

## ESTUDIO ESPECTROMÉTRICO DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS AISLADOS DE LA PIEL DE ANFIBIOS MEXICANOS.

Erika Patricia Meneses Romero, Lorena Hernández Orihuela, Oscar Villa Hernández y Cesar V. F. Batista\*  
Unidad de Proteómica, IBT-UNAM. Av. Universidad, 2001, Col. Chamilpa 62210, Cuernavaca, Mor.  
fbatista@ibt.unam.mx

Anfibios mexicanos, Péptidos antimicrobianos, Espectrometría de masas.

**Introducción.** Las glándulas paratoides de anfibios producen una gran diversidad de moléculas con una amplia gama de actividades biológicas, de las cuales las más importantes son: antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica, antiviral y antitumoral (1). La metodología bioquímica tradicional utilizada para el aislamiento y caracterización de péptidos es en general tardada y costosa. Por ello, emergentes tecnologías como la espectrometría de masas macromolecular en tándem y analizadores iónicos de alta resolución han sido desarrolladas con gran éxito en la última década (2).

El objetivo de este trabajo es evaluar nuevos métodos de fragmentación en tándem a través de la espectrometría de masas para la delucidación estructural de péptidos bioactivos contenidos en la secreción de anfibios mexicanos.

**Metodología.** La secreción total de la piel de los anfibios fue obtenida por electro-estimulación y los extractos totales fueron separados por HPLC. Los péptidos en forma homogénea, de forma intacta o generada por digestiones enzimáticas, fueron sometidos a fragmentación por las técnicas CID (Collision- Induced Dissociation), PQD (Pulse Quadrupole Dissociation), HCD (High Collision Dissociation) y ETD (Electron Transfer Dissociation) en los espectrómetros de masas LTQ-ETD y LTQ-Orbitrap. Los espectros MS/MS fueron analizados manualmente y por los programas computacionales Sequest, Peaks, Online, Mascot y Protein Prospector.

**Resultados y discusión.** Cientos de péptidos fueron aislados de la piel de anfibios y sometidos a fragmentación en tándem. La evaluación comparativa de los datos espectrales obtenidos por fragmentación a través de los cuatro métodos utilizados revela que estos arrojan datos estructurales complementarios. PQD y HCD demostraron ser excelentes técnicas de fragmentación para la identificación de iones imonium y de fragmentos iónicos de bajo peso molecular. Los métodos CID y ETD fueron utilizados para iones cargados con doble y triple carga respectivamente. La figura 1 presenta un espectro fragmentado por la técnica CID cuya secuencia posee 100% de identidad estructural con las breviniás, que son péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica. La utilización

concomitante de diferentes métodos de fragmentación y herramientas computacionales nos permitió obtener docenas de secuencias totales y parciales. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para identificar péptidos con diferentes actividades biológicas: antibacterianos (ranciclinas y ranatuerinas); antiparasitarios, antifúngicos y antivirales (temporinas); liberadores de insulina y citolíticos (Fig 1).

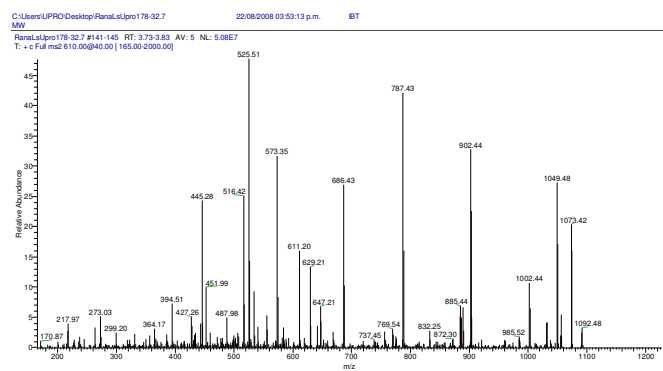


Fig. 1. Espectro de masas en tándem de un péptido triptico cuya secuencia delucidada es: GIMoxDTLKNLAK.

**Conclusiones.** La utilización de diferentes métodos de fragmentación en tándem permite una mayor cobertura de secuencia y por consecuencia, una amplia identificación de mezclas complejas de proteínas. La metodología utilizada, acoplada a sistema de cromatografía líquida, se constituye en la plataforma analítica de excelencia para estudios peptidómicos.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-Dgapa IN221508 de CVFB.

### Bibliografía.

- Mangoni ML, Marcellini HG, Simmaco M. (2007). Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic antimicrobial peptides from amphibian skin. *J Pept Sci.* 13(9):603-13.
- Wepf A, Glatter T, Schmidt A, Aebersold R, Gstaiger M. Quantitative interaction proteomics using mass spectrometry (2009). *Nat Methods.* (Epub ahead of print).