros. La glándula granular forma un compartimento secretor en el acinus, el cual es rodeado por células de músculo liso [14].

Los péptidos presentes en la secreción de los anfibios se dividen en dos tipos, el primero lo conforman los péptidos con actividad antimicrobiana y el segundo está formado por péptidos que tienen funciones regulatorias u hormonales [15]. El segundo grupo lo forman las bradicininas y péptidos relacionados a bradicinina (BRPs), los cuales son la contraparte de las bradicininas de mamíferos. Las bradicininas y cininas relacionadas son péptidos producidos por acción catalítica de enzimas calicreína en el plasma y tejidos [16].

En los mamíferos, las bradicininas influyen en lo que se conoce como signos cardinales de la inflamación, así como en un número de funciones celulares que incluyen, presión arterial y flujo sanguíneo local, transporte de glucosa y electrolitos, y proliferación celular [17]. Debido al aislamiento de BRPs similares a los de anfibios en peces y serpientes, se sugiere que el principal objetivo de los BRPs de anfibios se dirige a los correspondientes receptores en los posibles depredadores [18]. Esto no es del todo claro, pero hay una fuerte evidencia que, en algunos casos,

los BRPs son un componente importante de la estrategia de supervivencia del organismo, protegiéndolo contra la ingestión por depredadores. La liberación de grandes cantidades de BRPs dentro del lumen del estómago del depredador estimula la motilidad gástrica lo cual puede conducir a la activación del reflejo del vómito y la expulsión de la presa [19]. Las BRPs de anfibios difieren de la bradisinina de mamíferos en la estructura primaria, con análogos sitio substituidos, truncados y extendidos (N y C terminal) [20].

2.2. Péptidos antimicrobianos

En 1980 Boman y col reportan la presencia de péptidos con propiedades antimicrobianas, los cuales fueron encontrados en la hemolinfa de la larva del lepidóptero *Hyalophora cecropia* [21], estos péptidos producían lisis de bacterias en cultivo. Fueron denominados cecropinas Después se descubrieron defensinas en conejos [22]. Cuando Zasloff [23] revisaba la córnea del ojo humano, se preguntó cómo es que estando expuesta a tantos microorganismos, permanezca tan saludable, cual es la razón de no necesitar un gran número de fagocitos para defender la superficie, la cual está expuesta a un continuo ataque de microorganismos. Tiempo después trabajando con oocitos de *Xenopus laevis*, se dio cuenta que las heridas producidas por la cirugía al extraer los ovarios, habían cicatrizado sin evidencia de inflamación o infección. Zasloff dedujo que la única manera de que las heridas cicatrizaran debería ser porque en la piel de la rana existía un mecanismo antimicrobiano, dado que las ranas se encontraban en depósitos llenos de microorganismos. Varios meses más tarde encontró PAMs en la piel de *X. laevis*, denominando al primero magainina [24]. Estas observaciones dieron inicio a la investigación sobre el uso potencial de nuevas moléculas bioactivas de origen natural para el combate a enfermedades infecciosas.

En términos generales los PAM son péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores de 10 kDa) codificados en el genoma, a diferencia de otras moléculas capaces de matar bacterias, como la penicilina, la cual se obtiene naturalmente del hongo *Penicillium chrysogenum* [25] (antes *Penicillium notatum* [26]), o por métodos sintéticos y semi-sintéticos [27]. Los PAMs son típicamente moléculas catiónicas debido al alto contenido de los aminoácidos lisina y arginina. Muchos de ellos son anfipáticos, lo que les confiere estabilidad en ambientes acuosos e hidrofóbicos. Estas características químicas son importantes para comprender el mecanismo de acción microbicida. También pueden presentar modificaciones postraduccionales como glicosilación [28], ciclación como en algunas defensinas [29], o amidación de los grupos carboxílicos terminales [30].

En mamíferos los PAMs se expresan en neutrófilos y células epiteliales de la mucosa, en insectos en la hemolinfa y en anfibios en las glándulas paratípidas. Los PAMs se sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina y se difunden más rápidamente que las proteínas y células inmunes. Pueden almacenarse en altas concentraciones, estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos. Por lo tanto, los PAMs constituyen un recurso molecular rápido y no específico para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios [31].

Los PAMs difieren en tamaño, secuencia de aminoácidos y estructura. Todos están genéticamente codificados. Estos se agrupan en familias de acuerdo con su tamaño, su estructura y la organización de los aminoácidos. En humanos, están divididos en tres familias: defensinas, histaninas y catelicidinas [10].

Los PAMs están distribuidos en varios grupos de organismos, por ejemplo, se han aislado defensinas en mamíferos [32] y magaininas en anfibios [33], cecropinas en insectos [34], defensinas de plantas [35] y bacteriocinas en algunas especies de bacterias [36], aunque en el veneno

de invertebrados, como alacranes y arañas, los componentes más abundantes son las toxinas bloqueadoras de canales iónicos y enzimas (>95%), y muy pocos antimicrobianos han sido caracterizados de estas fuentes. Los PAMs se han aislado principalmente de anfibios, que por su naturaleza y presión evolutiva están más expuestos al medio ambiente [37-38].

2.3. Estructura y regulación de los genes de péptidos antimicrobianos

Los estudios sobre la estructura y mecanismos de regulación de los genes que codifican PAMs en mamíferos e insectos, se han realizado principalmente en *Drosophila melanogaster* [39]. Se ha demostrado que en el genoma pueden presentarse una o varias copias de estos genes, con variado número de intrones e incluso transposones.

También se ha demostrado que los genes codificadores de PAM contienen secuencias de DNA reguladoras conocidas como elementos kB. Este tipo de secuencias son similares a las responsables de la regulación de la expresión de la cadena ligera k de la inmunoglobulina y de proteínas de la respuesta de fase aguda en mamíferos. En las células del cuerpo graso de *D. melanogaster*, también se han caracterizado tres factores nucleares kB (NFkB), que reconocen secuencias kB en la región reguladora del gen y consecuentemente, promueven la producción de PAM. La activación de los genes de PAM está bajo el control de diversas rutas reguladoras, donde la mejor caracterizada es la ruta Toll, la cual incluye la activación de proteínas de reconocimiento (Spaetzle) que se unen a receptores (Toll). La unión al receptor activa una cascada de fosforilación de proteínas citoplasmáticas (Tir, Tube, Pelle) que a su vez inactivan al inhibidor IκB (cactus), para permitir la translocación de los factores de transcripción kB al núcleo, activando la expresión de genes de la respuesta inmune, incluyendo los PAM.

Estudios recientes han revelado la presencia de receptores homólogos de Toll en humanos, denominados TLR (Receptores Tipo Toll). Estos receptores se activan por la presencia de LPS y participan en la transducción de señales de los LPS a través de la membrana, activando la transcripción de citocinas y moléculas co-estimuladoras como IL-1beta, IL-6 y TNF-alfa. Estas moléculas también estimulan el sistema inmune adquirido, activando la respuesta celular o la producción de anticuerpos específicos. Así, en los vertebrados, la participación del sistema inmune innato se manifiesta al detectar la presencia de antígenos no propios, activar los primeros mecanismos y estimular al sistema inmune adquirido. Las similitudes funcionales y estructurales de las rutas de señalización de la inmunidad innata, en *Drosophila* y mamíferos, indican que este mecanismo tiene importancia vital y se ha conservado a través de la evolución hasta organismos más avanzados [40].

2.4. Clasificación de péptidos antimicrobianos

Los PAMs se han clasificado en base a diversos criterios, como: actividad, origen, estructura y composición de aminoácidos [41]. Sin embargo en la actualidad son clasificados principalmente en cinco subgrupos:

- 1) **Péptidos antimicrobianos aniónicos:** Son ricos en ácido aspártico o glutámico, requieren Zn^{2+} como cofactor para su actividad antimicrobiana y son activos contra bacterias Gram - y Gram +. Péptidos aislados del surfactante pulmonar, tienen masas moleculares entre 721.6 a 823.7 Da y son ricos en ácido glutámico [42]. Brodgen y col. reportan que el extremo amino terminal de algunos zimogenos, contiene regiones homopoliméricas de ácido aspártico y demostraron que estos fragmentos tienen actividad antibacteriana [43].
- 2) **Péptidos catiónicos lineares alfa helicoidales:** péptidos catiónicos cortos (<40 residuos de aminoácidos). Carecen de residuos cisteína y

a veces tienen una zona flexible en la mitad de la molécula. En solución acuosa, muchos de estos péptidos tienen una estructura desordenada, pero en presencia de ciertas sustancias tales como vesículas de fosfolípidos, liposomas o lípido A, una parte o toda la molécula es convertida en α -hélice [44]. Se ha observado que un mayor contenido de α -hélice en los péptidos se correlaciona con una actividad antimicrobiana más fuerte. Como el subgrupo anterior, estos péptidos son activos contra bacterias Gram-positivo y Gram-negativo. Este grupo incluye las cecropinas [45] y magaininas [46].

- 3) **Péptidos catiónicos enriquecidos en ciertos aminoácidos:** Estos péptidos carecen de residuos cisteína y son lineares, aunque algunos pueden formar espirales extendidos. Hay péptidos enriquecidos con prolina que presentan actividad únicamente contra bacterias Gram-negativo [47], estos péptidos han sido encontrados principalmente en insectos [48] también existen péptidos que son ricos en glicina, estos son más activos contra bacterias Gram-negativo pero también tienen acción contra bacterias Gram-positivo [49].

- 4) **Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína:** Se caracterizan por formar enlaces disulfuro. Están representados por una familia muy diversa de moléculas llamadas defensinas cuya característica principal es la presencia de tres enlaces disulfuro intramoleculares [50]. Las defensinas se pueden dividir en dos grandes grupos, aquellas que forman láminas β y otras que forman hélices α entre los residuos de cisteína [51]. Las β defensinas son producidas principalmente por células epiteliales de la piel, tracto respiratorio, urogenital y gastrointestinal [52] y las α defensinas son secretadas en granulocitos y en células Paneth en el intestino delgado [53]. Dentro de este grupo también se incluyen los péptidos aniónicos y catiónicos que son fragmentos de proteínas grandes: Estos fragmentos tienen actividad antimicrobiana y son similares en

composición y estructura a los péptidos del subgrupo anterior. Como ejemplos, en humanos tenemos los péptidos lactoferrina proveniente de lactoferrina y dominios antimicrobianos derivados de hemoglobina y lisozima.

Además de los subgrupos mencionados, existe una familia de PAMs con estructura similar al colágeno y que actúan como lectinas uniendo manosa por lo cual se han denominado colectinas [54].

2.5. Mecanismo de acción propuesto para péptidos antimicrobianos catiónicos que contienen hélices alfa.

Dentro del grupo de PAMs alfa helicoidales se agrupan todos los PAMs que forman hélices alfa, pueden ser anfipáticos e hidrofóbicos. Pero la gran mayoría de estos péptidos tienen características anfipáticas, presentando un segmento en hélice alfa con una parte positiva y un segmento apolar, estas características estructurales son una de las más importantes en el mecanismo de acción de los PAMs [55-57].

La importancia de la hélice alfa se ha demostrado en varios trabajos, por ejemplo, modificaciones de péptidos que presentan estructura alfa hélice, evidencian que si hay un incremento en el porcentaje de estructura alfa hélice, también hay un incremento en la actividad antimicrobiana. La optimización de estos péptidos se realiza por la sustitución de residuos desestabilizadores de hélice (Pro) por residuos estabilizadores (Leu, Ala, Lys) [58]. La presencia de aminoácidos apolares y polares concuerda con el hecho de que la actividad antimicrobiana está relacionada con la capacidad de la hélice anfipática de interactuar con las membranas de la célula blanco [59].

Uno de los PAMs alfa helicoidales más representativo es la magainina. Un péptido de 23 aminoácidos, secretado de la piel de la rana *Xenopus*

laevis. Del estudio de este péptido se desarrolló el concepto de poro lítico, que difiere de los poros que otros PAM forman en la membrana de microorganismos [60]. El mecanismo de acción propuesto para estos péptidos consta de tres pasos:

- 1) **Atracción por la célula bacteriana.** En el primer paso del mecanismo de acción propuesto, la atracción electrostática es importante. Los péptidos que generalmente tienen una carga neta positiva pueden ser atraídos por los componentes de las membranas bacterianas [61], las cuales tienen en su superficie componentes con carga negativa fosfolípidos aniónicos y grupos fosfatos de lipopolisacáridos, en bacterias Gram-negativo, y ácidos teicoicos en bacterias Gram-positivo [62], mientras que la superficie de las membranas celulares eucariotas tienen predominantemente componentes neutros. Hongxia Zhao y col. [63] estudiaron los efectos de dos péptidos magainina 2 e indolicidina, en membranas que contienen componentes zwitterionicos y componentes aniónicos, demostrando que los péptidos interactuaron preferentemente con las membranas aniónicas;
- 2) **Unión a la membrana celular.** Es importante la concentración relativa entre el péptido y el lípido de la membrana (P/L), ya que cuando la concentración es baja el péptido tiende a orientarse paralelamente a la membrana y es inactivo, pero cuando la concentración se incrementa el péptido tiende a tomar una posición perpendicular a la membrana, pudiendo lograr la inserción del péptido; entonces la susceptibilidad de la célula a un péptido depende de la concentración relativa, la cual es determinada por la composición lipídica de la membrana, lo que puede explicar la especificidad hacia ciertas bacterias [64];
- 3) **Inserción del péptido y permeabilización de la membrana celular.** Se han descrito tres modelos principales de posibles

mecanismos para lograr la permeabilización de membranas por estos péptidos: “barrel-stave” (Figura 2), “toroidal pore” (Figura 3) y “carpet” (Figura 4).

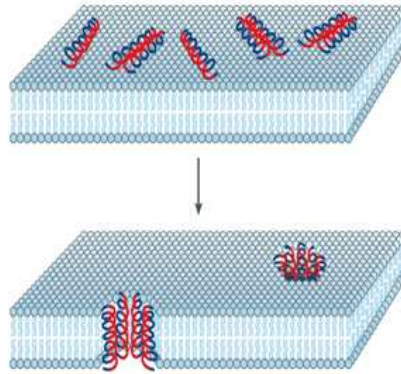


Figura 2. Modelo “barrel-stave”. Los péptidos unidos se agregan y se insertan en la bicapa lipídica de modo que las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región del “core” lipídico de la membrana, dejando las regiones hidrofílicas hacia el lumen central. Se forma así un poro transmembrana muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes son los péptidos helicoidales [64-65].

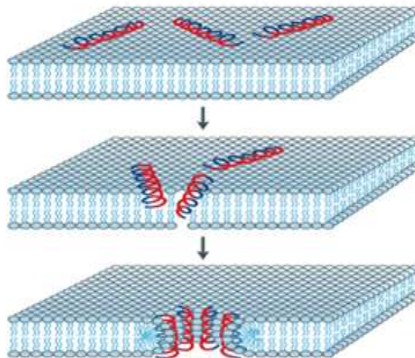


Figura 3. Modelo “toroidal pore”. Los péptidos unidos se agregan y se insertan en la membrana e inducen a la monocapa de lípidos a curvarse a través del poro, de modo que las regiones polares de ambas capas de la membrana llegan a unirse. Así, las paredes del poro quedan formadas por las cabezas polares de los lípidos de membrana y por los péptidos insertados en ella [64, 67].

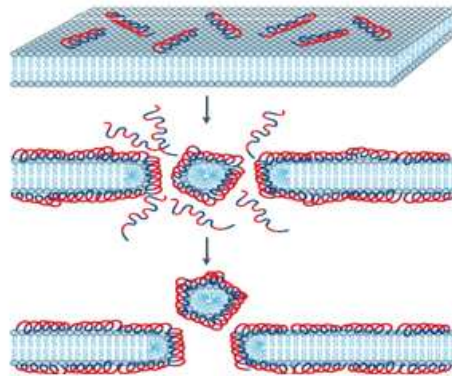


Figura 4. Modelo “carpet”. Los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa cubriendo la superficie de la membrana celular como una carpeta. En altas concentraciones estos péptidos interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica, mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de manera similar a los detergentes para desintegrar finalmente la membrana formando micelas. [65-68].

En relación con los modelos de muerte intracelular, hay evidencia creciente que indica que los PAMs tienen además blancos intracelulares. Una vez en el citoplasma, los péptidos pueden alterar la formación del septum citoplásmico, inhibir la síntesis de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas o inhibir la actividad enzimática [69].

2.6. Péptidos antimicrobianos en anfibios

En muchos animales (incluyendo los humanos), la defensa contra agentes externos esta mediada por eventos como son la respuesta inmune innata y adaptativa, activación del complemento, fagocitosis, y la liberación de PAMs, aunque en insectos, anfibios y otros organismos los PAMs tienen el rol principal en la defensa contra las infecciones [70]. Además los anfibios son considerados sensores muy sensibles a los cambios climáticos y ambientales, debido a su característica anfibia, donde su ciclo vital y reproductivo se desarrolla en agua y en tierra. Estos animales son

las víctimas principales del incontrolable desarrollo agrícola e industrial perpetrado por el hombre en el último siglo. La piel de los anfibios por su propia naturaleza y evolución, juega un papel decisivo en su sobrevivencia, donde la permeabilidad, colores y exudado de las glándulas granulares son los elementos fundamentales en su mecanismo de defensa contra el medio ambiente, depredadores y microorganismos patógenos. Es por ello que la piel de anfibios contiene un rico arsenal químico que forma parte de su sistema de defensa y también asiste en la regulación de la acción fisiológica cutánea. En respuesta a una variedad de estímulos, los compuestos de la defensa primaria son secretados de glándulas especializadas sobre la superficie dorsal y dentro del intestino de los anfibios [71].

Datos reportados en la literatura revelan que más del 90% de los componentes presentes en la secreción de anfibios poseen actividad antibacteriana y en las bases de datos de PAMs el mayor porcentaje de PAMs ha sido reportado en anfibios [56, 72,73].

2.7. Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos de anfibios

Al estudiar la acción microbicida de los PAM, los resultados demostraron que estos pueden tener acción contra una amplia gama de microorganismos, Wang y Wang en la base de datos "The Antimicrobial Peptides Database" [73] tienen indexados 1228 péptidos, los cuales dividen en grupos de acuerdo a su acción. Hay péptidos que pueden entrar en más de una categoría; 65 péptidos reportados con actividad anticancerígena, 76 con acción antiviral, entre estos, 53 presentan actividad anti VIH, 327 péptidos con actividad antifúngica. El mayor grupo corresponde a los péptidos que tienen actividad antibacteriana con 944 péptidos enlistados. Muchos de los péptidos dentro de esta base de datos son pertenecientes a anfibios.

Actividad antiviral de los péptidos antimicrobianos: Un punto importante en la actividad antiviral, es que muchos de los péptidos de anfibios han presentado actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se piensa que los PAMS actúan de dos formas, puede ser que desintegran la membrana viral o bloquean la entrada del virus a la célula. VanCompernelle [74] estudió 14 PAMS de diferentes especies de anfibios, tres de estos péptidos (caerina 1.1, caerina 1.9, y maculatina 1.1) inhibieron completamente la infección de células T con VIH a concentraciones no tóxicas para las células blanco. Se conoce que la exposición del virus en la mucosa origina su captura por las células dendríticas, cuya función es la internalización de patógenos para su presentación al complejo mayor de histocompatibilidad. Es en este punto que actúan los PAMS, rompiendo la integridad de la capa proteica viral en concentraciones no tóxicas para las células blanco.

Actividad Antitumoral. Diversos trabajos sugieren que los péptidos anfipáticos tienen como blanco la membrana celular con características específicas; las membranas bacterianas y las membranas de las células tumorales están negativamente cargadas y por lo tanto susceptibles al pegado catiónico de los PAMS. Estos se unen y desestabilizan el potencial de membrana, produciendo fuga de electrolitos y consecuentemente la muerte celular. Las membranas de células tumorales poseen de 3 a 7 veces más fosfatidilserina que las células normales; estas moléculas están orientadas hacia el exterior de la membrana lipídica, lo que resulta en membranas externas cargadas negativamente. Mientras que en las células normales, las fosfatidilserinas se orientan hacia la cara interna de la membrana. Estas diferencias en la composición de las membranas determinan la fluidez y potencial, explicando la preferencia lítica de los PAMS por bacterias y células tumorales, pero no por células eucariontes normales. Se han reportado las propiedades antitumorales de los PAMS α -hélice naturales y de sus análogos sintéticos, en relación a las concentraciones efectivas para

destruir (matar) al 50% de las células tumorales (CE_{50}) respecto a su toxicidad para las células normales. Uno de estos péptidos es la Magainina B, posee una CE_{50} de 17 $\mu\text{g/ml}$ y sólo presenta un efecto tóxico para células normales a concentraciones por encima de 200 $\mu\text{g/ml}$ sin observarse actividad hemolítica [75].

Actividad antibacteriana. Recientemente, se están utilizando los PAMs para el tratamiento de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (FQ). La FQ es una enfermedad causada por la mutación en el gene CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística). Esta mutación involucra la falta de regulación en el transporte de iones cloruro a través de la membrana. La producción de elevadas concentraciones de cloruro en los pulmones de pacientes con FQ inhibe la actividad de muchos PAMs del sistema inmunológico innato, tales como las β -defensinas y catalicidinas (LL-37 en humanos) producidas por las células epiteliales de los pulmones. Los individuos que presentan FC son más susceptibles a las infecciones por bacterias oportunistas como la *Pseudomonas aeruginosa*. El uso de péptidos de origen natural o sintético más resistentes a las altas concentraciones iónicas ha demostrado su efectividad en el tratamiento de las infecciones pulmonares de pacientes con FC, siendo la administración más efectiva vía aerosoles [76].

Actividad antiparasitaria. La actividad antiparasitaria más estudiada esta relacionada a parásitos del genero Plasmodium y Leishmania. La malaria es una de las principales enfermedades infecciosas que afecta a la población, los niveles de mortalidad y morbilidad son altos, principalmente en niños de África, Asia y América del Sur [77]. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades estima que hay 300- 500 millones de casos al año y más de un millón de personas muere [78].

La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmite de un humano a otro a través de la picadura de mosquitos

infectados del género *Anopheles*. El ciclo de vida de *Plasmodium* comprende dos hospederos, el vertebrado y el mosquito. Cuando el mosquito pica a un hospedero vertebrado, inyecta esporozoítos que viajan al hígado, donde se multiplican dentro de las células hepáticas, cuando alcanzan la madurez son liberados en otra forma llamada merozoítos. Los merozoítos entran al torrente sanguíneo e infectan a los globulos rojos. En los eritrocitos, los parásitos pueden seguir dos vías: crecer y diferenciarse en esquizontes, productores de nuevos merozoítos para invadir más eritrocitos, o producir formas sexuales, gametocitos macho y hembra. Si el hospedero vertebrado es picado por un mosquito, los gametocitos pasan a este, en el mosquito se diferencian en gametos macho y hembra, que al fecundarse originan cigotos los cuales se convierten en oocinetos móviles. Los oocinetos invaden el epitelio intestinal del mosquito, donde se convierten en ooquistes y producen miles de esporozoítos, los esporozoítos se liberan a la hemolinfa e invaden glandulas salivales, cuando el mosquito pica al vertebrado se reinicia el ciclo.

Hay varios reportes de la efectividad de los PAM's en diferentes formas del parasito. La cecropina y magainina, reducen el desarrollo de oocistos en varias especies de *Plasmodium* cuando son inyectados en los mosquitos [79].

La escorpina, un péptido aislado del veneno del alacrán *Pandinus imperator* y que posee similitud estructural con los conocidos PAMs, cecropinas y defensinas, actua como un potente inhibidor de las etapas de desarrollo oocineto (ED_{50} 0.7 μ M) y gameto (ED_{50} 10.0 μ M) del parasito *Plasmodium berghei* [80]. El péptido aislado del anfibio *Hyla eximia* inhibe el desarrollo de oocinetos en un 80 % a una concentración de 10 μ M [81].

La leishmaniasis cutánea o visceral (LV) es una enfermedad tropical de difícil diagnóstico que puede ser letal para el ser humano. Es causada por protozoarios del género *Leishmania*, siendo su vector de transmisión

insectos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Estos son dípteros típicos de regiones selváticas y tropicales como México, Brasil, Perú y otros países sudamericanos que comparten la selva amazónica. Así también se encuentran en países asiáticos como la India. Datos de la Organización Mundial de la Salud revelan que existen actualmente 12 millones de personas infectadas con el parásito, y en forma preocupante se ha visto que la forma severa de la LV es endémica en el sur de Europa debido a las importaciones de perros infectados y de los cambios inducidos por el clima sobre dípteros vectores, que favorece su reproducción y abundancia. La leishmaniasis es una enfermedad que a pesar del desarrollo científico de los últimos años aún no tiene cura. El tratamiento de los pacientes infectados es con quimioterapia convencional utilizando sales de antimonio pentavalentes. Esta medicina es muy tóxica para el paciente, ocasionando fallas renales y cardíacas que pueden conducirlo a la muerte [82-83]. Se ha reportado que algunos PAMs presentan una excelente actividad contra estos parásitos. Péptidos aislados de la *Rana temporaria*, denominados Temporinas A y B, presentan actividad antiparasitaria en concentraciones micromolares, sin presentar actividad citolítica sobre eritrocitos humanos [84]. Por otro lado, se aislaron diferentes dermaseptinas (DS) denominadas DShypo 1-6, provenientes del anfibio brasileño *Phyllomedusa hypochondrialis*, las cuáles son eficientes agentes anti-promastigoto de *Leishmania amazonensis*. Ambos péptidos al ser incubados con el protozoario, producen lisis celular en concentraciones de 64 µg/mL. El uso de las DS en baja concentración, tales como 5-20 µg/mL, no presentó diferencia significativa de actividad en relación al fármaco de primera línea, el glucantime, mientras que la utilización de altas concentraciones de DS (20-64 µg/mL) demostró un significativo aumento en la actividad comparada con la actividad del fármaco. La DS DShypo-01 se ha reportado como uno de los más potentes agentes leishmanicidas [85].

Péptidos antifúngicos. La ranaciclina aislada de la *Rana temporaria*, mostró actividad contra diferentes hongos, como: *Candida albicans*, *Candida tropicales*, *Candida guiller-mondii* y esporas de *Phytophthora nicotianae*. Es interesante resaltar que la anfotericina B no es activa contra *C. guiller-mondii*, contra la cual la ranaciclina F provocó la inhibición de crecimiento del microorganismo a una concentración de apenas 1.0 μM [84]. De la misma forma, Pál. y Col,[86] reportan la actividad antifúngica de la brevinina-1BYa aislada del anfibio *Rana boyllii*, activa contra los hongos patógenos oportunistas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* ($\text{MIC} \leq 10 \mu\text{M}$). Finalmente, Li J y Col detectan actividad antifúngica en 19 Odorranaínas y 5 Nigrocinas aisladas solamente de una especie, la rana de origen chino *Odorrana grahami* [87].

2.8. Péptidos antimicrobianos de la familia Ranidae

La familia Ranidae perteneciente a la clase Amphibia, orden Anura, contiene 329 especies y están distribuidas en muchas áreas tropicales y templadas. Estudios en esta familia muestran el aislamiento de breveninas en la rana japonesa, *Rana brevipoda porsa* [88], esculentinas de la rana europea, *Rana esculenta* [89], ranalexina de la rana americana, *Rana catesbeiana* [90].

Las secreciones de la piel de las ranas de la familia Ranidae han demostrado ser una fuente muy rica de PAMs, centenares de péptidos han sido descritos [91-92].

Hasta el momento los PAMs de la familia Ranidae se dividen en 14 familias: brevenina-1, brevenina-2, esculentina-1, esculentina-2, japonicina-1, japonicina-2, nigrocina-2, palustrina-1, palustrina-2, ranaciclina, ranalexina, ranatuerina-1, ranatuerina-2 y temporinas [93].

Los PAMs de diferentes especies de esta familia comparten algunas características comunes como [94]:

- a) Todos están compuestos de 10-50 residuos de aminoácidos.
- b) Muchos son catiónicos con naturaleza hidrofóbica y estructura alfa-hélice.
- c) Fenilalanina y glicina son el primer aminoácido del N-terminal de muchos de ellos.
- d) El extremo C-terminal forma un bucle de 7 aminoácidos, por la presencia de cisteínas.

La importancia del alfa-hélice y del bucle se demostró en un trabajo con los PAMs más representativos en la familia, las ranatuerinas. En la ranatuerina-1, (SMLSVLKNLGKVGLGFVACKINKQC), la estructura primaria del péptido tiene tres dominios estructurales, una hélice alfa en los residuos 1-8, hoja beta en los residuos 11-16 y un giro beta (bucle) en los residuos 20-25. El dominio N-terminal mostro ser esencial para la actividad antimicrobiana, porque análogos que pierden la conformación hélice alfa, también pierden la actividad antibacteriana, mientras que el bucle que abarca siete péptidos en el extremo C-terminal de la molécula, es importante únicamente para su total actividad, ya que estudios con la ranatuerina-1 indican que al sustituir las cisteínas la actividad disminuye, pero no se pierde [95- 99].

Los genes que codifican PAMs en ránidos, se procesan de una única familia de polipéptidos precursores con un patrón único de regiones conservadas y variables, opuesta a la secreción convencional de péptidos. Los precursores pertenecientes a esta familia, designados como preprodermaseptinas, tienen una preproregion N-terminal común que está notablemente bien conservada, tanto dentro como entre las especies, pero un dominio C-terminal hipervariable que corresponde a los PAMs con muy diferentes longitudes, secuencias, cargas y espectro

antimicrobiano [100]. Cada especie de rana tiene su colección propia y distinta de 10-20 PAMs de modo que en las 329 especies de ránidos podrían encontrarse miles de PAMs diferentes. La estrategia que estas ranas han desarrollado para generar esta enorme cantidad de péptidos incluye duplicaciones repetidas de genes ancestrales de 150 millones de años. La hiperdivergencia de PAMs podría ser visto como el éxito de un sistema de defensa que proporciona a las ranas protección máxima contra la rápida evolución microbiana y minimiza las oportunidades de los microorganismos a desarrollar resistencia a péptidos individuales

2.9. *Lithobates spectabilis*

Esta especie de rana es endémica de México se encuentra en el centro del país, en los estados de Michoacán, Estado de México, Morelos, Tlaxcala Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca (Figura 6). Se encuentra en ambientes de bosques de roble, pino-encino y abetos por encima de los 1500 msnm. Se puede hallar en los bordes de las lagunas pantanosas y lagos, pero principalmente habita en las orillas de arroyos de montaña. Se reproduce en estanques grandes y bordes de lagos [101].



Figura 5. *L. spectabilis*, rana de aproximadamente 10 cm de longitud. El dorso es verde, presenta varias manchas pardo oscuras tanto en el dorso como en las extremidades. La coloración del vientre va del amarillo claro al crema. Imagen tomada por el equipo de trabajo de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM.

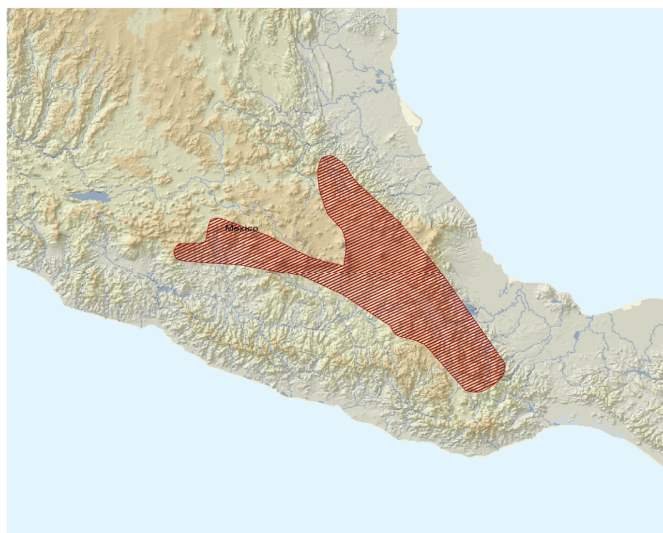


Figura 6. Distribución de la rana *L.spectabilis*. Especie endémica de Mexico, encontrada en el centro del país, en los estados de Michoacán, Estado de México, Morelos, Tlaxcala Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca. [101].

Los análisis basados en criterios moleculares muestran que el antiguo género *Rana*, que incluía más de 250 especies, no constituye un grupo monofilético. Con esto muchas especies bien conocidas han sido reclasificadas. La recomendación actual es dividir a la familia Ranidae en 16 géneros, el género *Rana* conserva un grupo más restringido de 48 especies de Eurasia y América del Norte. El género *Lithobates* abarca actualmente 49 especies de América del Norte, Central y Sur [102]. La rana anteriormente denominada *Rana spectabilis* es ahora *L. spectabilis*.

A pesar de que la rana *L. spectabilis* es endémica de México, hasta la fecha no se ha reportado algún trabajo respecto al análisis de su secreción cutánea, siendo importante conocer la diversidad molecular que presentan las especies de anfibios en el país.

3. HIPÓTESIS

La secreción de la piel del anfibio *L. spectabilis* es una fuente ideal para el descubrimiento de nuevos péptidos bioactivos con potencial de aplicación farmacéutica y biotecnológica.

4. OBJETIVOS

General

Estudiar química y biológicamente los componentes de la secreción de la piel de la rana morelense *L. spectabilis*.

Particulares

1. Extraer y aislar los componentes de la secreción.
2. Realizar una huella digital de masas moleculares de estos componentes.
3. Secuenciar totalmente por lo mínimo tres nuevos péptidos bioactivos.
4. Verificar cuantitativamente la acción antibacteriana y antiparasitaria de los péptidos estructuralmente caracterizados.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Captura e identificación de los especímenes

La captura de las ranas *L. spectabilis* se realizó en el poblado denominado Pueblo Viejo, municipio de Tlaltizapan, Morelos, durante el período de lluvias, entre los meses de Julio a Septiembre de 2010. Los animales se capturaron con redes entomológicas y se colocaron en cajas o bolsas de colecta, colocando agua o mojando las bolsas para evitar que la piel de las ranas se secase, una vez colectado un número adecuado de ranas (10 aprox.), se procedía a la extracción de la secreción. La identificación se realizó de acuerdo a criterios morfológicos, como longitud de las patas posteriores, color, presencia y distribución de manchas en el tronco, trabajo realizado en colaboración con el Dr. Rubén Castro del Laboratorio de Herpetología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, el cual forma parte del grupo de captura, identificación y extracción de las secreciones cutáneas de los anfibios.

5.2. Extracción de las secreciones cutáneas

La extracción se realizó por estimulación eléctrica: los animales fueron previamente lavados con abundante agua tetradesilada, colocados individualmente en un vaso de precipitado y sometidos a la estimulación eléctrica "in situ" a través de pulsos eléctricos no superiores a cinco segundos. Después de realizar la estimulación eléctrica, se enjuagó el dorso del animal con abundante agua tetradesilada y el extracto obtenido se depositó en los frascos de colecta (secreción total), inmediatamente se congeló el extracto total para su transporte al laboratorio. Los animales fueron liberados en su hábitat natural después de realizada la extracción.

5.3. Preparación de la muestra

En el laboratorio la muestra se descongeló a temperatura ambiente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min, para la remoción de material insoluble principalmente residuos celulares. Se determinó la concentración de proteína de la muestra en un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer Thermo Fisher (San Jose, CA-USA), a 280 nm. De acuerdo a la cuantificación del material total obtenido, la muestra se dividió en alícuotas que contenían aproximadamente 2 mg de proteína total. Las alícuotas se liofilizaron en un SpeedVac Savant-ThermoFisher (San Jose, CA-EUA), y se almacenaron -20°C hasta su uso.

5.4. Purificación de péptidos

Alícuotas de 2 mg de la secreción liofilizada se resuspendieron en 100 μl de 0.12 % ácido trifluoroacético (TFA)/agua y se sometieron a separación por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa (RP-HPLC), a través de columnas analíticas C18 Vydac (Hisperia-CA, EUA) de fase reversa, con partículas de 5 μm de diámetro. Se usó el método de gradiente lineal de 0-60% de solvente B (0.1% TFA/ acetonitrilo) en 60 min. Las fracciones se colectaron manualmente y se secaron en un SpeedVac Savant-ThermoFisher. Se realizaron varias corridas, para tener material suficiente de cada fracción para su caracterización. Estas fueron sometidas a repurificación, con la misma metodología, con un gradiente de acuerdo al tiempo de retención de las fracciones.

5.5. Determinación de masas moleculares

Para la determinación de las masas moleculares de los componentes presentes en la secreción de la rana, se utilizó el sistema LC-MS (Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplado a Espectrometría de

Masas) con fuente de ionización por Electrospray (ESI). El sistema LC-MS utilizado se constituye de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela de la ThermoFisher (San Jose, CA, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL también de la ThermoFisher Co (San Jose-CA, EUA). Se utilizaron columnas capilares PicoFrit C18 de la New Objective Inc. (Woburn, MA, EUA). Para los análisis LC-MS se aplicaron 4 µg de la secreción total previamente desalada por puntas ZipTip C18 Milipore (Billerica, MA, EUA), concentrada y resuspendida en 8 µl de agua (capacidad del loop de inyección del espectrómetro). Una vez obtenidos los datos espectrométricos, se realizaron deconvoluciones automáticas de los “full scans” por cada minuto de corrida, usando la herramienta X-tract, que es parte del software Xcalibur, para obtención del número total de masas moleculares presentes en la muestra.

5.6. Secuenciación de péptidos

Para la secuenciación de los componentes más abundantes obtenidos por HPLC se tomó aproximadamente 0.5% del total de cada fracción y se resuspendió en 8 µl de buffer. Las muestras se inyectaron directamente en el espectrometro y se sometieron a fragmentación usando Disociación Inducida por Colisión (CID) y Disociación por Alta Energía de Colisión (HCD). Adicionalmente los péptidos fueron reducidos y alquilados para obtener una mayor cobertura de secuencia a través de los métodos de disociación utilizados. Se realizaron diferentes experimentos casi simultáneos de los picos que presentaron señal m/z en el espectro: *full scan* de alta resolución, para verificar la cantidad saliente de picos, determinar la carga de las señales y masas moleculares exactas; finalmente las señales observadas fueron aisladas en la trampa de iones lineal y fragmentados por CID y HCD.

Los parámetros para experimentos CID realizados en la trampa lineal, y analizados en el Orbitrap fueron: energía de colisión normalizada de 25-

35 % de unidades arbitrarias, activación Q de 0.25, voltaje del electro spray 1.7 kV y temperatura del capilar 160°C. Los experimentos HCD fueron realizados en el electrodo octapolo usando una energía de fragmentación específica de 25 unidades arbitrarias y los iones generados fueron analizados en el analizador Orbitrap. Los espectros derivados de las fragmentaciones fueron analizados manualmente para la determinación de la secuencia de aminoácidos correspondientes.

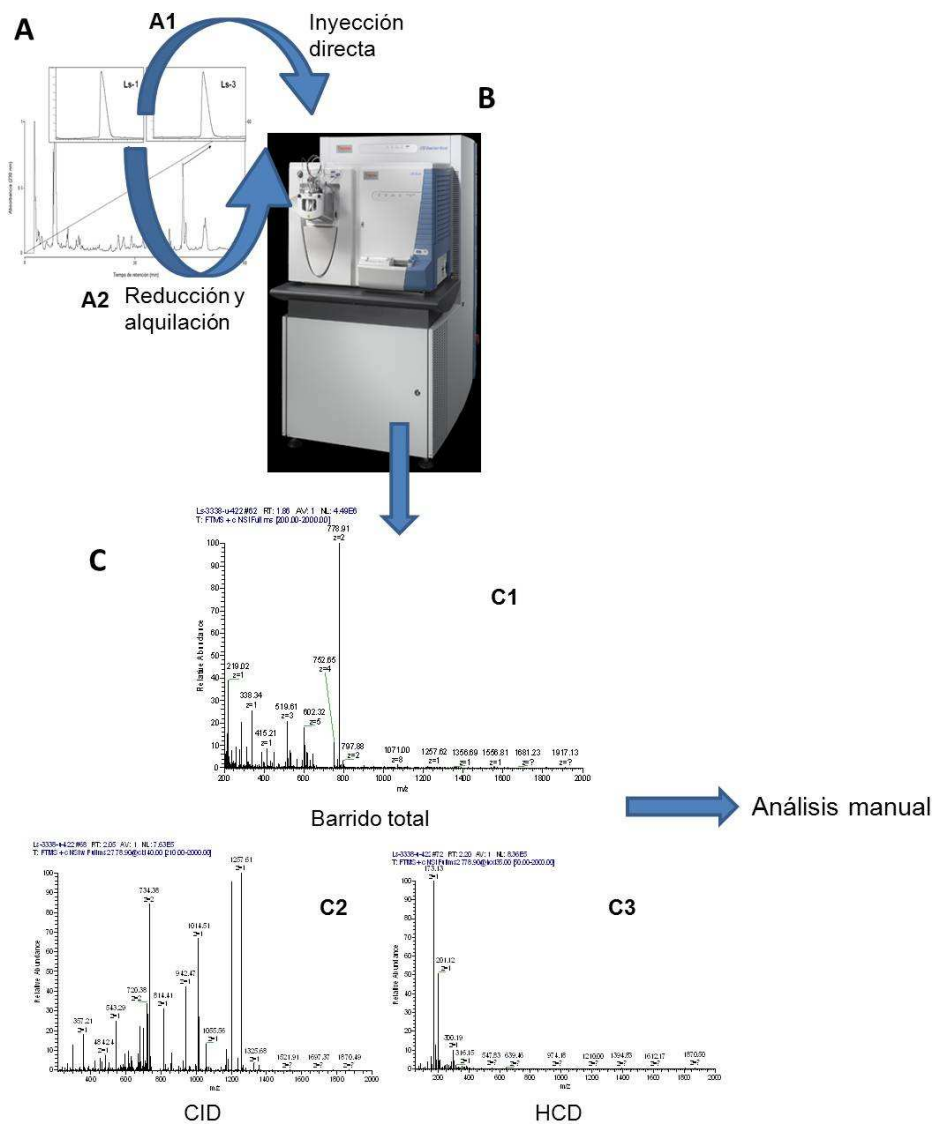


Figura 7. Secuenciación de péptidos por espectrometría de masas. (A) Preparación de muestras purificadas por HPLC. (A1) Inyección directa. (A2) Inyección después de alquilación y reducción. (B) Inyección de péptidos en el espectrómetro de masas. (C) Experimentos realizados en el espectrómetro. (C1) Barrido total. (C2) CID. (C3) HCD.

Para la secuenciación de los N-terminales por degradación de Edman los péptidos fueron puestos en membranas hidrofílicas y sometidas por lo mínimo a veinte ciclos de degradación en un secuenciador Beckman LF 3000 (Palo Alto, CA, EUA). Los tiempos de retención de los aminoácidos derivatizados serán comparados con aquellos de los estándares y la secuencia determinada.

Para obtener información estructural de la secreción total, 4 µg de muestra se redujo con ditioneitol (DTT) y se alquiló con iodoacetamida, posteriormente la muestra se desaló con puntas ZipTip C18 Milipore (Billerica, MA, EUA) y se resuspendió en 8 µl de agua. Los parámetros referentes al análisis por LC-MS de esta muestra ya fueron descritos previamente en la sección 5.5.

5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El gel de electroforesis se realizó en el Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, por la Dra. Victoria Pando Robles. Treinta microgramos de la secreción total de *L. spectabilis* se resuspendieron en buffer Laemeli. La mezcla de proteínas fue separada en 15 % SDS-PAGE y el gel teñido con azul de Coomassie durante la noche. Después de desteñir, el gel se dividió en seis partes, cada parte se redujo con DTT, se alquiló con iodoacetamida y se sometió a digestión con tripsina.

5.8. Síntesis del péptido Ls-3

La síntesis del péptido fue realizada por la compañía RS Synthesis (Louisville, KY, EUA), mediante el método de síntesis de péptidos en fase sólida.

5.9. Ensayos Antibacterianos

Los bioensayos se realizaron por el método de microdilución en placa y de acuerdo a los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [103]. Los microorganismos se cultivaron en medio Luria Broth (LB) a 37°C con agitación a 40 rpm. Los péptidos se disolvieron en medio LB y se depositaron en placas planas de 96 pozos, se colocaron 50 µL de péptido, haciendo diluciones seriadas del péptido, la concentración más alta de péptido fue de 100 µM, se adicionó 50 µL de medio más bacteria, de un inóculo inicial de 1×10^5 unidades formadoras de colonia/ml, para tener un volumen final de 100 µL. Las placas fueron incubadas toda la noche. Como control positivo se utilizó medio de cultivo y como control negativo medio de cultivo más bacteria. La concentración mínima inhibitoria a la cual el componente inhibe el crecimiento visible de la bacteria se determinó por observación directa de las placas después de la incubación y adicionalmente se realizó la lectura de turbidez (DO: 595 nm) de las placas para obtener el porcentaje de inhibición del péptido a cada una de las concentraciones. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las bacterias utilizadas fueron: *Bacillus subtilis* AIA, *E. coli* DHS α y *Salmonella* entérica Serovar typhimurium STM14028.

5.10. Ensayos Antiparasitarios

Los ensayos parasitarios fueron llevados a cabo en el Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, realizados por la Dra. María del Carmen Rodríguez. La sangre de ratón infectada con *P. berghei* se diluyó en 1:10 con medio RPMI-1640 para oocinetos (50 µg/ml hypoxanthine, 0.025 M Hepes, 0.024 M NaHCO₃, 5 µg/ml de penicilina, 5 µg/ml de streptomina, 1 µg/ml neomicina, pH 8.3, Hyclone-Thermo-Scientific). Para eliminar los leucocitos la sangre diluida fue pasada a través de una columna CF-11. Las células obtenidas se centrifugaron y el pellet se resuspendió en medio

para oocinetos de 1:5 suplementado con 20 % suero fetal bovino. Se realizaron ensayos con alícuotas de 100 μ l en placas de 96 pozos. Los péptidos se adicionaron en diferentes concentraciones de 0.05 hasta 100 μ M en triplicado. El número de oocinetos fue obtenido 24 h después por el conteo de oocinetos en láminas con gotas de sangre previamente teñidas con Giemsa.

5.11. Ensayos de citotoxicidad contra células cancerosas y monocitos humanos

Los ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo por la Dra. Carolina Barrientos Salcedo de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana.

5.11.1 Cultivo celular.

La línea celular U-937 obtenida de células hematopoyéticas humanas fue comprada a la American Type Culture Collection y cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de penicilina-estreptomina. Las células U-937 se incubaron a 37° C en ambiente humidificado de 5 % de CO₂. El medio se restituyó cada día y las células se subcultivaron después de llegar a confluencia. Los monocitos humanos se obtuvieron de la sangre de un hombre caucásico sano usando EDTA como anticoagulante y la separación celular se llevó a cabo con un gradiente ficoll-hypaque. Los monocitos fueron transferidos a tubos falcon conteniendo 5 ml RPMI 1640, lavados 3 tiempos y centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Las células se cultivaron usando medio RPMI 1640, suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibiótico/antifúngico (Gibco BRL) los cuales se incubaron a 37°C y humidificados con ambiente y 5 % de CO₂ por 3 horas. Después de esto, las células adheridas y no adheridas se removieron con PBS y medio RPMI 1640, respectivamente, y el contador automático "scepter handheld"

determinó la cantidad y homogeneidad de las células. Únicamente los cultivos celulares con viabilidad $\geq 95\%$ y pureza $\geq 99\%$ se consideraron para los ensayos de citotoxicidad.

5.11.2. *Ensayos de citotoxicidad*

La viabilidad celular se determinó por CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo a las instrucciones de manufactura y el conteo celular se llevó a cabo usando en un Scepter Cell (Millipore). Brevemente, una curva estándar de células se construyó usando 1 ml de medio RPMI-1640 conteniendo 5×10^6 células U-937 y monocitos humanos. Una dilución seriada de 1,000 a 300,000 células seguida por la adición de fluorescencia (CyQuant), las muestras y el buffer de lisis se midieron usando un Turner Biosystem TD-700. Para evitar el efecto de fotoblanqueo todas las muestras se adicionaron durante el mismo periodo de tiempo. La curva estándar (fluorescencia x número de células) generado permitió determinar la viabilidad y mortalidad de células.

6. RESULTADOS

6.1. Fraccionamiento del extracto total

Alícuotas de 2 mg de la secreción total del anfibio *L. spectabilis* fueron fraccionadas por RP-HPLC y 74 fracciones fueron detectadas, como se muestra en la Figura 8. Las fracciones marcadas fueron purificadas y sometidas a determinación de masas moleculares y fragmentación CID y HCD usando un espectrómetro de masas Orbitrap nano-spray para obtener información de la estructura. Se realizaron varias corridas de HPLC para obtener la cantidad de material suficiente para la caracterización completa.

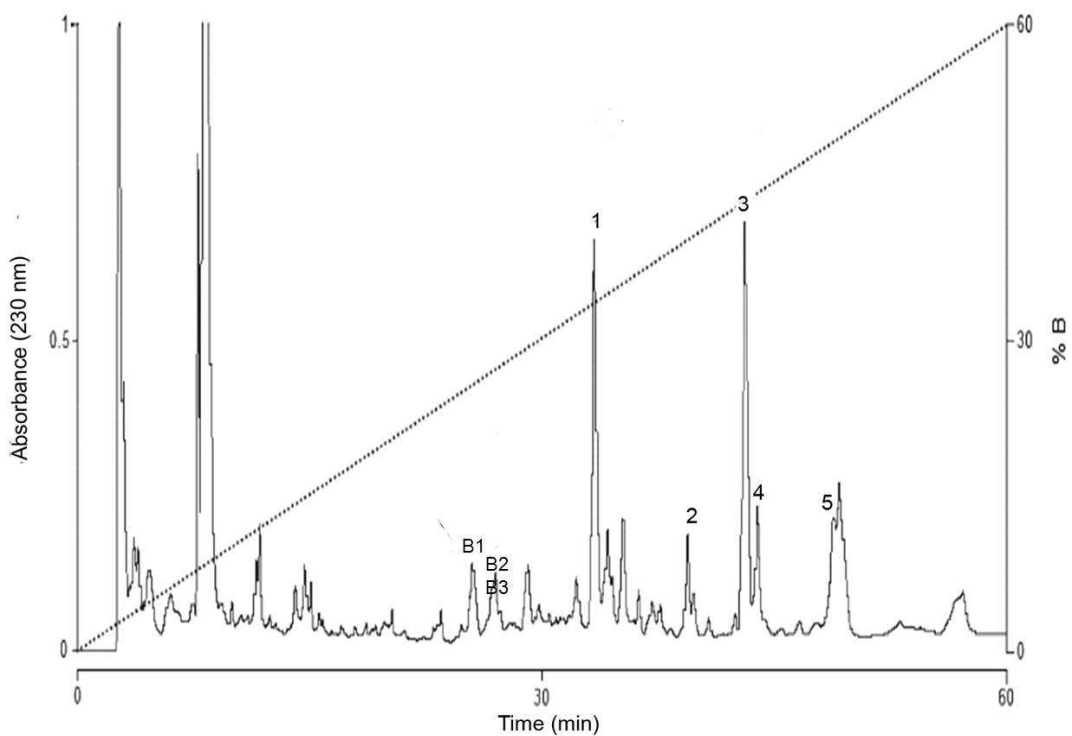


Figura 8. Purificación por HPLC de fase reversa de la secreción de la rana *L. spectabilis*. Separación HPLC en una columna C18 de fase reversa flujo de elución de 1 ml/min en 60 min con un gradiente lineal de solvente A (0.12 % TFA en agua) a 60 % de solvente B (0.10 % TFA/acetonitrilo). Los componentes marcados fueron secuenciados completamente.

6.2. Caracterización estructural

Una de las fracciones más abundantes con un tiempo de retención de 33.38 fue purificado por HPLC (gradiente de 20 a 50 % de B en 60 min.), como se muestra en la Figura 9. Este componente fue inyectado directamente en el espectrómetro, lo que permitió determinar una masa molecular monoisotópica de 1555.82 Da. A través de la fragmentación por CID se logró obtener la secuencia completa del péptido que fue denominado Ls- 1. En la Figura 10 se muestran los espectros de masas que permitieron obtener la secuencia del péptido. En el “full scan” presentado en la Figura 10A se observa que solo está presente la carga 2 de la molécula, con una relación m/z de 778.90. En la Figura 10B, se muestra la deconvolución automática de las cargas hechas por el programa Xcalibur. En Figura 10C se presenta el espectro de fragmentación del cual se obtuvo la estructura primaria del péptido Ls-1. La molécula no fue sujeta a degradación automática de Edman.

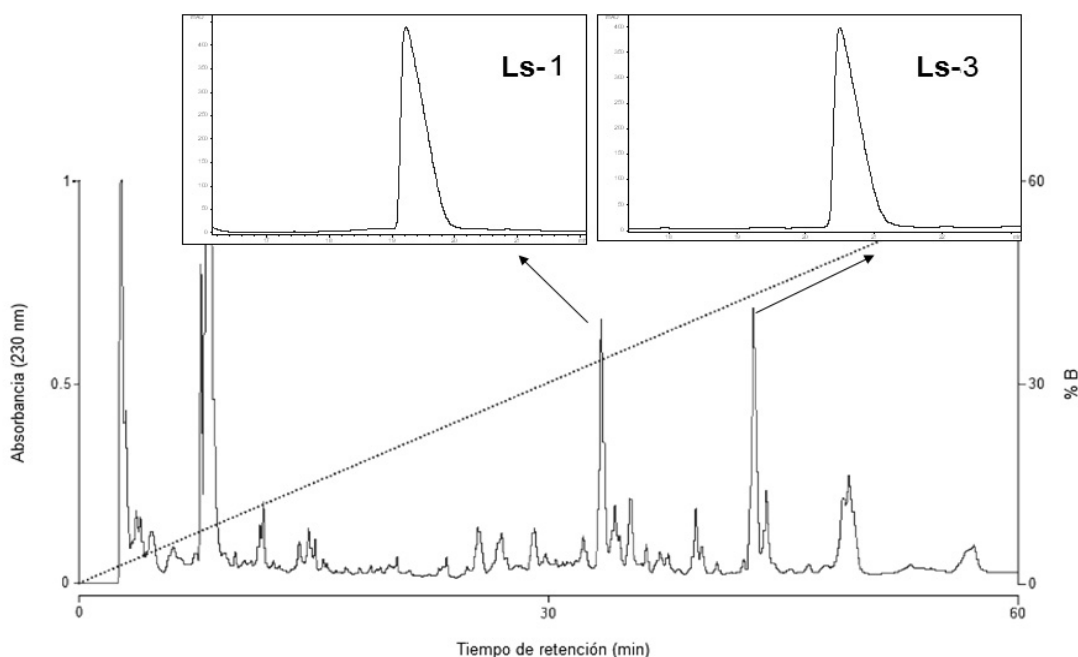


Figura 9. Purificación de los componente Ls-1 y Ls-3. Separación HPLC en una columna C18 de fase reversa flujo de elución de 1 ml/min en 60 min con un gradiente lineal de 20 a 50 % de B (0.10 % TFA/acetonitrilo) en 60 min para Ls-1 y de 30 a 60 % de B (0.10 % TFA/acetonitrilo) en 60 min para Ls-3.

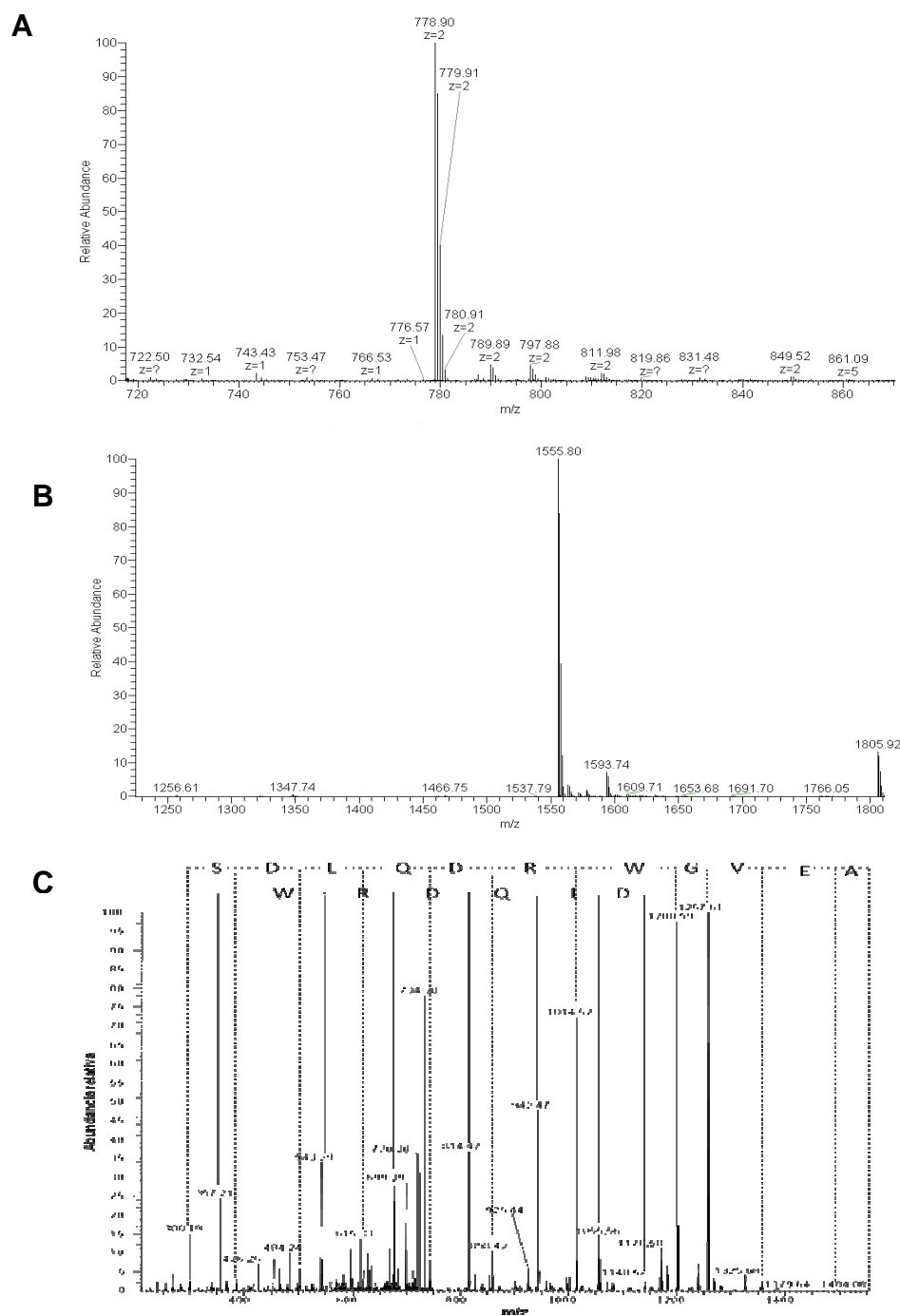


Figura 10. Análisis por espectrometría de masas del péptido Ls-1. (A) “Full scan” donde se observa la carga 2, relación masa/carga 778.90. (B) Deconvolución automática de la carga usando la herramienta X-tract, del software Xcalibur. La masa monoisotópica determinada fue de 1555.80 (C) Espectro de fragmentación CID, valores para la serie y (línea punteada) y para la serie b (línea continua).

Otro componente de interés, el cual es el segundo más abundante, con un tiempo de retención de 43.11 (Figura 8), fue purificado por HPLC

(gradiente de 30 a 60 % de B en 60 min) como se muestra en la Figura 9. La masa monoisotópica determinada fue de 3005.55 Da, y el componente fue denominado Ls-3. La Figura 11A presenta el “full scan” donde se observan las cargas 3, 4 y 5 de la molécula, con una relación masa carga de 1003.19, 752.65 y 602.32 respectivamente. En la Figura 11B, se muestra la deconvolución automática de las cargas hechas por el programa Xcalibur, se obtuvo una secuencia parcial de 11 aminoácidos después de que la molécula fue sujeta a fragmentación por CID representado en la Figura 11C donde se muestra el espectro de fragmentación del cual se obtuvo la estructura parcial del péptido Ls-3. La secuencia parcial sirvió para la identificación inequívoca del péptido como una Ranatuerina-like con un porcentaje de 89 % de identidad de secuencia. Las ranatuerinas presentan un “loop” debido a la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas localizadas en la porción C-terminal, el cual es característico de las ranatuerinas. Este “loop” podría estar presente también en el péptido Ls-3, entonces el péptido fue reducido con DTT y alquilado con yodoacetamida, reducción del posible puente de disulfuro. Efectivamente el péptido poseía un puente de disulfuro que fue determinado por un aumento de masa molecular correspondiente a 114 Da. Además, con la reducción del puente disulfuro fue posible obtener una mayor cobertura de secuencia de seis aminoácidos más, presentes en el C-terminal del péptido; la cobertura de secuencia fue total con la aplicación de las fragmentaciones CID y HCD. La molécula fue sometida a degradación automática de Edman, con lo que se obtuvo la cobertura total de la secuencia, dado el conocimiento de la presencia de cisteínas en el péptido, este también fue reducido antes de someterlo a degradación de Edman.

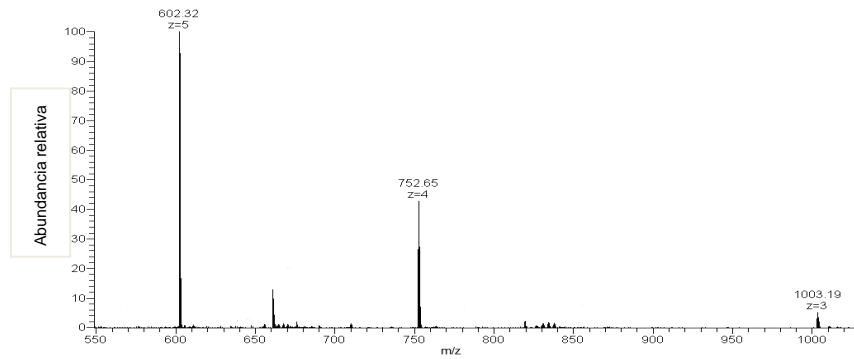
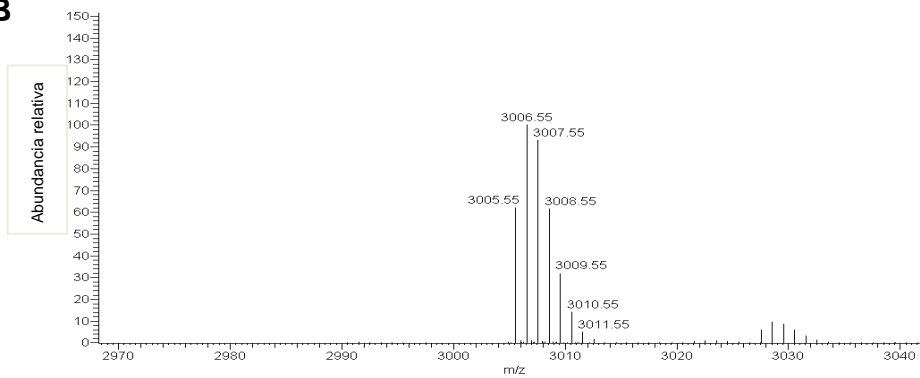
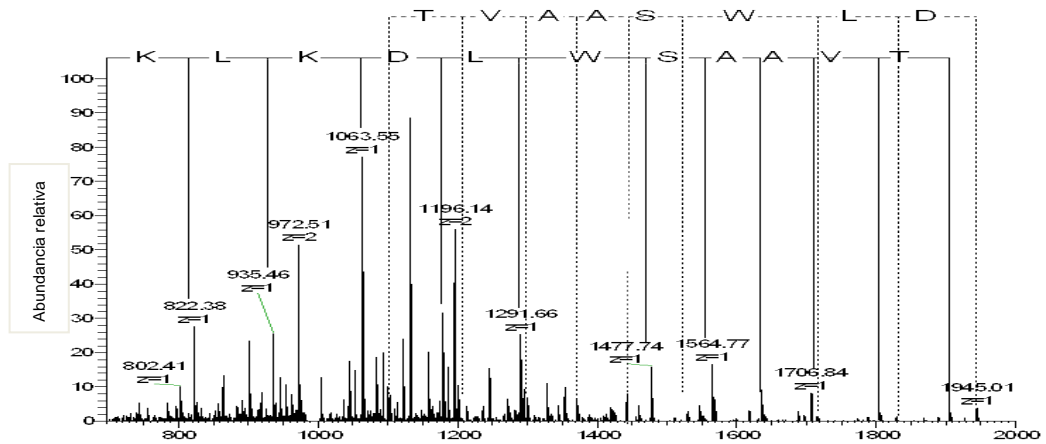
A**B****C**

Figura 11. Análisis por espectrometría de masas del péptido Ls-3. (A) “Full scan” donde se observan las cargas 3, 4 y 5 de la molécula, con una relación masa/carga de 1003.19, 752.65 y 602.32 respectivamente. (B) Deconvolución automática de las cargas usando la herramienta X-tract, del software Xcalibur. La masa monoisotópica determinada fue de 3005.55 Da (C) Espectro de fragmentación CID, obtenido de la carga 2 relación masa/carga de 1003.19. Valores para la serie y (línea continua) y para la serie b (línea punteada).

Adicional a la caracterización de los componentes más abundantes Ls-1 y Ls-3, se obtuvo la secuencia primaria de seis péptidos más, tres identificados como péptidos relacionados con bradicinina y tres como PAMs (Figura 8, B-1,2,3 y Ls-2,4,5), las fracciones en donde se encontraban presentes estos componentes también fueron sometidos a purificación por HPLC e inyectados en el Orbitrap algunos de ellos también fueron sometidos a degradación automática de Edman, en la Figura 12 se muestran la estructura de todos los péptidos de los cuales se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos, en donde se indica la cobertura de secuencia al utilizar CID y HCD o degradación automática de Edman.

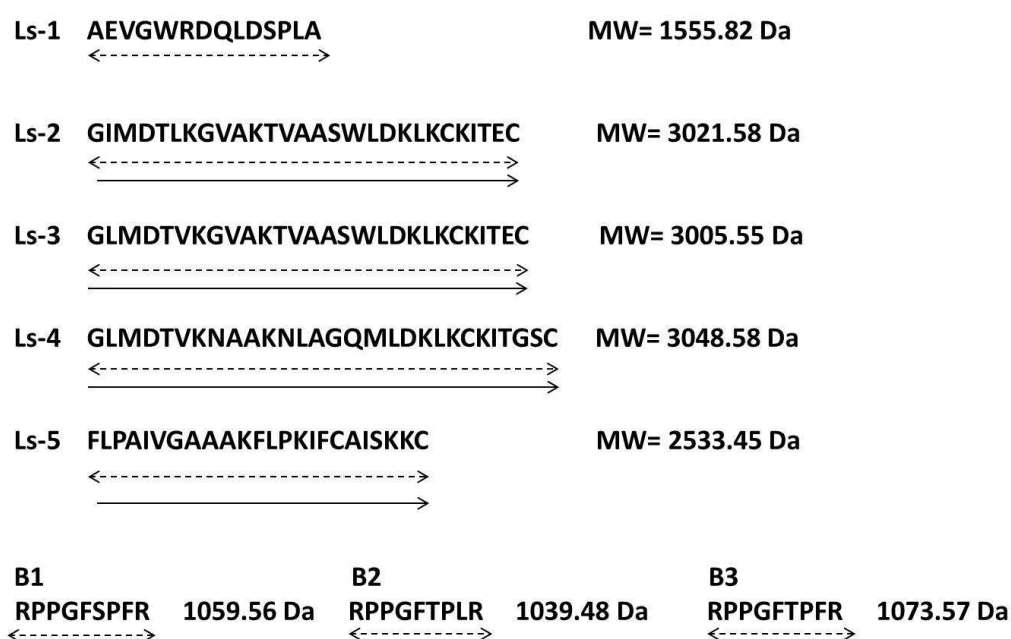


Figura 12. Secuencia de aminoácidos de péptidos aislados de la secreción de la rana *L. spectabilis*. Las masas de los péptidos son mostrados a la derecha de la figura expresadas en Da. La línea continua representa la secuenciación realizada por degradación de Edman, y la línea discontinua representa la secuencia obtenida por los métodos de fragmentación.

6.3. Determinación de las masas moleculares de la secreción de la rana *L. spectabilis*

Una alícuota de 4 µg de la secreción total de la rana fue inyectada en un sistema LC-MS. El cromatograma TIC (Corriente total de iones) obtenido se muestra en la Figura 13. La corrida total fue realizada en 130 minutos, se realizó la deconvolución por minuto de los “full scans”, obteniendo un total de 130 archivos a través del programa Xtract. Los archivos generados fueron analizados manualmente para obtener la lista total de masas mostradas en la Tabla 1, donde también se muestra el tiempo de retención; las masas están reportadas como monoisotópicas.

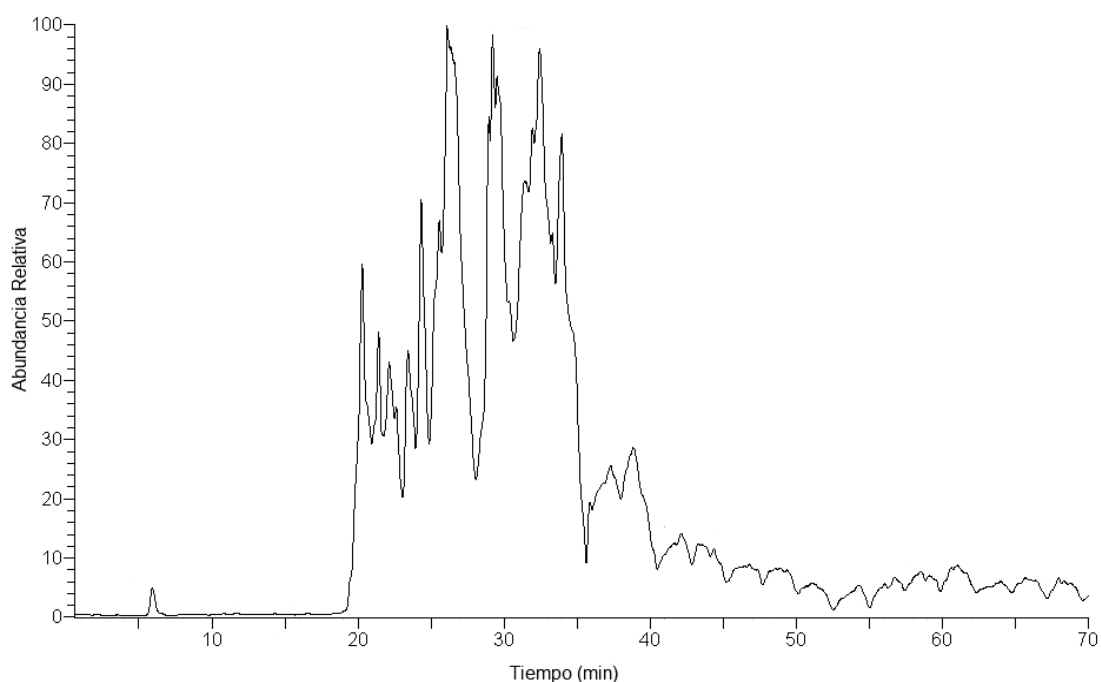


Figura 13. Cromatograma tipo TIC del análisis por LC-MS de la secreción total del anfibio *L. spectabilis*. Corrida automática de 130 minutos. Se utilizaron columnas capilares PicoFrit C18. Flujo de elución de 60 microL/min en 120 min con un gradiente lineal de 90 % de solvente A (0.12 % TFA en agua) a 100 % de solvente B (0.10 % TFA/acetonitrilo), lavado con 100 % de Solvente B en 10 min.

Tabla 1. Masas moleculares de los componentes presentes en el extracto de la secreción cutánea del anfibio *L. spectabilis* aislados por el sistema LC-MS.

Tiempo de retención	Masas	Tiempo de retención	Masas
18-19.0	2,189.04; 2,151.09; 1,462.79; 1,227.49; 1,123.53; 1,129.46; 1,114.50; 1,107.53; 1,097.53; 1,089.52; 1,075.55*; 1,027.52; 1,004.49; 943.46; 896.42; 844.51; 835.41; 756.39; 571.33;	40.1-41.0	2,202.20; 1,390.88; 498.27;
19.1-20.0	1,680.88; 1,290.66; 1,245.67; 1,218.64; 1,180.63; 1,161.44; 1,137.60; 1,133.60; 1,080.57; 1,073.57 ; 1,054.53; 1,047.45; 1,041.49; 1,025.50; 1,009.50*; 671.38;	41.1-42.0	615.45;
20-21	1,626.85; 1,518.84; 1,347.75; 1,333.72; 1,317.69; 1,303.68; 1,268.68; 1,243.68; 1,167.63; 1,117.61; 1,066.54; 1,016.54*; 997.50*; 993.67; 959.54; 917.47; 903.46; 888.50; 869.44; 851.54; 812.41; 713.37; 538.38;	42.1-43.0	1,415.84; 1,399.87; 1,377.89*;
21.1-22.0	2,873.42; 2,426.23; 2,247.13; 2,206.12; 1,979.03; 1,982.04; 1,824.91; 1,726.96; 1,491.79; 1,475.79; 1,468.70; 1,452.71; 1,434.70; 1,436.71*; 1,232.67; 1,056.63; 989.52*; 837.56; 559.33; 425.77;	47.1-48.0	666.93;
22.1-23.0	3,265.71; 2,919.60; 2,910.54; 2,485.32; 2,410.45; 2,336.27; 2,204.16; 2,034.05*; 1,962.03; 1,805.91; 1,679.88; 1,650.80; 1,608.84*; 1,459.80*; 1,444.77; 950.65*; 928.53; 919.50; 876.47*; 786.46;	48.1-49.0	674.29; 491.26; 473.25;
23.1-24.0	3,797.99; 3,271.67; 3,111.59; 3,080.54; 2,704.42; 2,432.32; 2,241.19; 2,105.18; 2,093.35; 2,048.05; 1,755.91; 1,750.92; 1,629.84; 1,593.74; 1,590.85; 1,555.80* ; 1,494.80; 1,388.76; 1,159.84; 1,094.70*; 1,037.68; 970.58; 899.54*;	49.1-50.0	710.33;
24.1-25.0	3,007.52; 2,847.49; 2,296.14; 2,149.12; 2,111.09; 1,919.96*; 1,748.91; 1,622.90; 1,541.93*; 1,534.93; 1,503.85; 1,277.72; 1,239.78; 1,200.71; 1,002.55; 860.48; 828.51; 480.32; 442.28;	52.1-53.0	695.93; 500.33*; 514.31*;
25.1-26.0	3,250.73; 3,243.65; 3,021.56* ; 2029.01; 1,955.00; 1,764.90; 1,732.91*; 1,655.01; 1,615.95; 1,583.97; 1,527.27; 1,429.83; 1,259.85; 1,163.60; 698.43;	53.1-54.0	3,037.55; 709.33; 600.69;
26.1-27.0	3,513.76; 3,307.73; 3,286.63; 1,989.00; 1,563.77; 1,450.97; 1,413.83; 1,229.76; 1,220.82; 1,207.79*; 603.86; 486.37; 466.16;	54.1-55.0	2,961.52*;
27.1-28.0	3,482.71; 3,081.53; 3,064.55*; 3,035.56; 2,748.45; 2,330.30*; 1,786.11; 1,546.83; 1,489.80; 1, 476.74; 1,409.88; 1,383.87; 1,059.56 ; 705.48; 654.43;	56.1-57.0	3,005.56* ;
28.1-29.0	3,020.55; 2,803.53; 2,653.45; 2,462.32; 2,230.18*; 1,818.08; 1,762.95; 1,601.90*; 1,455.88*; 1,372.94; 1,367.87; 1,351.88*; 1,313.79; 565.37; 435.19;	57.1-58.0	3,257.66;
29.1-30.0	2,639.77; 1,802.08; 1,752.12; 1,738.04; 1,611.96; 1,357.83; 1,341.86; 1,319.89*; 661.41;	60.1-61.0	3,419.76; 2,609.38; 431.23*; 414.20*;
30.1-31.0	449.26;	63.1-64.0	3,315.67;
31.1-32.0	5,262.78;	66.1-67.0	3,288.71;
32.1-33.0	7,951.59; 7,945.61; 3,965.01; 3,971.03; 1,706. 06; 1,337.88;	79.1-80.0	2,915.63*;
33.1-34.0	1,634.81;	88.1-89.0	3,048.55* ; 2,533.42 ;
34.1-35.0	447.22;	89.1-90.0	3,330.69; 2,979.50; 2,217.22;
35.1-36.0	1,714.04;	94.1-95.0	1,425.89*;
39.1-40.0	2,020.20;		

* Picos más abundantes de la fracción deconvolucionada.

En la Tabla 1 se eliminaron todas aquellas masas presentes que pueden ser falsos positivos, lo cual quiere decir que sean masas iguales y únicamente sean aductos de sodio (+22 Da) y potasio (+39 Da) u oxidaciones (+16 Da, +32 Da) [104].

6.4. Caracterización estructural por el sistema LC-MS

Para obtener información sobre las familias de péptidos presentes en la secreción de *L. spectabilis*, se analizaron 4 µg de la secreción total reducida y alquilada por LC-MS. El objetivo de la reducción y alquilación fue permitir el acceso total a sus estructuras primarias a través de los métodos de disociación en fase gaseosa utilizados. La muestra fue inyectada en el sistema LC-MS y el resultado del análisis es mostrado parcialmente en la Figura 14 a través de un cromatograma TIC. Este análisis automático produjo 674 espectros de fragmentación por CID y HCD. Muchos de estos espectros arrojaron datos espectrométricos de alta calidad, los cuales fueron analizados manualmente, permitiendo la secuenciación “de novo” e identificación de docenas de componentes de la secreción cutánea total de *L. spectabilis*. Las informaciones estructurales y sus identificaciones correspondientes son presentadas en la Tabla 2.

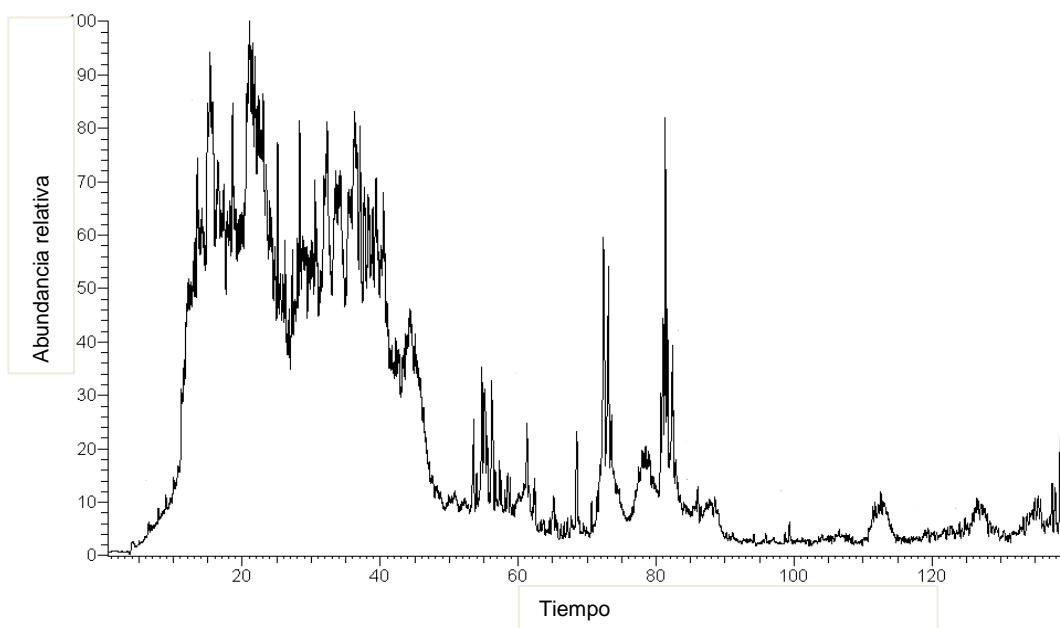


Figura 14. Cromatograma tipo TIC del análisis por LC-MS de la secreción total reducida y alquilada del anfibio *L. spectabilis*. Corrida automática de 130 minutos. Se utilizaron columnas capilares PicoFrit C18. Flujo de elución de 60 microL/min en 120 min con un gradiente lineal de 90 % de solvente A (0.12% TFA en agua) a 100% de solvente B (0.10% TFA/acetonitrilo), lavado con 100 % de Solvente B en 10 min. Se realizaron fragmentaciones por CID y HCD.

Tabla 2. Secuencias e identificación de los péptidos, obtenidos a través del análisis manual de las fragmentaciones obtenidas por el sistema LC-MS.

Tiempo de retención (min)	Ion precursor (Z^{2+})	[M+H1+]	MS/MS-secuencia derivada	Identificación del péptido
4.13	497.69	994.38	ACKISKQC*	sp P82839.1 Esculentin-2B
4.33	418.85 z3+	1254.62	KIFCALSKKC*	sp P82834.1 Brevinin-1Bb
4.63	563.73	1,126.46	IFCAISKKC*	sp P82834.1 Brevinin-1Bb
4.83	596.74	1,192.48	VVACKISKQC*	sp P82839.1 Esculentin-2B
4.93	578.73	1,156.46	IFCTISKKC*	sp P82906.1 Brevinin-1Sc
4.97	590.25	1,179.50	KLKCKITEC*	sp P85058.1 Ranatuerin-2SEb
5.03	518.23	1,035.54	MLDKLKCK*	sp P82840.1 Ranatuerin-2B
5.08	433.66	866.32	CAISKKC*	sp P0C8S8.1 Brevinin-1HSb
5.42	627.77	1,254.54	KIFCAISKKC*	sp P82834.1 Brevinin-1Bb
5.78	711.79	1,422.58	LDKLNKCKITGSC*	sp Q1JS90.1 Ranatuerin-2Vb
6.31	423.22	845.44	TAAKFLPK	sp P82834.1 Brevinin-1Bb
6.37	526.21	1,051.42	LKCKITEC*	sp P85058.1 Ranatuerin-2SEb
6.67	507.19	1,013.38	FCAISKKC*	sp P0C8S8.1 Brevinin-1HSb
7.08	483.72	966.44	KIFCAISK*	sp P82834.1 Brevinin-1Bb
7.40	423.22	845.44	AAAKFLPK	sp P82837.1 Brevinin-1Be
8.22	668.28	1,335.56	NNKLNKCKITGC*	sp P85058.1 Ranatuerin-2SEb
8.96	451.72	902.44	GAAAKFLPK*	sp P82837.1 Brevinin-1Be
9.93	610.76	1,220.52	GKMLDKLKCK*	sp P82828.1 Ranatuerin-2La
10.46	731.80	1,462.60	RNVVACKLSKQC*	sp P82839.1 Esculentin-2B
10.71	704.29	1,407.58	LDKLNKCKITEC*	sp P82828.1 Ranatuerin-2La
10.90	582.24	1,163.48	GLM(ox)DTVKNAAK*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
11.69	401.70	802.40	WLDKLNK*	Unknown
11.92	785.30	1569.6	FLDKLNKCKITGSC	sp P82828.1
12.02	854.35	1,707.70	VIDLKLNKCKVTGGFCK	sp P84280.1Palustrin-2c

12.72	593.77	1,186.54	FCALSKKC	sp P0C8S8.1Brevinin-1HSb
13.07	788.33	1,575.66	LGVNVVACKISKQC*	sp P82846.1Esculentin-2P
13.15	777.31	1,553.62	MLDKLKCKITGSC*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
13.18	733.79	1,466.70	MLDKLKCKITGC*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
13.33	624.77	1,248.65	ASWLDKLCCK*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
13.37	824.36	1,647.72	KTVAASWLDKLCCK*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
13.44	584.76	1,168.52	GFSSIFRQVAK*	sp P82846.1Esculentin-2P
13.49	679.81	1,358.62	KNLAGQMLDKLK*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
13.52	574.24	1,147.48	GLMDTVKNAAK*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
13.71	407.17	813.34	GFSSIFR*	sp P82846.1Esculentin-2P
13.77	516.24	1,031.48	AASWLDKIK*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
13.90	841.33	1,681.66	QMLDKLKCKITGSC*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
13.94	735.83	1,470.66	MVGLQALTLDKGLGA	Unknown
14.11	480.72	960.44	ASLWLDKLCCK	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
14.14	559.75	1,118.50	GLMDTVKRAK*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
14.18	667.79	1,318.58	GIMDTVKGVAKTVA*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2P
14.27	526.74	1,052.48	KFLPKIFC*	sp P82834.1Brevinin-1Bb
14.46	565.76	1,130.52	VAASWLDKLCCK*	sp P86187.1Raniseptin-5
14.52	797.32	1,593.64	WLDKLCCKITEC*	sp Q1JS90.1;Ranatuerin-2Vb
14.55	761.31	1,521.62	DKLKCKITGC	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
14.70	517.76	1,034.52	AAKFLPKIF*	sp P82834.1Brevinin-1Bb
14.75	610.27	1,219.54	MDTVKRAKT	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
14.78	419.74	828.48	MKRPLLA*	Unknown
14.82	597.77	1,194.54	AAKFLPKIFC*	sp P82834.1Brevinin-1Bb
15.33	529.26	1,057.52	FLPAIVGAAAK*	sp P82837.1Brevinin-1Be
15.89	566.76	1,132.52	GIMDTLKGVAK*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
16.29	641.93	1,923.9	NAGQMLDKLKCKITGSC	Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
16.93	755.86	1,510.72	KGLGKDLAQLGVD	sp P82846.1Esculentin-2P
16.99	578.27	1,155.54	KDLAQLGVNVV*	sp P82846.1Esculentin-2P
17.21	799.37	1,597.74	KGSLGKDLAQLGVNVV*	sp P82846.1Esculentin-2P
17.38	1,083.44	2,165.88	KNLAGQMLDKLKCKITGSC*	sp Q8QFQ4.1Ranatuerin-2P
18.83	1161.49	2321.98	AASWLDKLCCK	Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
19.06	804.82	1,608.64	SWLDKLCCKLTGC*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
19.58	840.83	1,680.83	SWLDKLCCKITEC*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
20.34	961.38	1,921.76	VAASWLDKLCCKITEC*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
22.18	663.32	1,325.64	RGVTLAQLGVN*	Unknown
22.86	695.31	1,389.62	GIMDTVKGVAKTVA*	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
27.27	476.28	951.56	LLKGVLPV*	sp B3VZU3.1Temporin
27.64	666.80	1,332.60	LGTIKGVAKTV	sp P82840.1Ranatuerin-2B
27.82	908.41	1,815.82	TADKGLGKDLAQLGVNVV	sp P82846.1Esculentin-2P
28.52	730.82	1,460.14	MDTVKGVAKTVAA	sp Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
29.07	1011.90	2022.99	TVAASWLDKLCCKITEC	Q1JS90.1Ranatuerin-2Vb
29.20	908.41	1815.82	FASQGLKDLAQLGVNVV	P82846.1Esculentin-2
29.84	778.84	1555.68	AWLGVNVVA	P82846.1Esculentin-2P
31.31	1024.44	2047.88	GLQKEL	P86017.1Esculentin-2Ra
39.05	514.92 z3+	1028.84	IVGAAAK	Brevinin-1BeP82837.1
43.37	867.37	1733.74	GLMDTVKGVAKTVAAASW	

* Secuencias completas

Varias de las secuencias encontradas corresponden a fragmentos de los péptidos presentados en la Figura 12 y muchos de estos fragmentos son el extremo C-terminal. Aquellos péptidos que contienen dos cisteínas al extremo fueron alineados (Figura 15).

Ls-2, 3

--VAASWLDKDKLCKITEC 16
-----SWLDKDKLCKITEC 13
-----WLDKDKLCKITEC 12
-----LDKDKLCKITEC 11
-----KDKLCKITEC 9
-----LKCKITEC 8

Ls-4

KNLAGQMLDKDKLCKITGSC 19
-----QMLDKDKLCKITGSC 14
-----MLDKDKLCKITGSC 13
-----LDKDKLCKITGSC 12

Ls-5

-----KIFCALSKKC 10
-----IFCAISKKC 9
-----FCAISKKC 8
-----CAISKKC 7

-----LGVNVVACKISKQC 14
-----VVACKISKQC 10

-----RNVVACKLSKQC 12
-----ACKISKQC 8
-----SWLDKDKLCKLTG-C 13
-----MLDKDKLCKITG-C 12
-----NNKDKLCKITG-C 11
-----IFCTISKKC 9

Figura 15. Fragmentos C-terminales que contienen cisteínas agrupados de acuerdo al extremo del péptido que pertenecen.

6.5. Secreción cutánea de la rana con inhibidor de proteasas

Se compararon dos muestras de secreciones tratadas de forma diferente, para poder observar modificaciones en los patrones tanto de HPLC como de la cantidad de masas presentes en la secreción. En primer lugar se obtuvo la cantidad de masas presentes en una muestra sin adicionar inhibidores de proteasas, el resultado fue mostrado en la Tabla 1, después se obtuvo igualmente el número de masas presentes en una muestra de secreción a las que se adicionaron inhibidores de proteasas. La determinación de las masas fue realizada de la misma manera que para la determinación de masas en la secreción sin inhibidores de proteasas. Se inyectó una alícuota de 4 µg de la secreción total de la rana

en un sistema LC-MS. La lista total de masas son mostradas en la Tabla 3, donde también se muestra el tiempo de retención y las masas moleculares únicas; las masas están reportadas como monoisotópicas.

En la Figura 16 se presenta la comparación del perfil cromatográfico de HPLC entre la secreción sin inhibidor y con inhibidor de proteasas. La figura muestra que los perfiles cromatográficos de ambas muestras son prácticamente iguales, una con menos intensidad pero esto debido solo a la cantidad de material inyectada de cada una, mas sin embargo en ambas es posible detectar los picos de los péptidos que fueron secuenciados totalmente (Ls-1,2,3,4,5 y B-1,2,3). Indicando así que las dos muestras corresponden a la misma especie de rana.

Tabla 3. Masas moleculares de los componentes presentes en el extracto de la secreción cutánea (con inhibidor de proteasas) del anfibio *L. spectabilis* aislados por el sistema LC-MS. Las mostradas en azul son las masas que se encuentran presentes en ambas muestras.

Tiempo de	Masas moleculares (Da)
0-1	428.10; 592.17; 683.22
2.1-3.0	917.51; 997.54*; 1016.58*; 1054.57; 1169.62 1200.71; 1498.86; 1555.85*
3.1-4.0	1319.94*; 2533.53 ; 3826.20
4.1-5.0	860.47; 1593.80
7.1-8.0	3037.67; 3064.66; 1782.99; 1727.01; 1713.00; 950.69 ; 1094.74 1123.61; 1129.67; 1181.66; 1243.73; 1257.74; 1297.76 ; 1368.80; 1468.82; 1512.87; 1542.87; 1561.85; 1412.88
8.1-9.0	1494.86; 1007.56; 1059.60* ; 1073.61* ;
9.1-10.0	
	590.83; 3005.68* ; 3021.67
10.1-11.0	1390.94; 3048.67*
11.1-12.0	2583.52; 2565.51; 1341.92; 1357.89; 1377.94;
12.1-13.0	3159.90; 3081.69; 2773.38; 2701.58; 2639.90; 2598.54; 2273.38; 1189.84; 1418.03; 1351.94; 1333.93; 1302.93; 1107.79; 865.84;
13.1-14.0	2649.61; 2683.59; 2937.62
14.1-15.0	2552.58; 2605.54; 1454.92; 1425.95; 780.96; 459.76
15.1-16.0	436.20
16.1-17.0	641.35 ; 806.43; 857.48; 903.49*; 1000.55; 1038.56; 1041.58*; 706.31
19.1-20.0	500.22; 666.20
20.1-21.0	809.58; 794.42; 698.43; 654.40; 1354.96
22.1-23.0	494.78
23.1-24.0	576.00
26.1-27.0	1274.76; 1066.58
27.1-28.0	528.33
30.1-31.0	431.24
43.1-44.0	1266.76;
50.1-51.0	603.22
59.1-60.0	1571.86
70.1-71.0	814.24

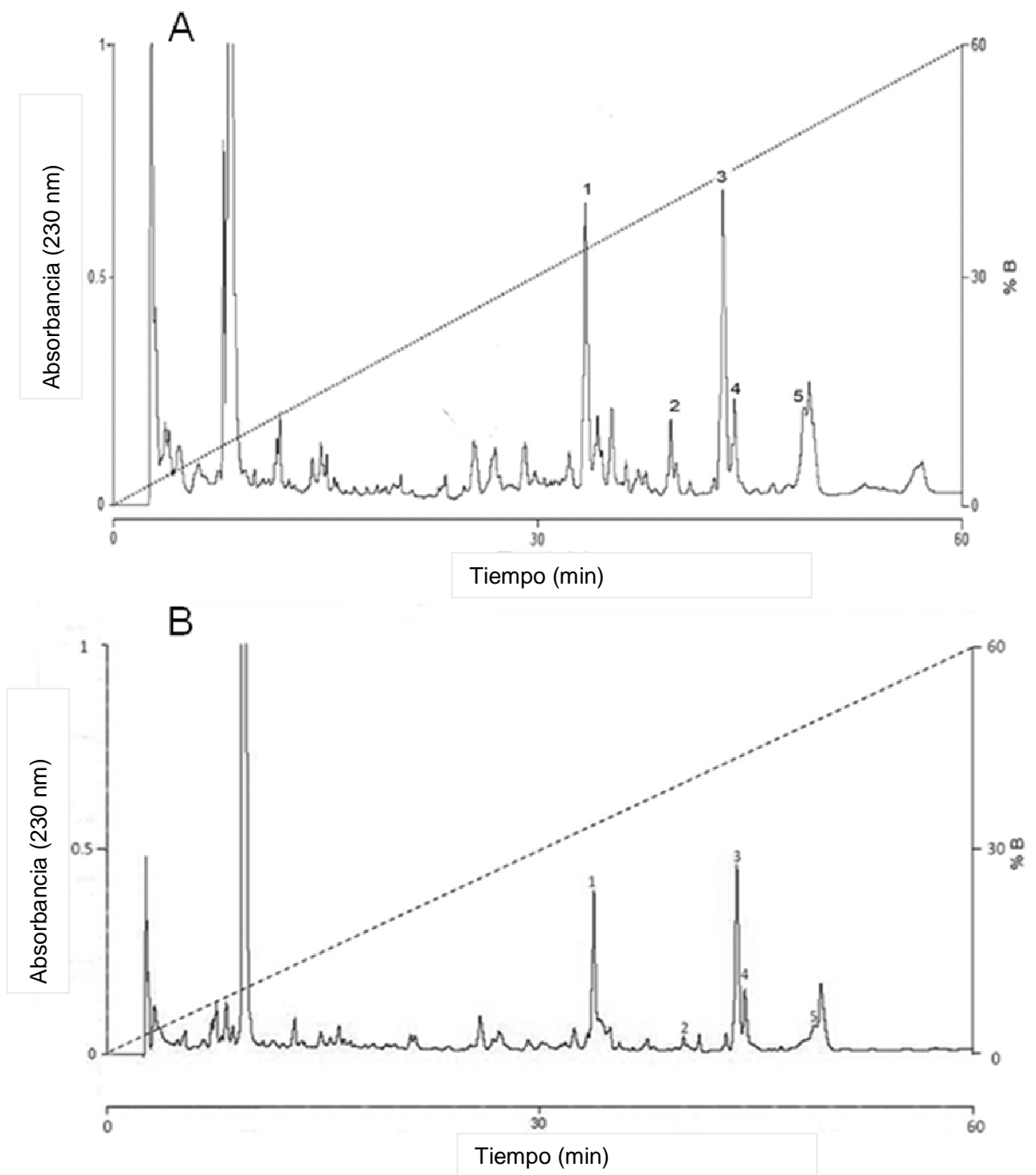


Figura 16. Purificación por HPLC de fase reversa de la secreción de la rana *L. spectabilis*. (A) sin adicionar inhibidores de proteasas. (B) con inhibidores de proteasas. Separación HPLC en una columna C18 de fase reversa flujo de elución de 1 ml/min en 60 min con un gradiente lineal de solvente A (0.12% TFA en agua) a 60% de solvente B (0.10% TFA/acetonitrilo). Los componentes marcados fueron secuenciados completamente.

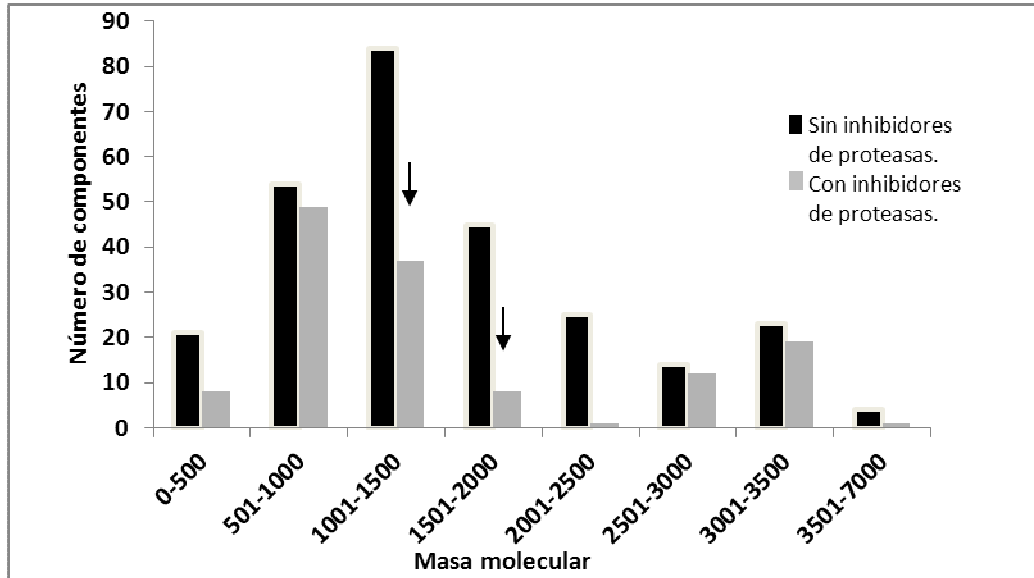


Figura 17. Comparación de la distribución de masas moleculares de la secreción de la rana *L. spectabilis* con y sin inhibidores de proteasas. El histograma muestra la distribución de las diferentes masas moleculares presentes en la secreción de rana. Los componentes más abundantes en la secreción que no contiene inhibidores de proteasas son aquellos con masas moleculares entre 500-2000 Da, siendo los componentes con masas por arriba de 2000 Da y menores de 500 Da los menos abundantes. Las flechas indican un disminución en el rango de masas de 1000-2000 Da en la secreción con inhibidores de proteasas.

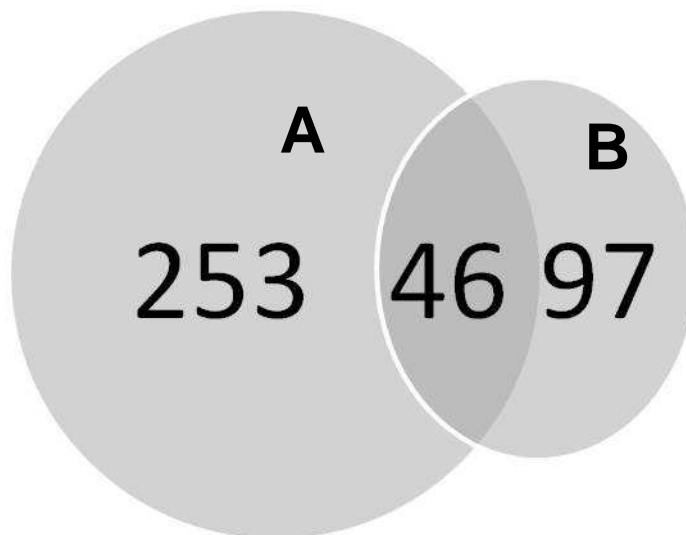


Figura 18. Diagrama de Venn. Masas de la secreción sin inhibidores de proteasas (A) y con inhibidores de proteasas (B).

6.6. Proteínas presentes en la secreción cutánea de la rana

El resultado de la separación de la muestra total de la secreción de *L. spectabilis* mediante el gel de electroforesis es presentado en la Figura 19. El gel fue dividido en seis partes, cada una de estas fue procesada usando el protocolo de digestión en gel. El resultado de las secuencias obtenidas es mostrado en la Tabla 4. Se encontraron 43 secuencias parciales y 11 tuvieron alta similitud de secuencia de proteínas ya conocidas, mediante la búsqueda con el programa FASTA de la Universidad de Virginia utilizando el banco de datos público SwissProt para búsqueda de similitud de secuencia

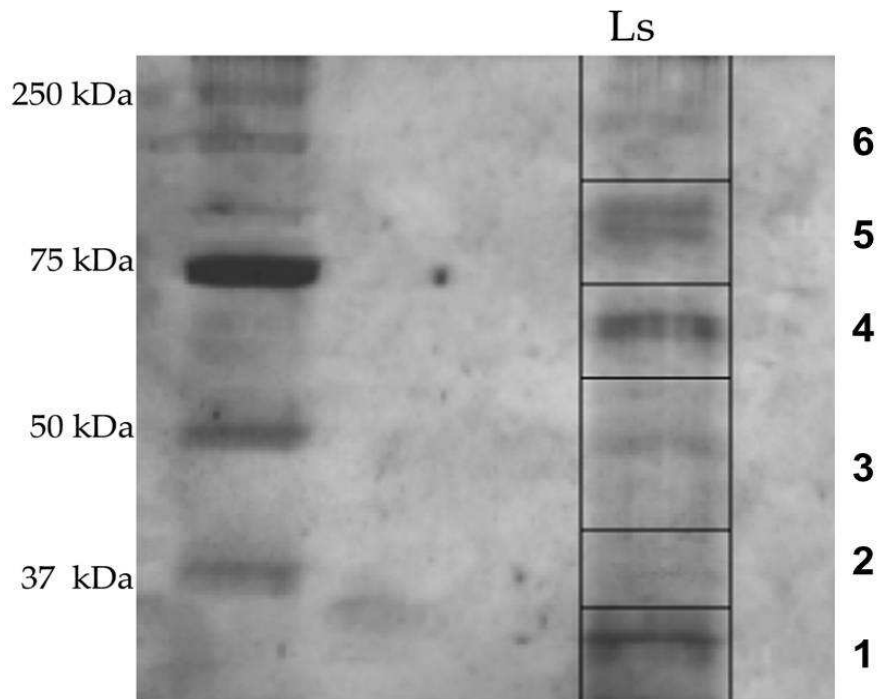


Figura 19. Gel de electroforesis. Treinta microgramos de la secreción total de *L. spectabilis* se resuspendieron en buffer Laemeli. La mezcla de proteínas fue separada en 15 % SDS-PAGE y el gel teñido con azul de Coomassie durante la noche. Después de desteñir, el gel se dividió en seis partes, cada parte se redujo con DTT, se alquiló con iodoacetamida y se sometió a digestión con tripsina.

Tabla 4. Secuencias parciales e identificación de los péptidos trípticos, obtenidos a través del análisis manual de las fragmentaciones obtenidas por el sistema LC-MS de los spots del gel de electroforesis.				
Tiempo de retención (min)	Ion precursor (Z^{2+})	MW	MS/MS-secuencia derivada	Identificación del péptido
Spot 1				
21.89	529.33	1056.66	PYPYIVGAAAK	gb ABK91548.1 brevinin-1Sb precursor [Rana sphenoccephala]
22.40	599.29	1196.58	LDSYFSSK	
24.08	792.98	1583.96	TTLAPNLLSTLK	
24.11	586.77	1171.54	DQHEDLEMR	
21.64	612.33	1222.66	TGQGADALYVTK	
21.68	410.23	818.46	LVCTAAGK	
23.49	495.29	988.58	LLQSQCLK	
23.89	560.78	1119.56	TFLDTYCAK	
22.57	452.25	902.50	LGLDDATAK	gb EEE31305.1 cullin, putative [Toxoplasma gondii VEG] ref ZP_01043384.1
38.43	691.92	1381.84	LFGVLDYTK	ref ZP_05091198.1 transcriptional regulator, TetR family [Ruegeria sp. R11]
39.20	897.51	1793.02	ANLVCTGLTS	
Spot 2				
7.12	1072.01	2143.02	DLPGNEGVDSWYK	
7.28	894.99	1787.98	CALAGNLLQSECLK	
7.56	679.40	1356.80	LLAECLLQK	ref NP_001088170.1 tetratricopeptide repeat protein 39B [Xenopus laevis]
7.65	591.31	1180.62	LFAECLTEAK	
7.73	965.53	1929.06	LPALGNVVCAYNK	
7.87	801.94	1601.88	TDVASGLSTLLGK	
7.91	706.34/784.39	1410.68/1566.78	EVGYGVATDGKR	ref NP_001088541.1 GLI pathogenesis-related 2 [Xenopus laevis]
8.21	580.81	1159.62	GATGVASGLSK	
9.03	527.77	1053.54	FSCNQATK	
9.45	549.35	1096.70	LAPDLLNLTK	
21.26	794.92	1587.84	ALGEALGLPTDK	
21.42	835.89	1669.78	EDGNVENYNAAA	ref NP_001025505.1 ring finger protein 38 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
21.60	703.41	1404.82	LDGV/VLNHLNLK	
21.98	574.81	1147.62	NSGATGVASGLSK	
22.53	795.94	1589.88	QTDVASGLSTLLGK	
23.66	522.84	1043.68	LGYLLPALGK	
23.75	1221.71	2441.42	LVSAGGTGVEA/LATGL ELLK	
28.08	690.35	1378.70	EASFLSAHNK	
Spot 4				
10.62				
10.68	566.32	1130.64	ATLANDATGAVK	
10.73	542.92	1625.76	ALGLPTDK	
10.90	390.23	778.46	VAEVSFK	
12.97	503.29	1004.58	DLQMNLAGK	
25.72	733.41	1464.82	VMVPPNVPEADAVK	peroxiredoxin 6 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
25.82	509.28	1016.56	LLQDQCLK	
25.96	558.80	1115.60	SPCLQEALAK	
26.40	693.89	1385.78	DLAQLGVNVVACK	gb ACZ44705.1 esculentin-2 Bla precursor [Rana pipiens]
RT:26.44	516.30	1010.60	KLGLDDATAK	
27.52	680.39	1358.78	EAGDLINTLNTAK	dbj BAD17908.1 triose phosphate isomerase [Lepisosteus osseus]
Spot 5				
19.76	507.25	1012.50	TYMTVGDAR	
Spot 6				
1.20	786.92	1571.84	ALGEALGLPTDK	
1.31	593.36	1184.72	AGQLLDTLK	gb ABX58951.1 pleurain-M2 antimicrobial

				peptide precursor [Rana pleuraden] Length=72
78.35	621.66 Z3+	1862.98	NDSSDAVFVDVLTDTK *	ref XP_002126059.1 similar to Pancreatic lipase-related protein 2 precursor

6.7. Búsqueda de similitud de secuencia

Las secuencias de los péptidos Ls1 a Ls-5 fueron sometidas al programa FASTA de la Universidad de Virginia utilizando el banco de datos público SwissProt, que permitió la identificación 3 de ellos como Ranatuerina-like y uno como brevenina, con un porcentaje aproximadamente el 80 % de similitud de secuencia. La secuencia del componente denominado Ls-1 no presentó similitud estructural significativa con ninguna molécula conocida de anfibio. Las secuencias de los péptidos que presentaron similitud estructural con péptidos de anfibios fueron seleccionadas para realizar un alineamiento, las tres secuencias que presentaron mayor porcentaje de similitud de secuencia fueron seleccionadas y sometidas a alineación a través del programa Clustal 2.0.12 cuyo resultado es presentado en la Figura 20

```

Ls-2_
sp|Q1JS90.1|RN2VB_RANVE      GIMDTLKGVAKTVAASWLDKLCCKITEC 28
sp|P82840.1|RN2B_RANBE      GIMDTVKGVAKTVAASLLDKLCCKITGC 28 89%
sp|P85053.1|RNS2C_RANSV     GLLDTIKGVAKTVAASMLDKLCCKISGC 28 79%
                                GIMDTIKDTAKTVAVGLLNKLCCKITGC 28 71%
                                *::**:*..*****.. *:*****: *

Ls-3_
sp|Q1JS90.1|RN2VB_RANVE      GLMDTVKGVAKTVAASWLDKLCCKITEC 28
sp|P82840.1|RN2B_RANBE      GIMDTVKGVAKTVAASLLDKLCCKITGC 28 89%
gb|ACA81695.1|                GLLDTIKGVAKTVAASMLDKLCCKISGC 28 82%
                                GLMDAAKNVAKNVAATLLDKLCCKIT-- 26 77%
                                *::*: *.***.***: *****:

Lsp-4_
gb|ACZ44726.1|                GLMDTVKNAAKNLAGQMLDKLCCKITGSC 29
gb|ACZ44725.1|                GLMDTVKNAAKNLAGQMLDKLCCKITGSC 29 100%
gb|ABB89055.1|                GLMDTVKNVAKNLAGHMLDKLCCKITGSC 29 93%
                                GLMDTVKNVAKNLAGHMLDKLCCKITG-- 27 93%
                                *****.*****:*****

Lsp-5_
gb|ABK91548.1|                FLPAIVGAAAKFLPKIFCAISKKC 24
sp|P82905.1|BR1SB_RANSP      FLPAIVGAAAKFLPKIFCAISKKC 24 100%
sp|P82837.1|BR1BE_RANBE      FLPAIVGAAGKFLPKIFCAISKKC 24 96%
                                FLPAIVGAAAKFLPKIFCVISKKC 24 96%
                                *****.*****.*****

```

Figura 20. Alineación de péptidos antimicrobianos con la secuencia de los componentes Ls-2 a Ls-5. La alineación múltiple fue realizada a través del programa CLUSTAL 2.0.12.

6.8. Síntesis del péptido Ls- 3

El péptido seleccionado para realizar ensayos antimicrobianos fue el denominado como Ls-3. Se decidió mandar a realizar la síntesis de este péptido con la compañía RS Synthesis, debido a que la cantidad aislada de péptido después de realizar varias extracciones fue de tan solo 70 µg, cantidad insuficiente para realizar ensayos antimicrobianos, la compañía nos proporcionó un total de 5 mg de péptido, con una pureza de 96.5 %.

En el laboratorio se realizaron pruebas para confirmar la pureza y además que el puente disulfuro presente en el péptido nativo, debido a la presencia de cisteínas en la secuencia: **GLMDTVKGVAKTVAASWLDKLCCKITEC**, estuviera también formado en el péptido sintético, para ello se procedió a mezclar una cantidad igual de péptido sintético y péptido nativo, resuspender esta mezcla en 100 µl de agua e inyectar en el HPLC, el resultado obtenido fue la presencia de solo un pico principal (Figura 21), con un tiempo de retención de 43.09 min similar al que presenta el péptido natural Ls-3 en la purificación por HPLC del extracto total el cual fue de 43.11min.

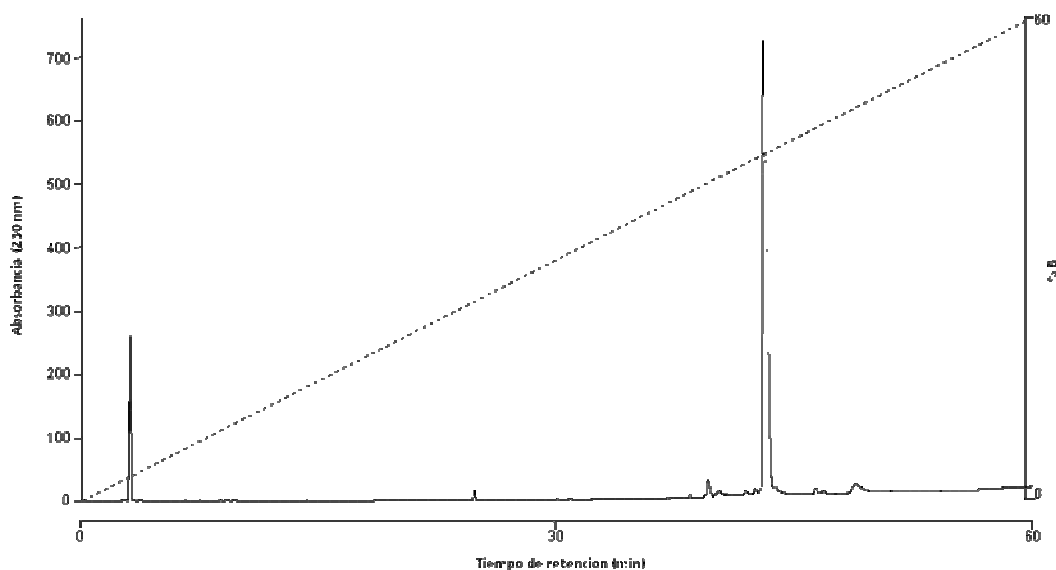


Figura 21. Purificación por HPLC de fase reversa del péptido nativo más el péptido sintético. Separación HPLC en una columna C18 de fase reversa flujo de elución de 1 ml/min en 60 min con un gradiente lineal de solvente A (0.12% TFA en agua) a 60% de solvente B (0.10% TFA/acetonitrilo). Los componentes marcados fueron secuenciados completamente.

Otra manera de confirmar la formación del puente disulfuro, es por medio de espectrometría de masas, de igual manera se mezclaron cantidades iguales de péptido nativo y sintético, y se inyectó en el espectrómetro de masas, en donde únicamente se observó la presencia de una masa monoisotópica de 3005.66, lo cual confirma la presencia del puente disulfuro, debido a que no hay diferencia de masa, lo que se esperaría que ocurriera si el puente disulfuro no estuviera presente en el péptido sintético. En la Figura 22 se observa la distribución de cargas de la mezcla del péptido sintético y el péptido nativo, la cual tiene la misma distribución que se observa en el péptido natural (Figura 11A), mayor presencia de la carga 5 y menor de la 3, lo cual indica que las moléculas natural y sintética se ionizan de la misma manera.

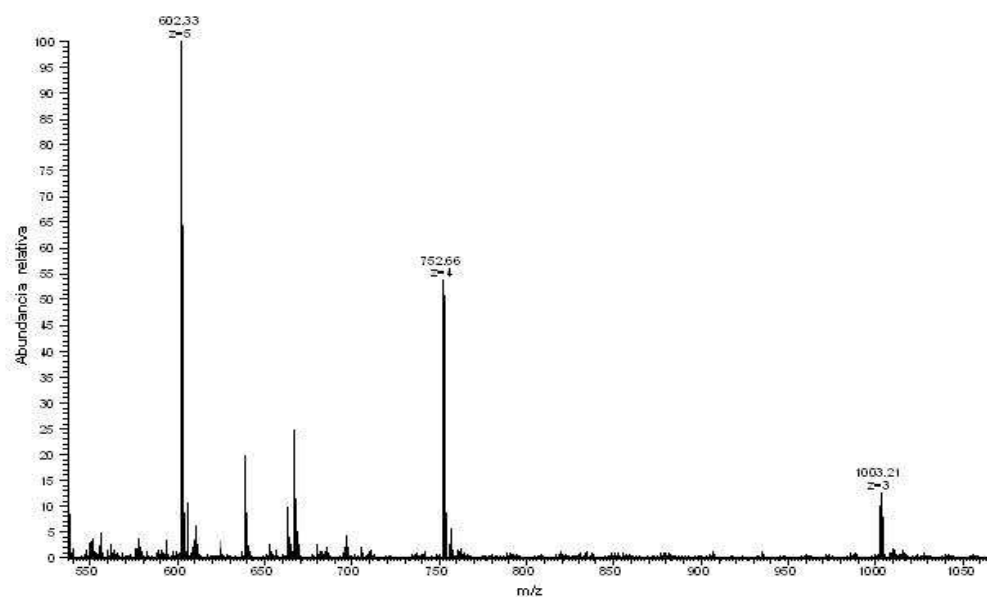


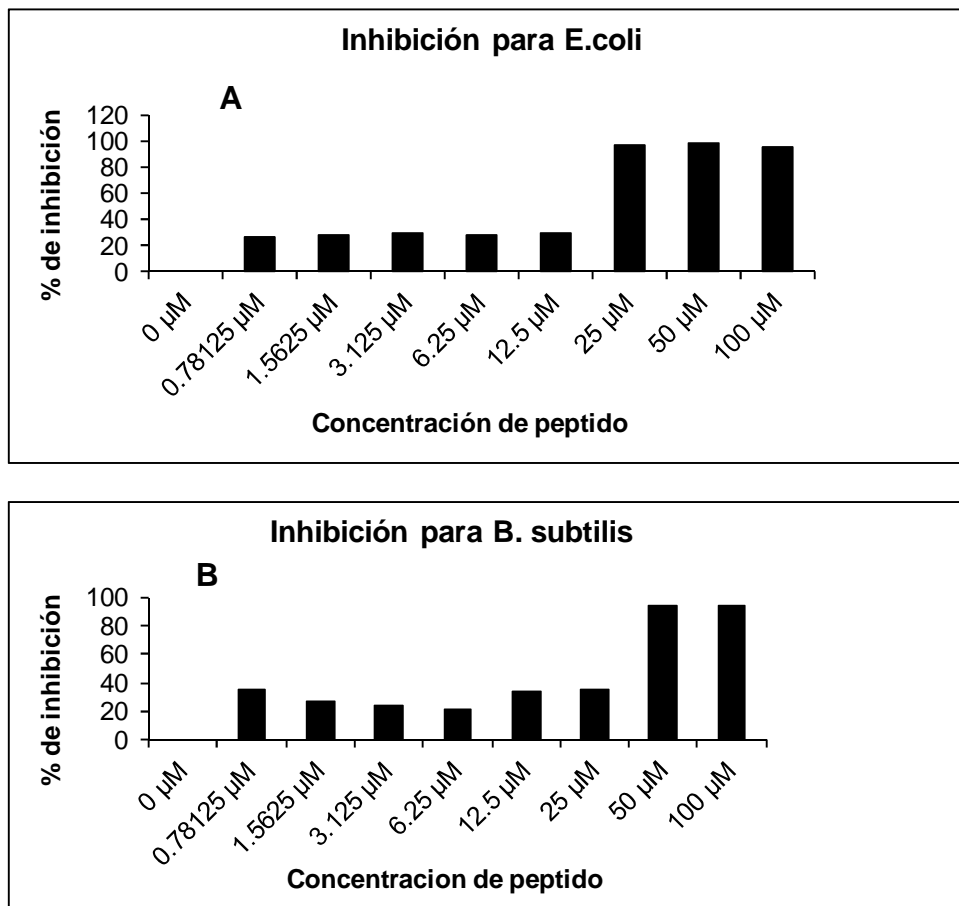
Figura 22. Distribución de cargas de la mezcla de péptido nativo y sintético. “Full scan” donde se observan las cargas 3, 4 y 5, con una relación masa/carga de 1003.21, 752.66 y 602.33 respectivamente.

6.9. Ensayos antibacterianos

Se realizaron ensayos antibacterianos con el péptido Ls-3 y con Ls-1. A pesar de no encontrar similitud estructural del péptido Ls-1 con alguna molécula de anfibio, como se contaba con la cantidad suficiente para realizar los ensayos antibacterianos se decidió también realizar los ensayos, pero este péptido no presentó actividad contra ninguna de las bacterias probadas.

En cuanto al péptido sintético Ls-3, después de confirmar la pureza del péptido y la presencia del puente disulfuro, el péptido fue utilizado para realizar ensayos antibacterianos. Se realizó el ensayo por triplicado con tres bacterias, *E. coli*, *S. enterica*, y *Basillus subtilis*, las tres bacterias presentaron inhibición de crecimiento cuando el péptido fue adicionado. De acuerdo a los estándares del Instituto de Estándares Clínicos y de

Laboratorio [103], que define la concentración inhibitoria minima (CIM) como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico, se estableció la CIM en 25 μM contra *E. Coli*, 50 μM para *S. enterica* y 50 μM contra *B. subtilis*, esto mediante la observación de las placas. Adicional a esto se realizaron determinaciones del porcentaje de inhibición del péptido a las diferentes concentraciones, utilizando los datos de las lecturas de turbidez de las placas. En la Figura 23 se muestran las gráficas donde se puede apreciar el porcentaje de inhibición de crecimiento de las bacterias.



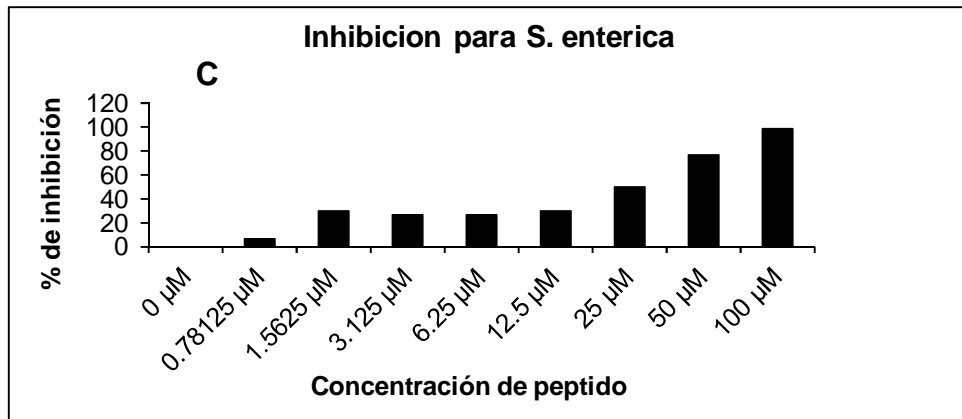


Figura 23. Porcentaje de inhibición del péptido sintético contra las tres bacterias. (A) % de inhibición contra *E.coli*. CIM 25 μM . (B) % de inhibición contra *B. subtilis*. CIM 50 μM . (C) % de inhibición contra *S. enterica*. CIM 50 μM .

6.7. Ensayos Antiparasitarios

Ensayos antiparasitarios contra oocinetos de *P. berghei* fueron realizados con resultados positivos. En la figura 24 se muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito cuando el péptido Ls-3 se adiciona a diferentes concentraciones, los ensayos fueron realizados por duplicado.

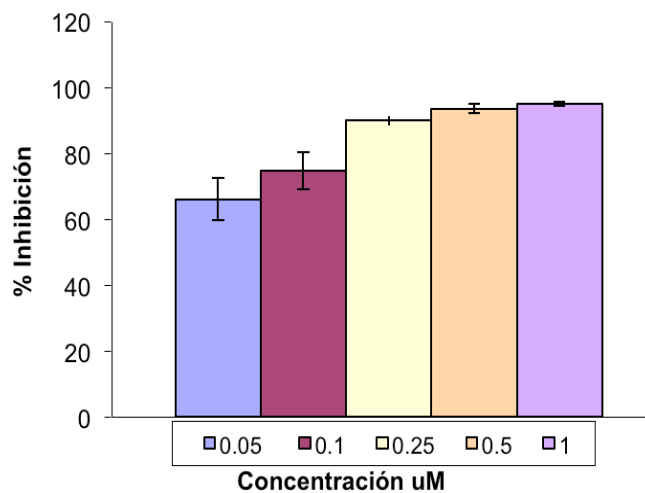


Figura 24. Porcentaje de inhibición del péptido sintético contra oocinetos de *P. berghei*.

6.7. Ensayos de citotoxicidad contra células de cáncer y monocitos

Los ensayos de citotoxicidad muestran que el péptido Ls-3 tiene una actividad citotóxica mayor para celular cancerígenas que para monocitos humanos.

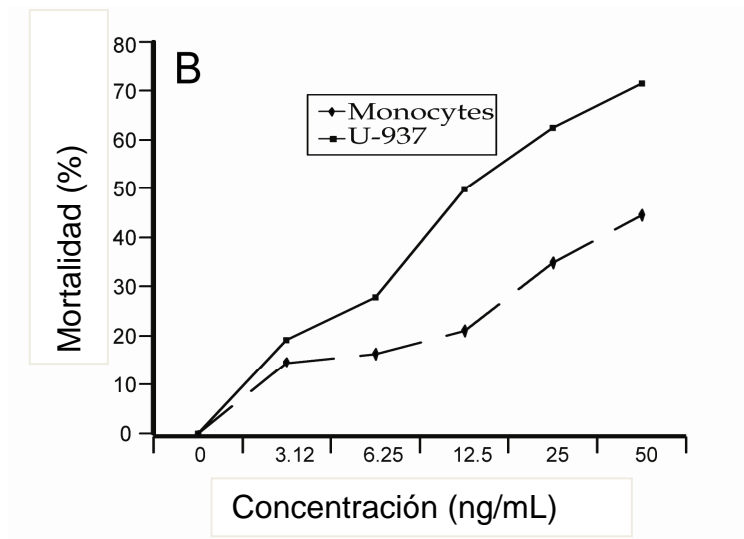


Figura 25. Porcentaje de mortalidad del péptido sintético contra células de cáncer y monocitos humanos.

7. DISCUSIÓN

México forma parte del grupo de los países megadiversos, ya que poseen casi el 70 % de la diversidad del planeta. Nuestro país se encuentra en la quinta posición y en cuanto a diversidad de anfibios México tiene actualmente el cuarto lugar [105]. Por esto, es importante el estudio de las especies sobre todo aquellas que son endémicas. En este trabajo se presenta el estudio de la secreción de la piel de la rana endémica de México *L. spectabilis*. Esta rana fue elegida porque además de ser una especie mexicana, es encontrada en el estado de Morelos, en donde coexisten varias especies de anfibios distribuidos de acuerdo al tipo de vegetación. La localidad seleccionada en el municipio de Tlaltizapan, fue debido a reportes que indican la presencia de la rana en este lugar [106], y por ser un lugar de fácil acceso para la colecta de las especies.

En estudios de ranas *Lithobates* se reporta la presencia de péptidos de la familia brevenina-1 y ranatuerina-2 en *Lithobates blairi* y *Lithobates yavapaiensis* [107]. En este estudio mostramos un procedimiento que permitió determinar varios componentes en la secreción de *L. spectabilis*, tanto de bajo y alto peso molecular.

El método de separación por HPLC con columnas C18 de fase reversa ha sido ampliamente utilizado para separar péptidos en base a propiedades de hidrofobicidad [108]. En la separación por HPLC fase reversa los tiempos de retención son dependientes de la hidrofobicidad de los componentes, los más hidrofílicos son los primeros en eluir y componentes hidrofóbicos eluyen después [109], así, los péptidos de la secreción se encuentran en la parte intermedia y final del cromatograma, mostrando cierto grado de hidrofobicidad. Los componentes marcados en el cromatograma de HPLC (Figura 8) muestran diferentes grados de hidrofobicidad debido a que eluyen entre 25 y 55 minutos de tiempo de retención.

En general los trabajos publicados sobre secreción de ranas no se enfocan a la determinación general de masas moleculares, sino a lograr la secuencia completa de unos cuantos péptidos [110]. Sin embargo, estudios peptidómicos a larga escala permite la determinación de prácticamente todos los componentes presentes en una mezcla compleja. En este trabajo la secreción cutánea de *L. spectabilis* fue analizada por el sistema LC-MS/MS, encontrándose más de 250 masas moleculares únicas. Basado solamente en este análisis de masas moleculares es posible predecir que muchos de los componentes presentes en la secreción probablemente son péptidos, ya que las principales familias de PAMs poseen masas moleculares entre 2,5 y 3,5 kDa. Aunque la determinación de una huella digital de masas moleculares de una secreción total de anfibios pueda indicar la presencia de determinados péptidos bioactivos, solamente la determinación de la estructura primaria de estos componentes a través de la secuenciación por métodos de disociación por espectrometría de masas, y/o por secuenciación por degradación de Edman puede identificar de forma inequívoca sus identidades estructurales y por ende sus posibles actividades farmacológicas [111].

La determinación de las masas mediante el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL acoplado a RP-HPLC, fue eficiente, comparado con estudios previos en los cuales se usó la metodología de aislamiento por RP-HPLC, e inyecciones individuales en un espectrómetro de masas [81,112]. La metodología por LC-MS permite disminuir los tiempos de uso de equipo, realizando solo una corrida automática (Figura 13), obteniendo así una cantidad importante de espectros de masas y después de ser analizados, se obtienen las masas moleculares de los componentes de la secreción. También se logra detectar una mayor cantidad de masas, esto demostrado en base a un análisis paralelo en donde las 74 fracciones obtenidas de la separación por HPLC (Figura 8) fueron inyectadas de

manera individual al espectrómetro de masas (dato no mostrado); las masas de ambas muestras coinciden, pero en la muestra ensayada en LC-MS se encuentra una mayor cantidad de masas, esto debido a la mayor sensibilidad del Orbitrap XL [113], también en gran parte a que mediante la técnica clásica, la recolección de fracciones se realiza de manera manual, lo cual puede ocasionar que muchas fracciones puedan ser descartadas, por otro lado la manipulación posterior, como almacenamiento y repurificación de las muestras es otro factor para que los componentes que se encuentren en menor abundancia puedan perderse.

La cantidad de material a manejar es otra ventaja de la metodología por LC-MS, ya que disminuye considerablemente; en la metodología por inyecciones individuales, se obtienen una gran cantidad de fracciones de la purificación por HPLC que deben guardarse hasta su posterior análisis espectrométrico, en cambio con el sistema que acopla la separación por HPLC al espectrómetro de masas se trabaja directamente con la secreción total y se logra igualmente la separación de los péptidos y detección de las masas [114]. Mediante este procedimiento la mayor parte del trabajo es el análisis de los archivos y no la manipulación de las fracciones. Por lo que podemos afirmar que si se cuenta con un sistema LC-MS, esta metodología es la más adecuada para analizar las masas presentes en secreciones de rana.

La espectrometría de masas es bastante eficiente para secuenciar PAMs [115]. Se requieren pocos pasos para realizar el procesamiento de la muestra, además obtener la secuencia completa es mucho más viable que cuando se trata de una proteína. En nuestro trabajo todas las secuencias fueron obtenidas con espectrometría de masas (Figura 12). Los métodos de fragmentación usados fueron CID y HCD debido a que usados en conjunto permiten una mayor cobertura de secuencia de péptidos no conocidos. La fragmentación por CID, un método usado para

la secuenciación de proteínas [116], tiene la desventaja de no detectar los iones en la región de bajo peso molecular [117]; pero usada en conjunto con HCD se logra secuenciar la región de bajo peso de la molécula [118]. Estas dos métodos de fragmentación son una herramienta importante para la secuenciación *de novo* de proteínas y péptidos. Pero debido a que una de las principales dificultades cuando se realiza secuenciación con fragmentaciones MS es la presencia de masas isobaricas correspondientes a leucina e isoleucina, en algunos casos también se usó el método de degradación automática de Edman.

De los tres BRPs mostrados en la Figura 12, el B1 corresponde a la secuencia canónica de bradicinina y es encontrado en muchas especies de ranas así como en otros animales. B3 es conocido como [Thr⁶]-bradicinina y es muy común en varias especies, está presente en el veneno de abejas y en la secreción de la piel de varias ranas [119]. Se sabe que la sustitución de serina por treonina no afecta la función de la bradicinina [120]. Sin embargo B2 tiene propiedades especiales, es conocida como [Thr⁶, Leu⁸]-bradicinina, y cuenta con dos aminoácidos diferentes, este péptido no ha sido reportado en anfibio alguno, pero si ha sido encontrado en la sangre de aves, esto indica que dicha cinina podría ser específica para aves depredadoras de ranas, ya que la bradicinina canónica y la [Thr⁶]-bradicinina no tienen efecto en aves, pero un estudio reporta que [Thr⁶, Leu⁸]-bradicinina provoca hipotensión e induce la contracción del musculo liso en pollos [121].

De acuerdo a lo anterior parece que los BRPs que son comunes en secreciones de la piel de ránidos, aparecen en diferentes especies sin mostrar relaciones entre ellos, más bien se piensa que las diferencias en la secuencia pueden deberse al tipo de depredador al que están expuestos anfibios u otros animales [122].

Los péptidos de las familias: rantuerina-2, brevenina-1 y esculentina-2, son los más abundantes en la secreción cutánea de la rana *L. spectabilis* (Tabla 2). El péptido antimicrobiano ranatuerin-2Ya de *L. yavapaiensis* [107], tiene un porcentaje de similitud de secuencia de 92.85% con el péptido Ls-3 caracterizado en este estudio. Los análisis de las secreciones de las ranas *L. vaillanti*, *L. palmipes* y *L. tarahumarae*, muestran un alto grado de similitud de secuencia entre si [123], mientras que si se analizan estos mismos péptidos con los pertenecientes *Rana temporaria*, no se observa una alta similitud de secuencia. La secreción de la *Rana temporaria* se compone principalmente de PAMs denominados temporinas [124]. Mientras que ranas del género *Lithobates* tienen principalmente péptidos de las familias brevenina-1 y ranatuerina-2. Estos estudios concuerdan con la división propuesta por Frost [102], para reclasificar a estas ranas y otras más, anteriormente pertenecientes al género *Rana*, en el género *Lithobates*.

El análisis de los péptidos no solo sirve para la clasificación por géneros, sino además es claro que la información de los péptidos encontrados en la secreción puede servir para la identificación de especies cercanas que son difíciles de identificar mediante patrones morfológicos; aunque este punto aún no es ampliamente aceptado [125]. Un ejemplo son las ranas *L. spectabilis* y *Lithobates forreri*, ambas han sido estudiadas en nuestro laboratorio. Estas ranas son muy parecidas morfológicamente, pero al estudiar la secreción, los perfiles cromatográficos de HPLC difieren, también difiere la cantidad de masas y el tipo de péptidos encontrados. Esta metodología podría ser utilizada para la identificación de las ranas en casos donde no se tiene la certeza de la especie que se encuentra en cierta región. La técnica de estimulación eléctrica por ser una técnica no invasiva, sirve incluso para estudiar ranas que se encuentren en peligro de extinción.

Se ha demostrado que cuando no se adicionan inhibidores de proteasas los péptidos presentes en las secreciones de rana sufren degradación [126], en este estudio encontramos el mismo comportamiento. Los péptidos presentados en la Tabla 2 indican la degradación de los péptidos presentes en la secreción. Muchos fueron secuenciados completamente y tienen alta similitud de secuencia con PAMs, pero de masas moleculares muy superiores; además varios de estos péptidos truncados corresponden a fragmentos de los 4 PAMs secuenciados (Figura 15). Este comportamiento está también respaldado por los resultados de la comparación de las muestras de secreción sin inhibidores de proteasas y con inhibidores de proteasas; donde se puede ver que a pesar de que los perfiles cromatográficos de HPLC (Figura 16) son prácticamente iguales, la cantidad de masas presentes en la secreción que contiene los inhibidores de proteasas, disminuyó significativamente (Tabla 3), aunque ambas secreciones tienen en común aproximadamente el 50 % de las masas (Figura 18).

La explicación de la variación en el número de masas, pero no en el espectro de HPLC es, porque el espectrómetro de masas puede detectar la presencia de componentes que se encuentren en una cantidad muy pequeña, mientras que mediante HPLC estos componentes no son detectados. Otro punto que indica la degradación de los péptidos es, que la mayoría de los péptidos truncados presentados en la Tabla 2 tienen masas que se encuentran en el rango de 1000 a 2000 Da, esas masas son las más abundantes en la secreción de la rana sin adición de inhibidores de proteasas; pero la secreción con inhibidores de proteasas, muestra una disminución en ese rango de masas, como se observa en la Figura 17. Cabe destacar que las masas de los péptidos truncados no aparecen en las encontradas en la secreción de la rana con inhibidores de proteasas (Tabla 3), pero algunos sí son detectadas en la lista de masas obtenidas de la secreción sin inhibidores de proteasas (Tabla 1). Estas diferencias apuntan a que la secreción de la rana *L. spectabilis*, al igual

que se ha reportado en *Xenopus laevis* [127] contiene proteasas. Las proteasas se encuentran presentes debido a que la biosíntesis de los PAMs requiere el procesamiento de los largos precursores a fragmentos más pequeños [128]. Las proteasas que son las responsables de crear los PAMs maduros, también pueden ser las mismas encargadas de crear estos péptidos truncados. Pero la generación de péptidos cortos puede no ser únicamente un producto fortuito de la acción de las proteasas, sino que pueden estar implicados en otras funciones. Existen reportes de péptidos cortos que tienen actividad antimicrobiana y en muchos casos estos péptidos cortos pueden actuar en conjunto [129,130]. Otro reporte indica que un péptido corto encontrado en *Odorrana grahami* muestra actividad inhibitoria de la serina proteasa [131]. Aparentemente en *Odorrana grahami*, los PAMs e inhibidores de proteasas tienen una estructura similar y un ancestro común. El péptido de dicho estudio está compuesto de 11 aminoácidos y forma un puente disulfuro, que asemeja los péptidos de *L. spectabilis* truncados C-terminal con dos cisteínas en la misma posición (Figura 15). La alineación mostrada en la Figura 15, se realizó únicamente con aquellos péptidos de secuencia completa, la mayoría de los C-terminales con dos cisteínas, corresponden a fragmentos de los cuatro PAMs secuenciados en este estudio. Para demostrar si estos péptidos truncados funcionan como inhibidores de proteasas al igual que en *Odorrana grahami* se requieren estudios adicionales. Si esto fuera cierto, se propone que las proteasas generan sus mismos inhibidores, encontrándose de esta manera en un fino equilibrio.

Las glándulas de tipo granular de la piel de la rana, son el sitio de síntesis de un amplio número de compuestos, muchos de los cuales están destinados a la protección contra microorganismos y depredadores, pero además de moléculas destinadas a la protección, en estudios previos se han encontrado pequeñas proteínas en la secreción de la piel de ranas, las cuales al igual que los péptidos presentan características

antimicrobianas [132]; más sin embargo, en ningún trabajo se había reportado la presencia de proteínas que participaran en otras funciones; nosotros reportamos la presencia de proteínas que pueden estar implicadas en mantener el equilibrio de la secreción (Tabla 4); como por ejemplo cullin, una proteína que aparentemente forma un complejo con la proteína RING, también detectada en este estudio, este complejo está relacionado en la modificación postraduccional de proteínas [133]. Además de proteínas que participan en otras funciones, como la peroxirredoxina, proteína que de igual manera fue encontrada en la secreción de *L. pustulosus*, y en *Xenopus laevis* [134]. Esta proteína puede participar en la reducción de peróxidos generados por la exposición de la piel de la rana a los rayos ultra violeta [135]. También están presentes como era esperado precursores de PAMs.

En cuanto a la presencia de proteasas, aunque todo parece indicar que la secreción de la rana las contiene, no podemos afirmar que estén presentes. Se encontró similitud de secuencia con varias proteasas, lo cual concuerda con la degradación de péptidos en la secreción de la rana, pero debido a que la identificación dio un bajo porcentaje de similitud de secuencia, no se puede afirmar con certeza que las secuencias encontradas correspondan a proteasas, por lo que no fueron incluidas en la identificación. En algunas ocasiones esto se debe a la desventaja de analizar péptidos trípticos ya que produce fragmentos muy pequeños y muchas veces no es posible determinar de manera segura la identidad de una proteína.

De los PAMs secuenciados totalmente, el Ls-5 ya había sido reportado y se han realizado estudios previos en *L. blairi* [107], este péptido tiene actividad contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. En *L. blairi* [136] a través del RNA mensajero se dedujo la secuencia que reportamos para el péptido Ls-4, pero esta es la primera vez que el péptido es encontrado en un anfibio. Ambos péptidos tienen alta similitud con otros donde

únicamente hay cambio de un aminoácido por otro que comparte características fisicoquímicas (Figura 20).

Contrario a lo encontrado con Ls-4 y Ls-5, los péptidos Ls-2 y Ls-3 no han sido reportados. Aunque si hay péptidos que comparten similitud de secuencia, estos dos péptidos contienen un triptófano en su secuencia en la posición 17 y un ácido glutámico en la posición 27, aminoácidos que no se encuentran en ninguno de los péptidos con los que comparten similitud de secuencia (Figura 20). La presencia de estos aminoácidos inusuales, fue la razón para elegir al péptido Ls-3 para los ensayos antibacterianos, además de ser su secuencia la primera en obtenerse.

Consistente con lo esperado en ranatuerinas [137, 138], el péptido Ls-3 mostro actividad contra bacterias Gram-positivo y Gram-negativo (Figura 23). Pero la concentración mínima inhibitoria resulta demasiado alta comparada con el péptido con mayor similitud de secuencia a Ls-3, el cual fue testado contra *E. coli* y tuvo una CIM de 2 μM [139], mientras que Ls-3 tiene una CIM contra *E.coli* de 25 μM (Figura 23). Sin embargo, este péptido muestra buenos resultados en los ensayos antiparasitarios y en los estudios de actividad citotóxica contra células de cáncer, encontrándose entre uno de los péptidos más activos. También es posible que la actividad antimicrobiana no sea la principal de este péptido, como se han detectado en algunos péptidos que tienen otras funciones [140]. Hasta la fecha, estos péptidos han sido llamados antimicrobianos porque esa fue la primera actividad descubierta y los estudios posteriores se han dirigido básicamente a buscar esta actividad. Pero hay reportes que indican que estos péptidos quizás no tengan tanta importancia como hasta ahora es pensado en su participación en la inmunidad innata [141]. De esta manera, existe la posibilidad de que los péptidos presentes en las secreciones de anfibios, tengan otras funciones biológicas adicionales a las ya reportadas [142].

Aunque el péptido Ls-1 no presento actividad contra ninguna de las bacterias probadas, es posible que este péptido juegue un papel importante debido a su abundancia, de la misma manera que se ha observado en péptidos que presentan un alto nivel de expresión en determinadas circunstancias [143]; además de que, como se indicó anteriormente, los péptidos en las secreciones de ranas, pueden cumplir funciones adicionales a las antimicrobianas, estudios adicionales son necesarios para encontrar la función biológica del péptido Ls-1.

Actualmente solo un pequeño número de especies de ranas han sido estudiadas en México y en el planeta; y es de esperarse que en las especies no estudiadas, puedan encontrarse nuevos péptidos bioactivos. Lo observado con la secreción de *L. spectabilis*, demuestra que esta una fuente rica de moléculas bioactivas con enorme potencial, que deben ser explorados en busca de otras aplicaciones. Nuestro análisis demuestra la importancia de estudiar las especies mexicanas.

8. CONCLUSIONES

- Utilizando un método LC-MS se obtuvo la huella digital de las masas moleculares, encontrando 253 masas únicas en la secreción de *L.spectabilis*.
- Se obtuvo la secuencia parcial y completa e identificación de 71 componentes que indica el tipo de péptidos bioactivos presentes en la secreción de la rana *L. spectabilis*, los cuales pertenecen a las familias de PAMs: rantuerina-2, brevenina-1, brevenina- 2, esculentina-2 y péptidos de anfibios relacionados con bradiginina.
- Usando los métodos de disociación CID y HCD, además de la degradación automática de Edman, se obtuvo la secuencia completa de 8 péptidos, cuatro péptidos identificados como antimicrobianos y tres como BPRs.
- En base a la comparación de huellas digitales de las secreciones con y sin inhibidores de proteasas, se sugiere que la secreción de la rana tiene proteasas, aunque no se logró identificar claramente alguna de estas.
- En la secreción de la rana, se observa la presencia de péptidos truncados que contienen cisteínas y pertenecen al C-terminal de los péptidos caracterizados, esta región es conservada ya que la presencia de las cisteínas impide que sean degradados por la acción de las proteasas.
- Mediante separación por SDS-PAGE y secuenciación por MS se obtuvieron 43 secuencias parciales de proteínas en la secreción de la rana. Se obtuvo la identificación de 11 proteínas que pueden participar en el procesamiento de los PAMs.

- El péptido Ls-3, es un péptido nuevo completamente caracterizado que mostro resultados positivos en actividad antibacteriana, antiparasitaria y citotoxicidad contra células de cáncer.

9. PERSPECTIVAS

- Buscar nuevos PAMs en diferentes especies del país. Secuenciar completamente la mayor cantidad de péptidos antimicrobianos que se encuentren en la secreción de la ranas.
- Realizar ensayos antimicrobianos, antiparasitarios y contra células cancerosas de todos los péptidos secuenciados completamente.
- Probar los péptidos en conjunto con otros antimicrobianos para conocer la actividad sinérgica de los péptidos.
- Construir péptidos sintéticos, utilizando librerías de cDNA.
- Realizar ensayos con otros péptidos bioactivos, como los BRPs para encontrar nuevas aplicaciones.

ABREVIATURAS

BRPs	Péptidos relacionados a bradicinina
CID	Disociación Inducida por Colisión
DS	Dermaseptinas
DTT	Ditiotreitol
ESI	Ionización por electro spray
FQ	Fibrosis quística
HCD	Disociación por Alta Energía de Colisión
kDa	Kilo daltones
LC-MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas
LPS	Lipopolisacaridos
LV	Leishmaniasis cutánea
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Corriente total de iones
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
TLR	Receptores Tipo Toll

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Imágenes obtenidas por Microscopia Electrónica de Barrido de las glándulas presentes en la piel de anfibios.	6
Figura 2	Modelo “barrel-stave”.	14
Figura 3	Modelo “toroidal pore”.	14
Figura 4	Modelo “carpet”.	15
Figura 5	<i>L. spectabilis</i> .	23
Figura 6	Distribución de la rana <i>L. spectabilis</i> .	24
Figura 7	Secuenciación de péptidos por espectrometría de masas.	29
Figura 8	Purificación por HPLC de fase reversa de la secreción de la rana <i>Lithobates spectabilis</i> .	34
Figura 9	Purificación de los componente Ls-1 y Ls-3.	35
Figura 10	Análisis por espectrometría de masas del péptido Ls-1.	36
Figura 11	Análisis por espectrometría de masas del péptido Ls-3.	38
Figura 12	Secuencia de aminoácidos de péptidos aislados de la secreción de la rana <i>L. spectabilis</i> .	39
Figura 13	Cromatograma tipo TIC (Total Ion Current) del análisis por LC-MS de la secreción total del anfibio <i>L. spectabilis</i> .	40
Figura 14	Cromatograma tipo TIC (Total Ion Current) del análisis por LC-MS de la secreción total reducida y alquilada del anfibio <i>L. spectabilis</i> .	43
Figura 15	Fragmentos C-terminales que contienen cisteínas agrupados de acuerdo al extremo del péptido que pertenecen.	45
Figura 16	Figura 16. Purificación por HPLC de fase reversa de la secreción de la rana <i>L. spectabilis</i> . (A) sin adicionar inhibidores de proteasas. (B) con inhibidores de proteasas.	47
Figura 17	Comparación de la distribución de masas moleculares de la secreción de la rana <i>L. spectabilis</i> con y sin inhibidores de proteasas.	48
Figura 18	Diagrama de Venn. Masas de la secreción sin inhibidores de proteasas (A) y con inhibidores de proteasas (B).	48
Figura 19	Gel de electroforesis.	49
Figura 20	Alineación de péptidos antimicrobianos con la secuencia de los componentes L-2 a Ls-5.	51
Figura 21	Purificación por HPLC de fase reversa de péptido nativo más sintético.	53
Figura 22	Distribución de cargas de la mezcla de péptido nativo y sintético.	54
Figura 23	Porcentaje de inhibición del péptido sintético contra las tres bacterias.	56
Figura 24	Porcentaje de inhibición del péptido sintético contra occinetos de <i>P. berghei</i> .	56
Figura 25	Porcentaje de mortalidad del péptido sintético contra células de cáncer y monocitos humanos.	57

LISTA DE TABLAS

		Pagina
Tabla 1	Masas moleculares de los componentes presentes en el extracto de la secreción cutánea del anfibio <i>Lithobates spectabilis</i> aislados por el sistema LC-MS.	41
Tabla 2	Secuencias e identificación de los péptidos, obtenidos a través del análisis manual de las fragmentaciones obtenidas por el sistema LC-MS.	43
Tabla 3	Masas moleculares de los componentes presentes en el extracto de la secreción cutánea (con inhibidor de proteasas) del anfibio <i>Lithobates spectabilis</i> aislados por el sistema LC-MS.	46
Tabla 4	Secuencias e identificación de los péptidos trípticos, obtenidos a través del análisis manual de las fragmentaciones obtenidas por el sistema LC-MS de los spots del gel de electroforesis.	50

REFERENCIAS

1. <http://www.who.int/es/>
2. Sheldon AT Jr. Antibiotic resistance: a survival strategy. *Clinical Laboratory Science*. 2005, 18(3):170-80.
3. Gregory Beck and Gail S. Habicht. Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*. 1996, 60-71.
4. Wilson de Melo Cruvinel, Danilo Mesquita Júnior, Júlio Antônio Pereira Araújo, Tânia Tiek Takao Catelan, Alexandre Wagner Silva de Souza, Neusa Pereira da Silva, Luís Eduardo Coelho Andrade, Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and celular mechanisms of inflammatory response.
5. Ruslan Medzhitov and Charles Janeway, Innate Immunity. *The New England Journal of Medicine*. 2000, 343 (5):338–344.
6. Super M, Ezekowitz RA. The role of mannose-binding proteins in host defense. *Infectious Agents and Disease*. 1992; 1(4):194-199.
7. Bruce Beutler. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 2004; 40 () 845–859
8. Montañó Perez K, Vargas Albores F. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*. 2002, 27 (001):21-27
9. Juan P. Cerlian, Sean R. Stowell, Iván D. Mascanfroni, Connie M. Arthur, Richard D. Cummings, Gabriel A. Rabinovich. Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *Journal of clinical immunology*. 2011, 31(1):10-21
10. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas, *Salud Pública*. 2006; 48:62-71.
11. Maria Neuwirth, John W. Daly, Charles W. Myers and Lois W. Tice. Morphology of the Granular Secretory Glands in Skin of Poison-Dart Frogs (Dendrobatidae). *Tissue and Cell*. 1979; 11(4): 755-771
12. J W Daly, J Caceres, R W Moni, F Gusovsky, M Moos, Jr, K B Seamon, K Milton, and C W Myers. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *PNAS*. 1992, 89 (22):10960-10963
13. Daly JW, Ware N, Saporito RA, Spande TF, Garraffo HM., N-Methyldecahydroquinolines: An Unexpected Class of Alkaloids from Amazonian Poison Frogs (Dendrobatidae). *Journal of Natural Products*. 2009, 72(6):1110-4.
14. John W. Mills and Bruce E. Prum. Morphology of the exocrine glands of the frog skin. *The American Journal of Anatomy*. 1984. 171(1):91-106
15. Xiuhong Liu, Dewen You, Lihua Chen, Xu Wang, Keyun Zhang, Ren Lai. A novel bradykinin-like peptide from skin secretions of the frog, *Rana nigrovittata*. *Journal of Peptide Science*. 2008.14 (5): 626–630.

16. Magorzata Śleszyńska, Tomas H. Wierzba, Krzysztof Malinowski, Lenka Borovičková, Izabela Małuch, Dariusz Sobolewski, Bernard Lammek, Jiřina Slaninová, Adam Prah. Novel analogues of bradykinin conformationally restricted in the C-terminal part of the molecule. *Journal of Peptide Science*. 2011, 17(5): 366–372.
17. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews*. 1992, 44(1):1-80.
18. Mass spectrometric study of bradykinin-related peptides (BRPs) from the skin secretion of Russian ranid frogs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011, 25, 933–940.
19. Conlon JM. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. *Regulatory Peptides*. 1999, 79, 71-81
20. Cian Michael McCrudden, Mei Zhou, Tianbao Chen, Martin O'Rourke, Brian Walker, David Hirst, Chris Shaw. The complex array of bradykinin-related peptides (BRPs) in the peptidome of pickerel frog (*Rana palustris*) skin secretion is the product of transcriptional economy. *Peptides*. 2007, 28, 1275–1281.
21. Dan Hultmark, Hakan Steiner, Torgny Rasmuson, and Hans G. Boman. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*. 1980; 106(1): 7-16.
22. Selsted, M. E., Brown, D. M., De Lange, R. and Lehrer, R. L. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983, 258: 14485-14489.
23. Guangshun Wang, *Antimicrobial Peptides, Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies, Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, November 2010 / Hardback / 240 Pages.
24. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 84(15):5449-53.
25. A. Fleming. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 1929, 10: 226–236.
26. R. A. Samson, R. Hadlok and Amelia C. Stolk, A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek* 43 (1977) 169-175.
27. Volpato G, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Use of enzymes in the production of semi-synthetic penicillins and cephalosporins: drawbacks and perspectives, *Current Medicinal Chemistry*. 2010; 17(32):3855-73.
28. Philippe Bulet, Jean-Luc Dimarcq, Charles Hetru, Marie Lagueux, Maurice Charlet, Gilbert Hegy, Alain Van Dorsselaer, and Jules A. Hoffmann. A Novel Inducible Antibacterial Peptide of *Drosophila* Carries an O-Glycosylated Substitution. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268 (20), 4893-14697.
29. Conlan BF, Gillon AD, Craik DJ, Anderson MA. Circular proteins and mechanisms of cyclization. *Biopolymers*. 2010, 94 (5):573-583.

30. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*. 1995; 13:61-92.
31. Jon Nissen-Meyer Ingolf F. Nes, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*.1997, 167: 67–77.
32. Linda Hazlett, Minhao Wu, Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*. 2010, 343 (1): 175-188.
33. Amira Zairi, Frederic Tangy, Khairredine Bouassida, and Khaled Hani. Dermaseptins and Magainins: Antimicrobial Peptides from Frogs' Skin—New Sources for a Promising Spermicides Microbicides—A Mini Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, Article ID 452567, 8 pages.
34. Otvos L Jr., Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science*. 2000, 6(10):497-511.
35. Rogozhin EA, Oshchepkova YI, Odintsova TI, Khadeeva NV, Veshkurova ON, Egorov TA, Grishin EV, Salikhov SI. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011, 49(2):131-7.
36. Hikmate Abriouel, Charles M.A.P. Franz, Nabil Ben Omar, Antonio Galvez. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Federation of European Microbiological Societies*. 2011, 35:201–232.
37. Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annual Review of Biochemistry*. 1990; 59:395-414.
38. Erspamer V, Melchiorri P, Soprani N. The action of bombesin on the kidney of the anaesthetized dog. *British Journal of Pharmacology*. 1973, 48(3):438-55.
39. H.G. Boman. Peptide Antibiotics: Holy or Heretic Grails of Innate Immunity?, *Scandinavian Journal of Immunology*. 1996, 43, 475-482.
40. Ylva Engström. Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology*. 1999, 23 (4-5):345-358.
41. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. 2007, 2 (1): 1–33.
42. Brogden, K. A., Ackermann, M. and Huttner, K. M. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and Immunity* .1998 December; 66(12): 5948–5954.
43. Brogden K. A., Mark Ackermann, and Kenneth M. Huttner, Small, Anionic, and Charge-Neutralizing Propeptide Fragments of Zymogens Are Antimicrobial, Antimicrobial agents and Chemotherapy. 1997, 41 (7):1615–1617.
44. Alessandro Tossi, Luca Sandri, Anna Giangaspero. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Peptide Science*. 2000, 55 (1): 4–30.
45. Hans G. Boman, Ingrid Faye, Gudmundur H. Gudmundsson, Jong-Youn Lee and Dan-Anders Lidholm, Cell-free immunity in *Cecropia* A model system for antibacterial proteins, *European Journal of Biochemistry*. 1991, 201(1), 23-31.
46. Evan F. Haney, Howard N. Hunter, Katsumi Matsuzaki and Hans J. Vogel. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to

- function?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2009, 1788 (8):1639-1655.
47. Otvos, L., Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002, 59(7):1138–1150.
 48. Phillippe Bulet, Charles Hetru, Jean-Luc Dimarcq, Daniéle Hoffmann. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. 1999, 23 (4-5):329-344.
 49. Mackintosh JA, Gooley AA, Karuso PH, Beattie AJ, Jardine DR, Veal DA. A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. 1998, 22(4):387-99.
 50. Jäger S, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation. *International Journal of Inflammation* Volume 2010, 11 pages.
 51. Emilia Bagnicka, Nina Strzałkowska, Artur Józwiak, Józef Krzyżewski, Jarosław Horbańczuk and Lech Zwierzchowski. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Biochimica Polonica*. 2010, 57(4):487-97.
 52. Zhao C, Wang I, Lehrer RI., Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells, *FEBS Lett*. 1996 Nov 4;396(2-3):319-22.
 53. Dipankar Ghosh, Edith M. Porter, Dennis J. Wilk, Michael A. Poles, Tomas Ganz and Charles L. Bevins, Proteolytic cleavage of human enteric defensin 5 (HD5) precursor by intestinal proteases. *Gastroenterology*. 2000, 118(4).
 54. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U., Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *Journal of immunology*. 2010;185(10):6096-104.
 55. Monisha G. Scott, Hong Van, and Robert E. W. Hancock, Biological, Properties of Structurally Related α -Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Infection and Immunity*. 1999, 67 (4) 2005–2009.
 56. Shaini Thomas, Ram Shankar Barai, Shreyas Karnik, V. K. Jayaraman, Susan Idicula-Thomas, CAMP: Collection of Anti-Microbial Peptides, <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>.
 57. JS Richardson and DC Richardson. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science*. 1988, 240 (4859): 1648-1652.
 58. Chen HC, Brown JH, Morell JL, Huang CM. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Letters*. 1988, 236(2):462-6.
 59. Bernd Christensen, Juergen Fink, R. B. Merrifield, and David Mauzerall. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. Biophysics*. 1988, 85(14), 5072-5076.
 60. Richard M. Epand, Hans J. Vogel. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, 1462(1-2)11-28.

61. Lohner K, Latal A, Lehrer RI, Ganz T. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry*. 1997, 36(6):1525-31.
62. Hongxia Zhao, Juha-Pekka Mattila, Juha M. Holopainen, and Paavo K. J. Kinnunen, Comparison of the Membrane Association of Two Antimicrobial Peptides, Magainin 2 and Indolicidin. *Biophysical Journal*. 2001, 81 (5): 2979–2991.
63. Huang, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. 2000, 39(29): 8347–8352.
64. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. and Huang, H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*. 2001, 81 (3):1475–1485.
65. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. and Miyajima, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*. 1996, 35(35):11361–11368.
66. Niv Papo, Yechiel Shai. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?. *Peptides*. 2003 24 (11): 1693–1703.
67. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*. 1992, 31 (49): 12416–12423.
68. Ehud Gazit, Anita Boman, Hans G. Boman, and Yechiel Shai. Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry*. 1995, 34 (36):11479-11488.
69. Brogden Kim A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*. 2005, 3:238-250.
70. A. Gururaj Rao. *Antimicrobial Peptides*. The American Phytopathological Society, MPMI. 1995, 8 (1): 6-13.
71. Pierre Nicolas, Damien Vanhoye, Mohamed Amiche. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*. 2003, 24 (11) 1669–1680.
72. M.Brahmachary. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences <http://research.i2r.astar.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>
73. The Antimicrobial Peptide Database, Copyright 2003 & 2008 Eppley Institute, UNMC, All Rights Reserved, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
74. VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, Tyler MJ, Conlon JM, Wade D, Aiken C, Dermody TS, KewalRamani VN, Rollins-Smith LA, Unutmaz D. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *The Journal of Virology*. 2005 Sep; 79(18):11598-606.
75. Cruciani RA, Barker JL, Zasloff M, Chen HC, Colamonici O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88(9):3792-6.

76. Bucki R, Byfield FJ, Janmey PA. Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *European Respiratory Journal*. 2007, 29(4):624-32.
77. Malaria ookinete Surface Protein- Based Vaccination via the Intranasal Route
78. www.cdc.gov
79. Effects of Magainins and Cecropins on the Sporogonic Development of Malaria Parasites in Mosquitoes
80. Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters*. 2000, 471(2-3):165-8.
81. Villa-Hernandez, O.Hernandez-Orihuela, L.Del Carmen, R.M. Zamudio-Zuniga,F. Castro-Franco,R. Pando,V. Batista,C.V. 2009. Novel Antimicrobial Peptides Isolated from Skin Secretions of the Mexican Frog *Hyla Eximia*, *Protein Pept Lett*, 16, 1371-1378.).
82. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004, 27(5):305-18.
83. Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2003, 97 (1):17-28.
84. Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280(2):984-90.
85. Guilherme D. Brand, et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 347 (3) 739–746.
86. Pal T, Abraham B, Sonnevend A, Jumaa P, Conlon JM. Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad-spectrum antibacterial and antifungal properties. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2006 27(6):525-9.
87. Jianxu Li, Xueqing Xu, Chunhua Xu, Weiping Zhou, Keyun Zhang, Haining Yu, Yaping Zhang, Yongtang Zheng, Huw H. Rees, Ren Lai, Dongming Yang, and Jing Wu. Anti-infection Peptidomics of Amphibian Skin. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2007; 6(5): 882-894.
88. Morikawa N, Hagiwara K, Nakajima T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1992; 189:184 –190.
89. Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(16): 11956–11961.
90. Clark DP, Durell S, Maloy WL, Zasloff M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269 (14):10849–10855.

91. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1696(1):1–14.
92. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1788(8):1556–63.
93. Conlon JM. Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides*. 2008, 29(10):1815 –1819.
94. Xu Wang, Yuzhu Song, Jianxu Li, Huan Liu, Xueqing Xu, Ren Lai, Keyun Zhang, A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. *Peptides*. 2007, 28 (10):2069–2074.
95. Goraya J, Knoop FC, Conlon JM. Ranatuerins. antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998; 250(3):589 –592.
96. Halverson T, Basir YJ, Knoop FC, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*. *Peptides* 2000, 21(4):469–76.
97. Kim JB, Halverson T, Basir YJ, Dulka J, Knoop FC, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from skin extracts and skin secretions of the North American pig frog *Rana grylio*. *Regulatory Peptides*. 2000; 90(1-3):53–60.
98. Conlon JM, Mohammed A. Meetani, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Jerome Leprince c,e, Hubert Vaudry c,e, Jolanta Kolodziejek F, Norbert Nowotny f, Jay. D. King. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the New World frogs *Lithobates capito* and *Lithobates warszewitschii*, *Peptides*. 200930 (10) 1775-1781.
99. Agnes Sonnevend, Floyd C. Knoop, Mahendra Patel, Tibor Pál a, Ana Maria Soto, J. Michael Conlon. Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog. *Peptides*. 2004, 25 (1) 29–36.
100. Pierre Nicolas, Damien Vanhoye, Mohamed Amiche, Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*. 2003, 24 (11) 1669–1680.
101. Instituto de Biología. "*Rana spectabilis*" - IBUNAM: CNAR: AR12009".
102. Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2006; 297:1–291.
103. Clinical and Laboratory Standards Institute Quality Manual; *Third Edition*. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
104. Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*. 2007; 146(1–2):147–157.

105. CONABIO. Estrategia Nacional sobre la Biodiversidad de México. Llorente-Bousquets y Ocegueda 2009.
106. Rubén Castro Franco, Gustavo G. Vergara García, María Guadalupe Bustos Zagal, Wendy Mena Arizmendi. Diversidad y distribución de anfibios del estado de Morelos. *Acta Zoológica Mexicana*, Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. 2006; 22 (001):103-117.
107. Conlon JM. Peptides with potent cytolytic activity from the skin secretions of the North American leopard frogs, *Lithobates blairi* and *Lithobates yavapaiensis*. *Toxicon*. 2009; 53 (7-8):699–705.
108. Alicia Beatriz Pomilio, Arturo Alberto Vitale. Techniques for qualitative and quantitative determination of drugs of abuse in biologic fluids. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2006; 40(3)
109. Robert L. Heinrikson and Stephen C. Meredith. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136(1):65-74.
110. Louise A. Rollins-Smith, Laura K. Reinert, Verma Miera and J. Michael Conlon. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 297(2):361-367.
111. M E Selsted and S S Harwig. Purification, primary structure, and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. *Infection and Immunity*. 1987; 55(9): 2281-2286.
112. Erika P. Meneses, Oscar Villa-Hernandez, Lorena Hernandez-Orihuela, Ruben Castro-Franco, Victoria Pando, Manuel B. Aguilar, Cesar Vicente Ferreira Batista. Peptidomic analysis of the skin secretions of the frog *Pachymedusa dacnicolor*. *Amino Acids*. 2011; 40(1):113-22.
113. LTQ Orbitrap XL Hardware Manual. Thermo Fisher Scientific Inc. 2008. All rights reserved.
114. Mohammed Jemal. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomedical Chromatography*. 2000; 14(6): 422–429.
115. B. A. Budnik, J. V. Olsen, T. A. Egorov, V. E. Anisimova, T. G. Galkina, A. K. Musolyamov, E. V. Grishin and R. A. Zubarev. *De novo* sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004; 39(2): 193–201
116. Wells JM, McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*. 2005; 402:148-85.
117. Richard D. Smith, Joseph A. Loo, Charles G. Edmonds, Charles J. Barinaga, and Harold R. Udseth. New Developments in Biochemical Mass Spectrometry: Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*. 1990; 62(9): 882-899.
118. Jesper V Olsen, Boris Macek, Oliver Lange, Alexander Makarov, Stevan Horning and Matthias Mann. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature methods*. 2007; 4 (9): 709-712.

119. Pisano, J. J. (1979) in *Bradykinin, kallidin and kallikrein supp.* (Erdos, E. G., ed.) pp. 273 -286, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
120. Dunn, R. S. & Perks, A. M. (1970) *Experientia (Basel)* 26,1220-1221.
121. Kimura, M., Sueyoshi, T., Takada, K., Tanaka, K., Morita, T. and Iwanaga, S. Isolation and characterization of ornitho-kininogen. *European Journal of Biochemistry*. 1987; 168 (3): 493-501.
122. Yee Ting Sin, Mei Zhou, Wei Chen, Lei Wang, Tianbao Chen, Brian Walker, Chris Shaw. Skin bradykinin-related peptides (BRPs) and their biosynthetic precursors (kininogens): Comparisons between various taxa of Chinese and North American ranid frogs.
123. Michael Conlon, Haider Raza a, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Jérôme Leprince, Hubert Vaudry, Jay. D. King, Purification of peptides with differential cytolytic activities from the skin secretions of the Central American frog, *Lithobates vaillanti* (Ranidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2009. 150 (2):150-154.
124. Maurizio Simmaco, Giuseppina Mignogna, Silvia Canofeni, Rossella Miele, Maria Luisa Mangoni, Donatella Barra, Temporins, Antimicrobial Peptides from the European Red Frog *Rana temporaria*, *European Journal of Biochemistry*. 1996; 242 (3):788–792.
125. Mohamed F. Alia, Karen R. Lipsb, Floyd C. Knoopc, Bernd Fritzscha, Caroline Millera, J. Michael Conlon. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochimica et biophysica acta*. 2002; 1601(1):55-63.
126. Maria Grazia Giovannini, Linda Poulter, Bradford W. Gibson and Dudley H. Williams. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochemical Journal*. 1987; 243(1):113-120.
127. Paul F. M. Kuks, Christophe Creminon, Anne-Marie Leseney, Julie Bourdais, Alain Morel, and Paul CohenS, *Xenopus laevis* Skin Arg-Xaa-Val-Arg-Gly-endoprotease, *The Journal of Biological Chemistry*. 264 (25):14609-14612.1989.
128. Paul Cohen. Proteolytic events in the post-translational processing of polypeptide hormone precursors, 1987, *Biochimie*. 1987; 69(2):87-9.
129. Regina Adão, Kamran Nazmi, Jan G.M. Bolscher, and Margarida Bastos, C- and N-truncated antimicrobial peptides from LFampin 265 – 284: Biophysical versus microbiology results. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2011 3(1):60–69.
130. Flavio S. Dourado, Jose Roberto S.A. Leite, Luciano P. Silva, Jorge A.T. Melo, Carlos Bloch Jr., Elisabeth F. Schwartz. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog, *Leptodactylus siphax*. *Toxicon*. 2007, 50 () 572–580.
131. Jianxu Li, Cheng Zhang, Xueqing Xu, Jie Wang, Haining Yu, Ren Lai and Weimin Gong. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *The FASEB Journal*. 2007;21(10):2466-2473.
132. Christa Mollay, Christian Wechselberger, Giuseppina Mignogna, Lucia Negri, Pietro Melchiorri c, Donatella Barra b, Gu'nther Kreil. Bv8, a small protein

from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 1999; 374(2): 189–196.

133. Matthew D. Petroski and Raymond J. Deshaies, Function and Regulation of cullin–ring ubiquitin ligases. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2005, 6(1):9-20.
134. M. G. Sharapov and V. K. Ravin. Peroxiredoxin 6 from the clawed frog *Xenopus laevis*: cDNA cloning, enzyme characterization, and gene expression during development, *Biochemistry*. 2009; 74(8): 898-902.
135. Hailong Yang, Xu Wang, Xiuhong Liu, Jing Wu, Cunbao Liu, Weiming Gong, Zhiqiang Zhao, Jing Hong, Donghai Lin, Yizheng Wang and Ren Lai, Antioxidant Peptidomics Reveals Novel Skin Antioxidant System, *Molecular and Cellular Proteomics* 8.3
136. Jacob A. Tennessen and Michael S. Blouin, A revised leopard frog phylogeny allows a more detailed examination of adaptive evolution at ranatuerin-2 antimicrobial peptide loci, *Immunogenetics*. 62 (5):
137. Anusha P. Subasinghage, J. Michael Conlon and Chandralal M. Hewage. Conformational analysis of the broad-spectrum antibacterial peptide, ranatuerin-2CSa: Identification of a full length helix–turn–helix motif. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2008; 1784 (6): 924-929.
138. Mei Zhou, Lei Wang, Damian E. Owens, Tianbao Chen, Brian Walker and Chris Shaw. Rapid identification of precursor cDNAs encoding five structural classes of antimicrobial peptides from pickerel frog (*Rana palustris*) skin secretion by single step “shotgun” cloning, *Peptides*. 2007; 28 (8):1605-1610.
139. Goraya,J., Wang,Y., Li,Z., O’Flaherty,M., Knoop,F.C., Platz,J.E.and Conlon,J.M., Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana.luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*, *Eur. J. Biochem*. 2000; 267(3): 894-900.
140. C L BEVINS, E MARTIN-PORTER T. GANZ, Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract, *Gut* 1999; 45:911–915.
141. Michael Conlon, The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans, *Cell Tissue Res* (2011) 343:201–212
142. J. Michael Conlon, Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions, *Cell. Mol. Life Sci.* (2011) 68:2303–2315
143. Robert A. Dorschner, Kenneth H. Lin, Masamoto Murakami, and Richard I. Gallo, Neonatal Skin in Mice and Humans Expresses Increased Levels of Antimicrobial Peptides: Innate Immunity During Development of the Adaptive Response. *Pediatric Research*. 2003 Vol. 53, No. 4.